

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO - UFRJ

RAYSSA ALVES DE LIMA

“PRODUÇÃO DO MEIO TYB-UFRJ PARA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN
HUMANO E COMPARAÇÃO COM MEIOS COMERCIAIS”

RIO DE JANEIRO

2018

RAYSSA ALVES DE LIMA

“PRODUÇÃO DO MEIO TYB-UFRJ PARA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN
HUMANO E COMPARAÇÃO COM MEIOS COMERCIAIS”

Dissertação de mestrado
profissional apresentada à
Universidade Federal do Rio de
Janeiro, Instituto de Biofísica
Carlos Chagas Filho – Área de
Reprodução Humana.

Orientador: Prof. Dr. Marcel Frajblat

Rio de Janeiro

2018

Ficha Catalográfica

Lima, Rayssa Alves de

Produção do meio TYB-UFRJ para criopreservação sêmen humano e comparação com meios comerciais. / Rayssa Alves de Lima. – Rio de Janeiro: UFRJ / Centro de Ciências da Saúde, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Mestrado Profissional de Formação para a Pesquisa Biomédica, 2018.

64 f.: il.; 31 cm.

Orientador: Marcel Frajblat.

Dissertação (mestrado profissional) – Universidade Federal do Rio de Janeiro / Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Mestrado Profissional de Formação para a Pesquisa Biomédica, 2018.

Referências: f. 58-64.

1. Criopreservação-métodos. 2. Técnicas de Reprodução Assistida. 3. Preservação do Sêmen. 4. Infertilidade Masculina. 5. Crioprotetores. 6. Pesquisa Biomédica. - Dissertação. I. Frajblat, Marcel. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Ciências da Saúde, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Mestrado Profissional de Formação para a Pesquisa Biomédica. III. Título.

FICHA DE APROVAÇÃO

Aos meus pais Alma e Romildo por nunca desistirem de acreditar nos meus sonhos e alimentá-los independente da circunstância... Sem vocês nada seria possível. Amo vocês com todo amor.

A minha família que mesmo fisicamente distante sempre se fez presente com todo o amor.

A minha irmã, por quem eu não meço esforços de conquistar para repartir...

Dedico a vocês este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em especial ao meu orientador **Prof. Dr Marcel Frajblat** pela amizade, apoio e orientação científica e de vida, sem os quais este trabalho não se realizaria... gratidão pela nossa parceria.

Agradeço em especial ao querido **Dr. Lídio Jair Ribas Centa** que apoiou e permitiu que este trabalho fosse realizado em sua clínica Androlab.

À **Alexandra Stupak Hertz** por acreditar em mim em todos os momentos, apoiar este trabalho e incentivar que a boa ciência seja feita dentro do laboratório de Reprodução Humana da clínica Androlab.

Às minhas **amigas** de trabalho **Adriane, Andrielle e Naiara** pela preocupação, apoio, incentivo e carinho em todos os momentos de cansaço e estafa durante a trajetória.

Às colegas de laboratório **Isadora e Débora** que solícitamente ajudaram na realização dos testes sem os quais este trabalho não se realizaria.

À todos que de alguma forma contribuíram para a elaboração e realização deste trabalho.

RESUMO

Introdução: a infertilidade é uma doença que afeta cerca de 15% dos casais em idade fértil. Aproximadamente 50% das causas de infertilidade conjugal tem origem masculina, seja como único fator, seja associada à fatores de infertilidade feminina. Nos últimos anos, muitos esforços têm sido direcionados para o avanço e flexibilização da terapêutica para casais inférteis entre eles, a criopreservação de gametas e embriões torna-se um importante avanço na história da reprodução assistida (RA). A criopreservação seminal é uma das técnicas mais antigas da história da RA, porém pouco evoluiu desde seu início. A mesma formulação do meio de congelamento descoberta em 1948 chamada de Test-Yolk-Buffer (TYB) é a formulação de maior sucesso ainda hoje na clínica prática.

Objetivo: O presente estudo tem dois objetivos principais: 1) produzir um meio TYB na UFRJ e comparar sua eficiência com um meio comercial nacional e 2) comparar os meios normalmente utilizados na rotina do laboratório de andrologia e criopreservação de sêmen do Banco de Sêmen da clínica Androlab, Curitiba - PR. **Materiais e Métodos:** No experimento 1 do estudo foi a comparação da recuperação seminal pós criopreservação com os meios comerciais: "freezingmedium" da empresa Irvine Scientific, "Ingá FreezingMedium" da empresa nacional Ingámed, e o "SpermFreezing" da empresa Life Global. Foram incluídas nesta fase do estudo 23 amostras de sêmen classificadas como normozoospermicas e oligoastenozoospermicas de homens que se submeteram ao exame de espermograma na clínica Androlab. No experimento 2 os resultados obtidos com o meio TYB-UFRJ foram comparados com o meio nacional "Ingá SpermFreezing". Foram incluídas nesta fase do estudo, 5 amostras com parâmetros seminais normais.

Resultados: Experimento 1: recuperação da motilidade progressiva foi significativamente maior no tratamento com a marca Ingámed comparado aos outros 2 tratamentos. A recuperação da motilidade total e vitalidade espermática foram semelhantes nos tratamentos com Irvine e Ingámed, porém significativamente inferiores no tratamento com o meio Global. Experimento 2: Os parâmetros de motilidade progressiva e total e a vitalidade foram significativamente maiores no meio controle Ingámed.

Conclusão: Concluímos a partir dos dados obtidos pelo presente estudo, que os meios Ingámed e Irvine que não possuem gema ainda oferecem resultados melhores quando comparados com formulações sem gema como da Global. E por fim, o meio UFRJ apresenta potencial para ser refinado em novos lotes e alterações na metodologia de congelamento para que possa ser utilizado em estudos futuros de substituição de seus ingredientes.

Palavras-chaves: TYB-UFRJ, criopreservação, reprodução assistida.

ABSTRACT

Introduction: Infertility is a disease that affects about 15% of couples of childbearing age. Approximately 50% of the causes of conjugal infertility have male origin, either as single factor, or associated with female infertility factors. In recent years, many efforts have been directed towards the advancement and relaxation of therapy for infertile couples among them, cryopreservation of gametes and embryos becomes an important advance in the history of assisted reproduction (RA). Seminal cryopreservation is one of the oldest techniques in RA history, but has hardly evolved since its inception. The same formulation of the freeze medium discovered in 1948 called the Test-Yolk-Buffer (TYB) is the most successful formulation still in clinical practice today. **Objective:** The present study has two main objectives: 1) to produce a TYB medium in UFRJ and to compare its efficiency with a national commercial medium; and 2) to compare the means normally used in the laboratory routine of andrology and semen cryopreservation of the Semen Androlab Clinic, Curitiba - PR. **Materials and Methods:** In the experiment 1 of the study was the comparison of the semen recovery after cryopreservation with the commercial media: freezing medium of the company Irvine Scientific, "Ingá Freezing Medium" of the national company Ingámed, and the "Sperm Freezing" of the company Life Global. This study included 23 semen samples classified as normozoospermics and oligoasthenozoospermics from men who underwent sperm examination at the Androlabclinic. In experiment 2 the results obtained with the TYB-UFRJ medium were compared with the national medium "Ingá Sperm Freezing". Five samples with normal seminal parameters were included in this phase of the study. **Results:** Experiment 1: Progressive motile recovery was significantly higher in the treatment with the Ingámed brand compared to the other 2 treatments. The recovery of total motility and sperm vitality were similar in the treatments with Irvine and Ingámed, but significantly lower in the treatment with the Global medium. Experiment 2: The parameters of progressive and total motility and vitality were significantly higher in the control medium Ingámed. **Conclusion:** We conclude from the data obtained by the present study that Ingámed and Irvine media that do not have yolk still offer better results when compared to non - yolk formulations such as Global. Finally, the UFRJ medium has the potential to be refined in new batches and changes in the freezing methodology so that it can be used in future studies to substitute its ingredients.

Keywords: TYB-UFRJ, cryopreservation, assisted reproduction.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Esquema em forma de linha do tempo, indicando os principais acontecimentos na história da criobiologia.

FIGURA 2: Esquema morfológico de um espermatozoide maduro.

FIGURA 3: Desenho da disposição dos espermatozoides na câmara de makler. O número de espermatozoides encontrado nos 100 quadrados, deve ser multiplicado por 100.000 e este será o resultado da quantidade de espermatozoides por mililitro de sêmen

FIGURA 4: Sequência de passos do congelamento no experimento 1. As amostras foram avaliadas quanto a concentração, motilidade e vitalidade e dividida em três tratamentos com meios de congelamento Irvine, Global e Ingámed. Após tempo de ação de cada meio, as palhetas preenchidas foram expostas ao vapor de N₂ líquido por 15 minutos e posteriormente imersas em N₂ líquido.

FIGURA 5: Sequência de passos do congelamento no experimento 2. O sêmen passou por liquefação de 30 minutos e em seguida foi analisado quanto a concentração motilidade e vitalidade. Em seguida alíquotas de 0,3mL foram separadas e os meios de congelamento foram adicionados. As palhetas foram expostas ao vapor de N₂ líquido e em seguida imersas em N₂ líquido.

FIGURA 6: Sequência de eventos no descongelamento do experimento 1. As palhetas foram retiradas uma a uma do N₂ líquido respeitando o protocolo de cada meio de congelamento. Em seguida a análise de recuperação de concentração e motilidade foi realizada. A solução de congelamento foi lavada e a vitalidade foi analisada.

FIGURA 7: Sequência de eventos no descongelamento do experimento 2. Ingámed: As palhetas foram uma a uma retiradas no N₂ líquido e a motilidade e concentração foi registrada. Após leituras a solução de congelamento foi lavada e a vitalidade foi registrada. TYB-UFRJ: As palhetas foram retiradas no N₂ líquido e analisadas quanto a motilidade 5 minutos, 15 minutos, 20 minutos e 20 minutos depois de retiradas do N₂ líquido. Após as leituras a solução de congelamento foi lavada e a motilidade, concentração e vitalidade foram registradas.

FIGURA 8: Gráfico representando a taxa de recuperação das motilidades progressiva, total e vitalidade após congelamento/aquecimento de amostras normozoospérmicas nos meios Irvine, Ingámed e Global utilizados no experimento 1.

FIGURA 9: Gráfico representando a taxa de recuperação das motilidades progressiva, total e vitalidade após congelamento/aquecimento das amostras oligoastenozoospérmicas nos meios Irvine, Ingámed e Global utilizados no experimento 1.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Composição oferecida pelos fabricantes sobre a formulação dos meios Test-Yolk-Buffer.

TABELA 2: Composição oferecida pelos fabricantes sobre a formulação dos meios gema-free.

TABELA 3: Avaliação da motilidade progressiva (MP), motilidade não-progressiva (B), e vitalidade (VIT) das amostras do experimento 1 antes de serem submetidas ao congelamento.

TABELA 4: Análise microscópica das amostras normozoospérmicas *in natura* após 30 minutos de liquefação do experimento 2. Concentração espermática (milhões/mL), percentual de espermatozoides móveis progressivos (A), não-progressivos (B), e imóveis (C).

TABELA 5: Espermatozóides móveis progressivos (A), móveis não-progressivos (B) e vivos (VIT) antes e após o congelamento no meio comercial Ingámed e no meio do experimento TYB-UFRJ do experimento 2. Os valores são médias das 5 amostras normozoospérmicas.

TABELA 6: Taxa de recuperação do experimento 2. Recuperação da motilidade progressiva (A), motilidade total (A+B) e vitalidade (VIT) após congelamento/aquecimento nos meios Ingámed e TYB-UFRJ.

SIGLAS E ABREVIATURAS

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

DMSO – DimethylSulfoxide ou Dimetilssulfóxido

DNA – Deoxyribonucleicacid ou Ácido desoxiribonucleico

FIV – Fertilização in vitro

HDL – High-densitylipoprotein ou Lipoproteína de alta densidade

HSA – HumanSerumAlbumin ou Albumina Sérica Humana

ICSI – Intracytoplasmicsperminjection ou Injeção intracitoplasmática de espermatozóide

IU – Inseminação Intra-uterina

LDL – Low-densitylipoprotein ou Lipoproteína de baixa densidade

MESA – Micro-epididymalSpermAspiration ou Aspiração microcirurgica do epidídimo

MHM – MultipurposeHandlingMedium

N₂ líquido – Nitrogênio Líquido

OMS - Organização Mundial de Saúde

PESA – Percutaneous Epididymal Sperm Aspiration ou Aspiração percutânea do epidídimo

pH – Potencial hidrogênico

RA – Reprodução Assistida

RHA – Reprodução Humana Assistida

TA – Temperatura Ambiente

TE – Transferência Embrionária

TESA – Testicular Sperm Aspiration ou Aspiração percutânea do testículo;

TESE – Testicular Sperm Extraction ou biópsia testicular

TRIS – Tri-hidroximetilaminometano

TYB – Test-Yolk Buffer

UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro

SUMÁRIO

1. Introdução	16
1.1 Breve histórico e importância da criopreservação na reprodução assistida	16
1.2 Importância e aplicação do sêmen criopreservado	18
1.3 Princípios do congelamento.....	21
1.4 O espermatozoide e o congelamento	21
1.5 O plasma seminal e o congelamento	23
1.6 Interações dos componentes do meio de congelamento com a célula espermática	24
1.7 Componentes do meio de congelamento	25
1.7.1 Crioprotetores penetrantes – O glicerol	25
1.7.2 Crioprotetores não-penetrantes – A gema de ovo	26
1.7.3 Tampões, sais e substratos energéticos	28
1.8 Formulações disponíveis	29
2. Objetivos	32
2.1 Objetivos Gerais	32
2.1.1 Experimento 1	32
2.1.2 Experimento 2	32
2.2 Objetivos específicos	33
2.2.1 Experimento 1	33
2.2.2 Experimento 2	33
3. Materiais e métodos	33
3.1 Desenho experimental	33
3.1.1 Experimento 1	33
3.1.2 Experimento 2	34
3.2 Amostras	34
3.2.1 Número de amostras	34
3.2.1.1 Experimento 1	34
3.2.1.2 Experimento 2	34
3.2.2 Seleção das amostras	35

3.2.2.1	Critérios de inclusão e exclusão	35
3.2.3	Coleta das amostras	35
3.3	Produção do meio TYB-UFRJ	36
3.4	Análises	36
3.4.1	Concentração	36
3.4.2	Motilidade	37
3.4.3	Vitalidade	38
3.4.4	Taxa de recuperação	38
3.5	Congelamento do sêmen	38
3.5.1	Meio Irvine Scientific	38
3.5.2	Meio Life Global	38
3.5.3	Meio Ingámed	39
3.5.4	Meio TYB-UFRJ	39
3.6	Descongelamento do sêmen	40
3.6.1	Meio Irvine Scientific	41
3.6.2	Meio Ingámed	41
3.6.3	Meio Life Global	41
3.6.4	Meio TYB-UFRJ	42
3.7	Análise estatística	43
4.	Resultados	43
4.1	Experimento 1	43
4.1.1	Análise pré-congelamento	43
4.1.2	Taxa de recuperação após-descongelamento	44
4.2	Experimento 2	47
4.2.1	Análise pré- congelamento	47
4.2.2	Análise pós-descongelamento	47
4.2.3	Taxa de recuperação pós-descongelamento	48
5.	Discussão	49
6.	Conclusão	57
7.	Implicações do estudo	57

8. Perspectivas futuras	58
9. Referências Bibliográficas	59

1 INTRODUÇÃO

1.1 Breve histórico e importância da criopreservação na reprodução assistida

É estimado que cerca de 10-15% dos casais em idade fértil que desejam um filho, apresentam dificuldade em alcançar uma gravidez. A infertilidade conjugal já é tratada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como um problema de saúde pública, pois vem crescendo de maneira acelerada nos últimos anos. Aproximadamente 50% das causas de infertilidade conjugal tem origem masculina, seja como único fator, seja associada à fatores de infertilidade feminina. Contudo, em algumas regiões do mundo, as taxas de infertilidade são muito mais elevadas, atingindo cerca de 30% em algumas populações, incluindo o Sul da Ásia, África Subsaariana, Oriente Médio e Norte da África, Europa Central e Oriental e Ásia Central (INHORN & PATRIZIO, 2015). Esta classificação da infertilidade masculina, feminina e combinada se torna algo complexo quando tratada a nível mundial. Cada região se apresenta com um cenário diferente, o que torna imprecisa a estimativa em escala mundial (MASCARENHAS *et al.*, 2012). Com o avanço no tratamento da infertilidade conjugal e principalmente, com o desenvolvimento da técnica de injeção intracitoplasmática de espermatozoides – ICSI nos anos 90 (PALERMO *et al.*, 1992), uma nova perspectiva terapêutica para os casais inférteis, especialmente os com fator masculino grave foi gerada. O procedimento de ICSI é capaz de oferecer uma taxa de fertilização superior a fertilização in vitro (FIV) clássica, mesmo quando o espermatozoide apresenta alterações severas nos parâmetros de concentração, motilidade e morfologia (PALERMO *et al.*, 2015). Uma fertilização satisfatória proporciona ao casal infértil em tratamento, maiores chances de sucesso de gestação dentro do ciclo. Com um maior número de zigotos e embriões a chance de transferência de um bom embrião aumenta, e conseqüentemente oferece maiores chances de existirem embriões viáveis excedentes para congelamento, proporcionando ao casal a oportunidade de novas transferências com embriões criopreservados. Para o paciente, ter embriões excedentes significa a possibilidade de novas transferências embrionárias (TE) sem que um novo estímulo ovariano seja necessário.

Diante do avanço e flexibilização da terapêutica para casais inférteis, a criopreservação de gametas e embriões torna-se um importante avanço na história da reprodução assistida (RA). O primeiro relato da história sobre a resistência dos espermatozoides a baixas temperaturas é datado de 1776, quando foi observado que espermatozoides sobreviveram após congelamento na neve (POLGE *et al.*, 1949). No final da década de 1940, diferentes maneiras de congelar sêmen humano foram investigadas com o objetivo de preservar as características do sêmen fresco. A história da criobiologia na RA tem início em 1948, quando C. Polge consegue congelar sêmen de touro a -70°C com sua acidental descoberta do glicerol como crioprotetor (figura 1). Inicialmente, o principal problema a ser resolvido era ampliar o período de conservação do sêmen sem alterar suas propriedades fecundantes. Em 1949 o mesmo pesquisador aplicou o glicerol ao congelamento seminal humano e obteve sucesso no descongelamento, boa taxa de fertilização com o espermatozoide descongelado e desenvolvimento embrionário adequado. Após isso, os protocolos de congelamento de sêmen humano foram se aperfeiçoando e muitas outras descobertas na linha do tempo foram conseguidas:

- I) 1963 - a troca de gelo seco para nitrogênio líquido como veículo de armazenamento;
- II) 1971 - a possibilidade do leite ser usado como crioprotetor;
- III) 1981 - a gema de ovo como crioprotetor;
- IV) 2000 citrato de sódio.

As primeiras crianças nascidas com o uso de sêmen congelado surgiram no início da década de 1950 (BUNGE *et al.*, 1954). Nessa escala de evolução, observou-se que a associação entre a gema do ovo de galinha com o glicerol era a que melhor mantinha as características físico-químicas de espermatozoides no pós-aquecimento. Essa associação, forma o meio de congelamento de sêmen humano e animal mais usado até hoje.

Antes da descoberta da gema como crioprotetor de diluidores de sêmen humano, a gema do ovo tem sido utilizada na biotecnologia da reprodução como ingrediente essencial nos meios diluidores para resfriamento e congelamento de espermatozoides em várias espécies domésticas. Na reprodução animal, a descoberta dos efeitos

benéficos da gema de ovo sobre a fertilidade do sêmen diluído, em 1939, por Phillips, liderou o seu uso nos meios diluidores de bovinos. Em 1942, Lasley e colaboradores observaram a capacidade da gema em proteger os espermatozoides contra o choque térmico. A descoberta de que o sêmen bovino poderia ser congelado com o glicerol, por Polge e colaboradores em 1949, direcionou as pesquisas para o estudo das qualidades protetoras da gema de ovo (PACE & GRAHMAN, 1974).

Segundo Feldschuh e colaboradores (2005), o sêmen humano congelado mais antigo que gerou um nascimento ficou estocado por 28 anos e 11 meses no nitrogênio líquido, porém estima-se que as células em nitrogênio líquido (N_2 líquido) permaneçam viáveis por mais de 3000 anos, desde que não haja mudanças bruscas de temperaturas a -196°C (YOSHIDA, 2000). Todo este tempo de armazenamento só é possível devido aos princípios da criopreservação, que são manter a integridade estrutural e a viabilidade celular após submeter essas células a baixíssimas temperaturas por períodos indeterminados.

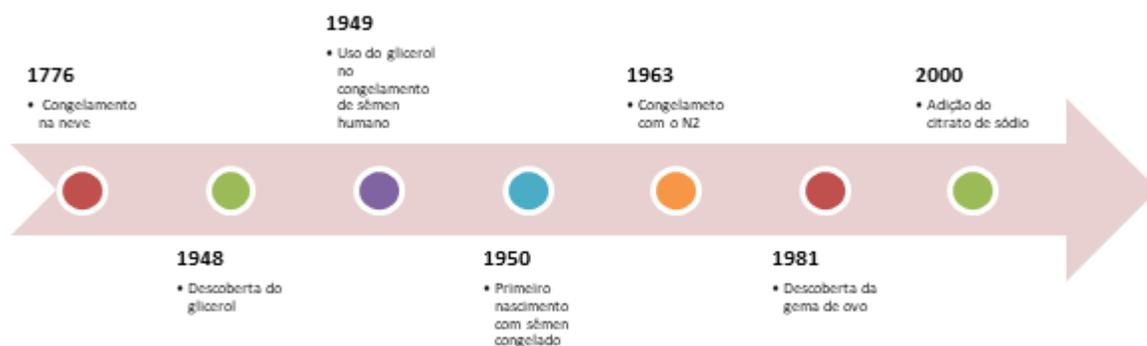


Figura 1: Linha do tempo dos principais acontecimentos na história da criobiologia.

1.2 Importância e aplicações do sêmen criopreservado

A possibilidade de se estocar células germinativas por tempo indeterminado apresenta uma série de aplicações clínicas importantes. Talvez a aplicabilidade de maior importância do congelamento, seja a preservação da fertilidade de pacientes que serão submetidos à tratamento de câncer. Pacientes com câncer que requerem terapias que podem de alguma forma alterar a produção ou qualidade dos espermatozoides devem

procurar as clínicas de RA para aumentar as chances de preservação de sua fertilidade (ANGER *et al.*, 2003). Em muitos pacientes, a qualidade seminal já está reduzida antes mesmo de serem submetidos a qualquer forma de tratamento oncológico (MAGELSEN *et al.*, 2006). Infelizmente, é impossível prever quem terá espermatogênese normal ou alterada após tratamentos com quimio ou radioterapia. Mesmo quando o paciente tem a produção espermática retomada após término do tratamento, a qualidade dos espermatozoides que serão produzidos poderá ser afetada, gerando alterações na concentração, morfologia, motilidade e integridade do DNA espermático. Essas alterações geram dificuldade de fecundação natural da célula alterada no óvulo, necessitando assim, do auxílio das técnicas de RA. Embora o desenvolvimento de novos tratamentos oncológicos tenha resultado em um elevado grau de recuperação da fertilidade natural, a incidência de pacientes que ficam inférteis após tratamento permanece elevada (PASQUALOTTO & AGARWAL, 2001). Em até 90% dos casos, os pacientes apresentam espermogramas azoospermicos nos períodos próximos ao encerramento do tratamento, e apenas 20-50% deles voltam a apresentar espermatogênese após 2 a 3 anos. A maior chance de esses pacientes preservarem sua fertilidade é realizando o congelamento seminal antes de serem submetidos a qualquer tratamento. A quantidade de amostras necessárias para o congelamento dependerá da qualidade do material coletado e da pretensão de qual técnica de RA o paciente terá indicação e condições de realizar. Nos últimos anos, as clínicas de medicina reprodutiva têm investido junto aos oncologistas para que estes orientem o congelamento de sêmen em caso de tratamento oncológico masculino (MAGELSEN *et al.*, 2006).

O congelamento do sêmen humano tem uma série de outras indicações (PASQUALOTTO, 2011):

- Criopreservação de sêmen para doação como opção de tratamento para os casos de infertilidade masculina depois de esgotadas as possibilidades terapêuticas, em casos de doenças genéticas transmissíveis por parte do homem ou por fatores econômicos o casal prefere a utilização do banco de sêmen a tentar outras técnicas de reprodução assistida.
- Possibilidade de coleta fora do dia do procedimento de ICSI, FIV ou Inseminação Intra-uterina (IIU), o que permite maior liberdade do paciente e elimina o estresse

da coleta. Casos de ausência temporária ou definitiva do homem, baixa frequência sexual e disfunção erétil também são aplicáveis.

- Congelamento de sêmen para indivíduos que desejam ser submetidos à vasectomia, objetivando preservar a fertilidade futura.
- Congelamento dos espermatozoides obtidos durante microcirurgias para reconstrução do sistema reprodutivo como a vasovasostomia e vasoepididimostomia.
- Congelamento de espermatozoides obtidos por técnicas cirúrgicas do epidídimo ou do testículo, para utilização em ICSI ou FIV em casos de produção espermática normal, porém é diagnosticada a ausência de espermatozoides no ejaculado (MESA – aspiração microcirúrgica do epidídimo; TESA – aspiração percutânea do testículo; PESA – aspiração percutânea do epidídimo ou TESE – biópsia testicular).
- Congelamento de sêmen de indivíduos que trabalham em profissões de alto risco como, por exemplo, mergulhadores de elevada profundidade, indústrias químicas, exposição a agrotóxicos e pesticidas, exposição ao calor e exposição à radiações ionizantes).

Estas indicações para a realização do congelamento de sêmen demonstram a importância desta técnica para a reprodução humana e a necessidade de se investigar os princípios da criobiologia, para tornar este procedimento cada vez mais eficiente, e assim, chegar a formulações de meio de congelamento menos danosas. Um recente relatório emitido pela OMS estimou que em cerca de 50% dos espermatozoides que são submetidos ao processo de congelamento, danos celulares são observados, principalmente na motilidade (LEIBO *et al.*, 2001). Esta estimativa de danos celulares, varia de maneira significativa de indivíduo para indivíduo, e até mesmo entre ejaculados do mesmo indivíduo (GARNER *et al.*, 1999).

1.3 Princípios do congelamento

Para fertilizar um oócito, o espermatozoide necessariamente deverá manter atributos básicos como o metabolismo para produção de energia, a motilidade

progressiva, a integridade acrossomal e das proteínas da membrana para ligação com o oócito (SQUIRES *et al.*, 1999). Entretanto, os protocolos de criopreservação expõem as células espermáticas a várias situações de estresse como: variações de temperaturas e exposição a temperaturas não fisiológicas e estresse osmótico pelos elevados gradientes de concentração de solutos do meio diluente de congelamento, que levam à formação e dissolução de cristais de gelo no meio intra e extracelular, os quais comprometem sua viabilidade (WATSON, 2000). Para entender os danos causados pelo processo de congelamento na célula espermática, é importante conhecer sua fisiologia.

1.4 O espermatozoide e o congelamento

O espermatozoide maduro é composto por três porções: cabeça, peça intermediária e cauda. Na cabeça do espermatozoide existem duas regiões: o núcleo e o acrossoma. O acrossoma é uma estrutura produzida pelo complexo de golgi e contém enzimas responsáveis em auxiliar o processo de penetração no óvulo e nas camadas de células circundantes a ele - células da granulosa e cúmulos. O núcleo do espermatozoide compõe a outra parte da cabeça espermática e nele se encontra o material genético de herança paterna determinante na definição do sexo do embrião. É uma estrutura haplóide, com a cromatina altamente condensada o que mantém a estabilidade do DNA. O núcleo é recoberto pelo envelope nuclear que é composto de uma membrana interna e uma externa. A peça intermediária é composta basicamente de mitocôndrias, que tem como função fornecer energia para a locomoção do espermatozoide através do trato genital feminino. A cauda ou flagelo, formada basicamente por microtúbulos de tubulina, é responsável por impulsionar o espermatozoide no trajeto até o encontro do óvulo (figura 2).

A membrana espermática, assim como o modelo biológico clássico, é formada por uma bicamada fosfolipídica, com proteínas integrais, glicoproteínas de superfície e de ligação, e glicolipídeos organizada em modelo de mosaico fluido. É a estrutura mais periférica do espermatozoide e por isso, é a primeira a entrar em contato com quaisquer substâncias do meio externo a que a célula seja exposta, como os compostos do meio de congelamento e o processo de redução da temperatura. Levar uma célula a baixas temperaturas pode causar um fenômeno conhecido como “choque térmico”, que

fisiologicamente causa danos a estrutura fosfolipídica da membrana plasmática, promovendo um rearranjo dos seus constituintes e conseqüentemente alterando as funções metabólicas da célula (GRAHAM, 1996). Uma diminuição na temperatura provoca uma transição de fase termotrópica nos fosfolipídios da membrana, migrando de uma fase líquido-cristalina para uma fase de gel, o que resulta em uma estrutura de membrana mais rígida (WATSON, 2000; BALL & VO, 2001). As crioinjúrias causadas durante o processo de criopreservação podem resultar na redução de espermatozoides viáveis, com alteração na motilidade e vitalidade, inibição das ações enzimáticas promovidas pelo acrossoma e danos à integridade do DNA (WATSON, 2000). A principal causa de tais danos, é a formação de cristais de gelo (SILVA & GUERRA, 2011).

O congelamento das células ocorre entre as temperaturas de 0 a -40°C, e é nesta faixa que podem ocorrer os principais danos às células espermáticas (WOLFE & BRYANT, 2001). A célula espermática parece sensível ao estresse osmótico que é potencializado como fluxo intenso de crioprotetores, e com as alterações na concentração de soluto e solvente durante o congelamento (DONNELLY *et al.*, 2001). Os crioprotetores agem por efeito osmótico, induzindo primeiramente a saída de água para o meio extracelular e posteriormente a entrada do soluto na célula (MAHADEVAN & TROUSON, 1983). Este processo de substituição de água por crioprotetor é o fenômeno que viabiliza a criopreservação. O ponto de solidificação da água é a 0°C, enquanto o de uma solução é determinado por sua concentração de solutos (MAZUR, 1984). Proporcionalmente à cristalização da água na curva de queda de temperatura, ocorre a saturação dos solutos, tornando o meio hipertônico. Quando a célula é exposta a este tipo de solução, ela passa pelo processo chamado de desidratação a fim de equilibrar seu conteúdo com o meio hipertônico ao qual foi exposta (MAZUR, 1977).

Portanto, o processo de congelamento pode levar a uma série de danos nas organelas celulares.

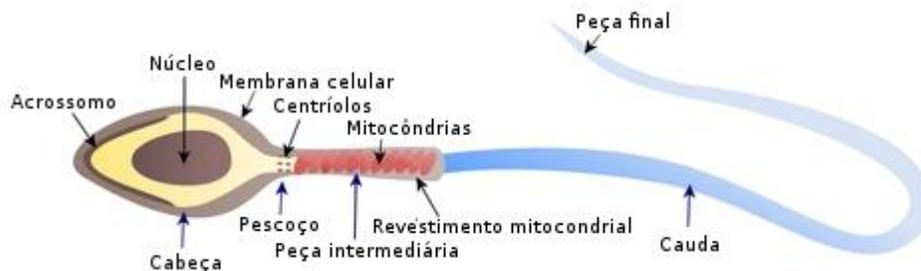


Figura 2: Esquema morfológico de um espermatozoide maduro.

Ref: <https://www.infoescola.com/reproducao/espermatozoide/>

1.5 O plasma seminal e o congelamento

As células espermáticas se encontram em uma suspensão celular líquida chamada de plasma seminal. No congelamento de espermatozoides humanos é indicado que se use o líquido seminal no procedimento. Em outras espécies é recomendado retirar o líquido seminal pois já foi provado que dependendo da espécie, o líquido seminal pode ser prejudicial ao processo de congelamento (SHIVAJI & BHARGAVA, 1987).

O plasma é composto por espermatozoides maduros e imaturos, células de defesa e secreções ejetadas pelas glândulas acessórias. As secreções responsáveis pela formação do plasma seminal, veículo que conduz os espermatozoides até o trato genital feminino, são provenientes majoritariamente da vesícula seminal seguido da próstata e glândulas bulbouretrais cada um com suas respectivas composições e funções.

As interações entre o plasma seminal e as proteínas da membrana do espermatozóide podem ser responsáveis pelas diferenças na fertilidade e na congelabilidade do sêmen e a composição protéica é um dos aspectos que interferem nestas interações (RONCOLETTA *et al.*, 2004). Em touros, estudos demonstraram que uma maior quantidade de proteínas específicas, que atuam como principal proteína ligadoras de heparina nesta espécie provavelmente forneça melhor proteção à

membrana espermática durante congelamento (PACE & GRAHAM, 1974). O tipo da proteína e se sua interferência será benéfica ou maléfica aos processos de fertilização e congelamento variam de acordo com a espécie (BAAS *et al.*, 1983; SCHMEHL *et al.*, 1986).

O plasma seminal humano contém poderosos agentes imunossupressores (STITES & ERICKSON 1975) que estão presentes para prolongar a vida dos espermatozóides e evitar a hipersensibilização feminina para as proteínas alogênicas presentes na superfície dos espermatozóides e no plasma seminal. Isso permite a função primária do plasma seminal que é sustentar os espermatozóides e aumentar as chances de fertilização.

1.6 Interações dos componentes do meio de congelamento com a célula espermática

O meio de congelamento, ou diluidor, deve interagir com o sêmen, proporcionando proteção aos diferentes compartimentos celulares durante os processos de congelamento e descongelamento. Por isso, sua constituição deve garantir nutrição, proteção e balanço eletrolítico com pH e osmolaridade em faixas fisiológicas. De acordo com Vishwanath & Shannon (2000), para um meio diluente ser completo e eficiente no processo de congelamento seminal, algumas substâncias são fundamentais na sua composição: substâncias iônicas que mantêm a osmolaridade; lipoproteínas ou material de baixo peso molecular que previnam o choque frio, como a gema de ovo ou leite; glicerol, propanodiol ou dimetilsulfoxido (DMSO) como agentes crioprotetores intracelulares e glicose ou frutose como fonte de energia.

Um meio de criopreservação adequado deve manter o potencial fertilizante das células espermáticas de modo que, ao final do processo elas sofram o mínimo de danos possível, estando aptas a concluir a capacitação e a reação acrossômica, possibilitando a fecundação de um oócito (WATSON, 1995; PENÃ, 2000). A sobrevivência dos espermatozóides no plasma seminal é limitada a poucas horas, porém, com a diluição em uma solução protetora, o resfriamento e a criopreservação mantém o sêmen viável por períodos mais longos (GRAHAM, 1996). Muitos fatores

afetam a sobrevivência dos espermatozóides, incluindo a composição dos meios diluentes e os crioprotetores usados para o congelamento (GILMORE *et al.*, 1997).

1.7 Componentes do meio de congelamento

1.7.1 Crioprotetores penetrantes - o glicerol

Os crioprotetores tem a função básica de impedir crioinjúrias na célula durante o processo de congelamento (SQUIRES *et al.*, 1999). Esses compostos que são os principais responsáveis por minimizar os danos causados pelo “choque térmico” são chamados de crioprotetores, e são classificados como penetrantes e não penetrantes (GILMORE *et al.*, 1997). Apesar dos protocolos de congelamento de sêmen humano serem definidos e utilizados há muitos anos, ainda há a necessidade de mais estudos para identificar os componentes e as suas respectivas concentrações que estão mais relacionadas com tais injúrias.

Os crioprotetores intracelulares são solventes orgânicos de baixo peso molecular que possuem a capacidade de penetrar na célula, e atuam tanto interna quanto externamente no espermatozoide, desidratando a célula espermática através do processo de osmose, que causa efluxo de água intracelular, e influxo de soluto na célula (McLAUGHLIN *et al.*, 1992). Esta categoria de crioprotetores penetra na membrana celular e tem uma porção retida na membrana, e outra atravessa para o citoplasma. Dotado desta ação, o glicerol (propano-1,2,3-triol), é muito utilizado no congelamento seminal de várias espécies como a humana, bovina, equina, suína e roedores (CASTRO *et al.*, 2011; WATSON, 2000). O glicerol também atua na membrana plasmática junto com fosfolípídeos e assim reduz o potencial de fluidez da membrana. O mecanismo de ação deste crioprotetor substitui a água intracelular ao se ligar ao hidrogênio das moléculas de água, aumentando a viscosidade da solução, e assim, conseqüentemente, reduzindo o ponto de congelamento da mesma (GAO *et al.*, 1995; PARKS & GRAHAM, 1992). Estas ligações mudam a orientação da molécula da água nos cristais de gelo, criando um ambiente menos nocivo para as células (DALIMATA & GRAHAM, 1997).

1.7.2 Crioprotetores não penetrantes - a gema de ovo

A gema de ovos de galinha é um composto rico em lipoproteínas de baixa densidade, que tem papel importante na membrana dos espermatozoides, agindo como uma camada bioprotetora contra os danos do congelamento (NEVES & HENRY, 2012). A membrana plasmática espermática é sensível a este processo, e os componentes da gema do ovo atuam principalmente em sua proteção, diminuindo os danos causados pela concentração de substâncias tóxicas e pela curva de resfriamento (NEVES & HENRY, 2012).

A composição da gema do ovo é bastante variável e pode ter diferentes composições de acordo com as práticas de manejo alimentar utilizadas na criação das aves, uma vez que é um composto de origem animal (PHILLIPS & LARDY, 1940). Segundo autores, espera-se que a gema do ovo seja composta majoritariamente por 68% de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), 16% de lipoproteínas de alta densidade (HDL), 10% de livetinas e 4% de fosvitinas, localizadas em duas frações, os grânulos e o plasma (ANTON & GANDEMER, 1997; JOLIVET *et al.*, 2006). Os grânulos são estruturas microscópicas, irregulares e insolúveis na gema e facilmente separados do plasma por centrifugação. São constituídos de 70% de lipovitelinas, que correspondem às lipoproteínas de alta densidade, 16% de fosvitinas e 12% de LDL. Muitos estudos têm demonstrado que as LDL são as grandes responsáveis pela resistência ao choque térmico, por preservarem a motilidade e a integridade do DNA nuclear e das membranas espermáticas (MANJUNATH *et al.*, 2002; MOUSSA *et al.*, 2002). A alta capacidade de proteção oferecida pelas lipoproteínas de baixa densidade pode ser explicada pela sua composição. Enquanto as lipoproteínas de alta densidade possuem 80% de proteínas na sua constituição contra 20% de lipídeos, as lipoproteínas de baixa densidade são compostas por cerca de 11-17% de proteínas e 89% de lipídeos, sendo estes divididos em triacilglicerol (69%), fosfolipídeos (27%), colesterol e ésteres de colesterol (4%) (ANTON & GANDEMER, 1997; SOUZA *et al.*, 2007).

Apesar dos mecanismos de proteção conferidos pela gema de ovo não estarem totalmente elucidados, ao estudar o papel das LDL sobre espermatozoides ovinos resfriados a 5°C, Watson (1981) verificou que ocorre uma forte ligação entre a membrana espermática e estas lipoproteínas a partir de seus componentes proteicos. Um estudo

posterior, afirmou que estas ligações são tão fortes que podem resistir a mais de dez processos de lavagem (COOKSON *et al.*, 1984). Segundo Holt & North (1988), a gema de ovo evitou o dobramento de caudas e conservou a motilidade dos espermatozóides. Posteriormente, foi constatado que as células espermáticas congeladas em meios diluidores sem gema perdem moléculas de colesterol e fosfolipídios, em resposta ao choque térmico (PARKS *et al.*, 1981). A proteção conferida pelos lipídeos com relação ao choque térmico parece estar relacionada à quelação do íon cálcio do meio, evitando sua entrada no espermatozóide (WATSON, 1981). É possível que os lipossomas interajam com o cálcio e outros componentes do meio de congelamento afetem a tonicidade ou a fração da água não congelada durante a criopreservação (WILHELM *et al.*, 1996). Neste processo, a gema como um todo, e principalmente as LDL agem protegendo os espermatozoides ao doarem lipídeos para a membrana plasmática, contribuindo para a não alteração da razão colesterol/fosfolipídeos. A ligação entre a fração de LDL com a membrana espermática, via ligação proteica, foi observada por Vishwanath e colaboradores (1992). Este estudo afirma que a proteção contra o choque térmico está altamente relacionada à concentração de lipídeos na molécula de LDL, tornando sua presença nos meios de congelamento um fator determinante.

Segundo Holt & North (1988), a presença da gema de ovo no processo de congelamento evitou o dobramento de caudas e conservou a motilidade dos espermatozóides após aquecimento.

Mesmo com todas as descobertas conquistadas pela literatura sobre os mecanismos de proteção da gema de ovo no processo de criopreservação de sêmen humano, ainda não foi possível descobrir, isolar e reunir todos os fatores responsáveis pelo sucesso do meio com gema, numa formulação totalmente sintética, ou seja, livre de compostos animais. Fazer uso de um composto quimicamente não definido e de origem animal, ainda que ofereça o melhor resultado no processo proposto, pode oferecer risco de contaminação à amostra exposta ao meio, e conseqüentemente ao paciente (BOUSSEAU *et al.*, 1998). Com foco nesta problemática dos meios a base de gema de ovos, formulações livres desse componente têm sido estudadas e algumas já são comercializadas. Muitos laboratórios de pesquisa básica têm se dedicado a esta área como, por exemplo, a pesquisa realizada pela USP na descoberta da fosfatidilcolina no

lugar da gema, a pesquisa realizada pelo Centro de Medicina Reprodutiva do Novo México com o uso da leptina de soja (REED *et al.*, 2009), como fonte de LDL e a pesquisa realizada no nordeste brasileiro com o uso de água de coco como protetor de membrana (BARROS & TONIOLLI, 2011). Os meios comerciais livres de compostos animais indefinidos descrevem o crioprotetor não penetrante de seus meios como “lipídeos quimicamente definidos”.

1.7.3 Tampões, sais, substratos energéticos, antibióticos

Além dos crioprotetores, outras substâncias devem essencialmente estar presentes na composição dos meios de congelamento seminal para que a técnica atinja o sucesso esperado. As soluções tampão tem como função em qualquer meio veicular os solutos e manter o pH da solução. O pH deve variar muito pouco quando pequenas quantidades de íons H_3O^+ e OH^- são adicionadas a ela. Em geral, os tampões são constituídos por quantidades aproximadamente iguais de um ácido fraco e sua base conjugada (SQUIRES *et al.*, 1999; HOLT, 2000a). O TRIS (Tri-hidroxi-metil-aminometano) é uma substância facilmente solúvel que atua como tampão iônico em pH básico e na célula espermática, reduz o metabolismo da frutose (quando este composto está presente) contribuindo para a preservação do gasto energético (FOOTE *et al.*, 2002).

Os aminoácidos são a principal fonte de energia para a célula. Os açúcares em geral, podem conferir proteção à membrana do espermatozoide pela sua capacidade de interagir diretamente com ela por pontes de hidrogênio construídas pelo grupo hidroxil dos açúcares com o grupamento fosfato que se encontra na cabeça dos fosfolipídeos da célula (SILVA & GUERRA, 2011).

O sal tem um importante papel na regulação do potencial de membrana e no balanço osmótico. A proteção conferida pelos lipídeos à membrana do espermatozoide contra o choque térmico já foi descrita estar relacionada à quelação de íons cálcio do meio (GAO *et al.*, 1993). Sabe-se que o cálcio é um dos principais moduladores dos processos de capacitação e reação acrossomal que ocorrem fisiologicamente.

Os antibióticos agem minimizando as chances de contaminação do meio. Os frascos contendo a solução serão abertos por várias vezes e esse procedimento quando

repetido, aumenta o risco de contaminação. É comum a associação de dois antibióticos distintos para potencializar sua atividade (SQUIRES *et al.*, 1999).

1.8 Formulações disponíveis

Os principais meios comerciais disponíveis no mercado, e os meios descritos na literatura são formulados basicamente pelos componentes descritos anteriormente.

O meio mais usado para o congelamento de sêmen humano é o *Test-Yolk-Buffer* (TYB).

O meio TYB contém em sua formulação a gema de ovo inativada, o glicerol, frutose, citrato de sódio, e os tampões TES e TRIS. Na literatura alguns trabalhos apresentam versões bem-sucedidas do TYB e dentre elas, o trabalho de Prins e Weidel (1986) se destaca. Os autores confeccionaram 8 diferentes formulações de meio de congelamento na qual testou fórmulas com e sem glicerol, com gema de ovos ou com leite, e outras composições, e testaram sua eficiência. Das 8 diferentes formulações de meio testadas, as 2 formulações TYB apresentaram a melhor recuperação de espermatozoides móveis no aquecimento. Eles também identificaram que a proporção dos constituintes do TYB não interferiram significativamente no resultado final, porém a fórmula chamada pelos autores de TEST-C-I contendo glicerol, citrato gema de ovo, frutose e tampão obteve os melhores resultados pós aquecimento.

Há apenas duas empresas que comercializam o TYB no Brasil, sendo uma internacional e uma nacional que inseriu seu produto recentemente no mercado. O TYB importado é produzido pela marca Irvine Scientific e este, é amplamente utilizado pelas clínicas de RA do país. O meio nacional é produzido e distribuído pela empresa Ingámed, e tem obtido boa aceitação no mercado por apresentar valor mais acessível e facilidade de transporte.

Antes da empresa Ingámed lançar seu TYB no mercado nacional da RHA, as clínicas brasileiras estavam limitadas aos meios importados. São muitas as implicações negativas quando materiais perecíveis importados são incluídos na rotina laboratorial. Custos elevados destes produtos muitas vezes são fator limitante na hora da compra por laboratórios de pequeno porte. O curto prazo de validade dos meios diminui o intervalo

da compra, o que aumenta ainda mais o gasto com o processo. O longo trajeto que o material importado percorre durante o transporte do seu local de origem até o destino aumenta a probabilidade de não conformidades. Maiores chances de alterações físicas ou de temperatura ou ainda ficar preso na alfândega do país de destino são riscos reais que a importação de produtos perecíveis oferece, e que devem ser sempre calculados pela equipe laboratorial. O uso de um meio nacional que ofereça resultados semelhantes aos encontrados com os meios importados, sem dúvidas, proporciona ao embriologista maior segurança nos pontos acima mencionados.

Muitos esforços têm sido empregados na pesquisa de uma formulação que seja livre da gema de ovo ou de qualquer outro componente de origem animal, e que forneça resultados similares aos obtidos com o TYB. Devido o mecanismo de proteção conferido pela gema do ovo de galinha não ser totalmente claro, a descoberta da formulação ideal sem este componente se torna algo complexo (WATSON, 2000). Duas empresas estrangeiras iniciaram a comercialização no Brasil de meios “gema-free”, que são a Life Global e a Vitrolife. Estes meios foram colocados a disposição há pouco tempo no mercado da RA, e sua aceitação por parte dos embriologistas tem sido limitada devido ao alto custo e aos resultados inferiores. A empresa Irvine Scientific também possui uma formulação “gema-free” chamada “Artic-Sperm criopreservation medium” comercializada fora do Brasil e que está em processo inicial de importação para inserção no mercado nacional. A empresa nacional Ingámed recentemente lançou (2018) uma formulação “gema-free” que já está liberada para comercialização, porém a clínica prática ainda não tem resultados de seu desempenho.

A composição base anunciada pelos fabricantes dos meios TYB e gema-free estão descritas na tabela 1 e 2. Alguns fornecedores descrevem também a proporção dos componentes de suas formulações. Outros, apenas citam quais componentes fazem parte de sua formulação.

Tabela 1: Relação dos componentes fornecida pelos fabricantes dos meios contendo gema de ovos, TYBs.

FORMULAÇÕES DOS MEIOS TYB	
Irvine Scientific	Ingamed
Tampão TES	Tampão TES
Tampão TRIS	Tampão TRIS
Citrato de sódio 30%	Citrato de sódio
Frutose 2%	Frutose
Gema de ovos 20%	Gema de ovos 20%
Glicerol 12%	Glicerol 12%
Sulfato de gentamicina 10ug/ml	Sulfato de gentamicina 1g/l

Todos os fabricantes de meio de congelamento seminal, sejam eles TYBs ou gema-free, atestam garantia de pelo menos 70% de recuperação no aquecimento (Irvine Scientific, Ingamed, Life Global).

Ainda que as empresas que fornecem os meios atestem a taxa de recuperação de 70%, não são estes os resultados encontrados na clínica prática. Os fatores de infertilidade e principalmente a qualidade seminal parecem interferir diretamente no resultado da recuperação dos espermatozoides após congelamento/aquecimento. Isso reforça a necessidade de pesquisa continuada em novas formulações de meio de criopreservação seminal e novas técnicas de congelamento e envase.

Tabela 2: Relação dos componentes fornecida pelos fabricantes dos meios “gema-free”. As empresas não fornecem a quantidade específica de cada substrato e também não especifica alguns componentes.

FORMULAÇÕES DOS MEIOS GEMA-FREE			
Life Global	Vitrolife	IrvineScientific	Ingámed
HEPES	Bicarbonato de sódio e MOPS	HEPES + MOPS	Bicabornato de Sódio MOPS
Glicerol	Glicerol	Glicerol 28%	Glicerol
Sacarose	Glicose e sacarose	Sacarose	Frutose
Glicina	Glicina	Glicina	Piruvato de Sódio
HSA	HSA	HSA	HSA
Lactado de sódio	Lactato de sódioCloreto de cálcio	Lactato de sódio	Lactato de SódioCloreto de Cálcio
Dextrose monohidratada	Lipídeos quimicamente definidos	Pluronic F-68	Mistura Lipídica
Sais fisiológicos	Cloreto de potássio	Cloreto de potássio	Cloreto de Sódio
-	Água para injetáveis	Antioxidantes	Água de injeção
-	Cloreto de magnésio	Hipotaurina	EDTA
-	Gentamicina	Piruvato de sódio	Sulfato de gentamicina
-	Hidroxido de sódio	Alanilglutamina	Fosfato Monossodico
-	Citrato de sódio	Glicose	Glicose
-	Fosfato Dihidrogenado de sódio	-	-

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

2.1.1 Experimento 1:

- Comparar o desempenho dos meios de congelamento seminal disponíveis comercialmente e mais usados no banco de sêmen da clínica Androlab;

2.1.2 Experimento 2:

- Produzir o meio TYB-UFRJ *in house* com base na formulação TEST-C-I descrita primeiramente por Prins & Weidel, 1986;
- Testar a eficiência do TYB-UFRJ e comparar seus resultados com os resultados obtidos no TYB comercial.

2.2 **Objetivos específicos**

2.2.1 Experimento 1:

- Avaliar a recuperação da motilidade e vitalidade após criopreservação nos meios comerciais TYB-Irvine, TYB-Ingámed e Global gema-free.
- Definir o meio comercial que oferece maiores taxas de recuperação de motilidade e vitalidade como meio padrão do banco de sêmen da clínica Androlab.

2.2.2 Experimento 2:

- Avaliar a eficiência do meio TYB-UFRJ através da análise da recuperação da motilidade e vitalidade após o processo de congelamento em diferentes protocolos de tempo.
- Avaliar se há diferença significativa na recuperação da motilidade e vitalidade após criopreservação no meio comercial controle TYB-Ingámed e o no meio TYB-UFRJ, ambos nacionais e a base de gema de ovos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 **Desenho experimental**

3.1.1 Experimento 1

Este estudo foi aprovado em 24/04/2015 pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) sob o parecer substanciado número 43973515.1.0000.0120.

O objetivo deste experimento foi comparar três meios comerciais utilizados no banco de sêmen da clínica Androlab e apontar o meio com a melhor recuperação de espermatozoides móveis após aquecimento independente da composição ser com gema

ou gema-free. Um total de 23 amostras de sêmen dentro dos critérios de seleção descritos no presente estudo foram criopreservadas nos meios comerciais:

1. IRVINE - “Freezing Medium - Test Yolk Buffer with Glycerol and Gentamicin”.
2. INGÁMED - “Ingá Sperm Freezing”.
3. LIFE GLOBAL - “Sperm Freezing” gema-free.

Os meios Ingámed e Irvine são baseados na formulação TYB e contém gema de ovo. A partir de cada amostra, depois de realizadas as análises de concentração, motilidade e vitalidade, foram separadas três alíquotas de 0,3mL e colocados em tubos cônicos previamente identificados com o número da amostra e o meio de criopreservação. Logo em seguida, foi adicionada lentamente, a quantidade de crioprotetor indicada pelo fabricante em cada um dos tubos (figura 4). De acordo com o protocolo de congelamento de cada meio comercial, uma palheta de 0,5mL para cada um dos meios foi criopreservada. As amostras criopreservadas foram descongeladas e analisadas imediatamente após o descongelamento.

3.1.2 Experimento 2

O objetivo do segundo experimento foi comparar o meio TYB (PRINS & WEIDEL, 1986), produzido na UFRJ com o meio comercial nacional “Ingá Sperm Freezing”. A recuperação dos espermatozoides móveis no aquecimento de amostras congeladas foi avaliada. Por ser um meio nacional e ter apresentado melhores resultados no experimento 1, o meio Ingámed foi escolhido como controle nesta etapa do projeto. Um total de 5 amostras de sêmen dentro dos critérios de seleção descritos no presente estudo foram submetidas ao processo de congelamento com o TYB Ingámed e com o TYB-UFRJ. Após as análises iniciais de concentração, motilidade e vitalidade (tabela 3), foram separadas alíquotas de 0,3mL a partir de cada amostra e colocados em tubos cônicos previamente identificados com o número da amostra e o meio de criopreservação (figura 5). O protocolo de congelamento do meio TYB-UFRJ seguiu a mesma orientação do meio Ingámed. As amostras criopreservadas foram descongeladas e imediatamente analisadas.

3.2 Amostras

3.2.1 Número de amostras

3.2.1.1 *Experimento 1:*

Foram incluídas 18 amostras de homens saudáveis, e 5 amostras de homens com alterações nos padrões espermáticos.

3.2.1.2 *Experimento 2:*

Foram incluídas 5 amostras de homens saudáveis, sem alterações espermáticas comprovadas por espermograma.

3.2.2 Seleção das amostras

3.2.2.1 *Critérios de inclusão e exclusão*

Foram utilizadas amostras seminais coletadas a partir de pacientes que realizaram espermogramas na clínica Androlab em Curitiba- PR com idade entre 18 e 50 anos que naturalmente seriam descartadas após a realização do exame.

Foram incluídas amostras de pacientes que foram encaminhados para a realização do exame de espermograma com apresentação de indicação clínica. Não foram incluídos pacientes com pedidos que indicavam confirmação de azoospermia por vasectomia. Também foram excluídos do estudo pacientes com sorologias prévias positivas, e com cultura para fungos e bactérias positivas.

Para este estudo foram utilizadas amostras com os parâmetros de concentração espermática normais (normozoospermicas) e amostras com valores de concentração e motilidade abaixo dos valores de referência fornecido pela OMS (oligoastenozoospermicas). Todas independente da classificação, foram congeladas seguindo os mesmos protocolos.

3.2.3 Coleta das amostras

As amostras foram obtidas na sala de coleta da clínica. Os pacientes foram encaminhados para esta sala e as informações sobre finalidade e metodologia do estudo foram explicadas seguidas da assinatura de autorização via termo de consentimento. Instruções sobre como a coleta deveria ser realizada também foram fornecidas. Foi solicitada a coleta do sêmen por masturbação, sem uso de preservativos ou lubrificantes.

Foram realizados dois experimentos, o primeiro com um total de 23 amostras e o segundo com 5 amostras diferentes.

As amostras foram transportadas para o laboratório e colocadas em placa aquecida a 35°C para aguardar a liquefação. Após 30 min um volume de 1 mL de sêmen foi retirado de cada amostra dos pacientes e foram realizadas as análises microscópicas pré-congelamento. Sob a câmara de Makler (20X) e microscópio de luz (Nikon Eclipse E 200) foi analisada a concentração de espermatozoides por mL e classificados os graus de motilidade seguindo o critério do manual da OMS de 2010. Segundo o WHO (2010), a motilidade espermática deve ser classificada em:

- A (espermatozoide móvel progressivo);
- B (espermatozoide móvel não progressivo);
- C (espermatozoide imóvel).

De acordo com os padrões estabelecidos pelo WHO (2010) o valor de referência para motilidade é de 32% de espermatozoides móveis progressivos e 40% de espermatozoides móveis totais e concentração e vitalidade são de 15.000.000/ml e 58% respectivamente. A vitalidade espermática foi analisada pelo método de coloração com eosina, na proporção 1:1 eosina/sêmen e classificada sob lâmina e lamínula no aumento de 40X. Este método de coloração identifica espermatozoides corados como mortos, e não corados como vivos.

3.3 Produção do meio TYB-UFRJ

A produção da formulação do TYB-UFRJ seguiu o protocolo estabelecido por Prins e Weidel (1986) no qual foi usado como base a combinação dos tampões TES+TRIS (Tris-HCl 50 mmol/L pH 8,0; EDTA 20 mmol/L pH 8,0;.NaCl 200 mmol/L - Sigma T3758) em pH 7,3 e osmolaridade de 325mOm. A osmolaridade foi medida no osmômetro (modelo Osmete A) . Soluções de citrato de sódio (Sigma S4641) e frutose (Sigma F0127) na osmolaridade de 325mOm e pH de 7,3 também foram preparadas. As gemas foram obtidas de ovos de galinha nos quais foram separadas das claras. A película que recobre a gema foi retirada e seu conteúdo medido em uma proveta.

A solução de congelamento final ficou composta por 30% da solução de citrato de sódio, 2% da solução de frutose, 20% gema de ovo, 48% da solução tampão TES+TRIS

(Sigma P7794). Esta solução foi homogeneizada e centrifugada a 10.000 X g por 10 minutos e o sobrenadante foi separado e filtrado em membrana de 0,22 μ . Por fim, foi realizada a adição de 6% de glicerol. O meio permaneceu congelado a -20°C.

3.4 Análises

3.4.1 Concentração

Para analisar a concentração espermática pré-congelamento, 10 μ l de sêmen *in natura* após 30 minutos de liquefação, foram adicionados na câmara de makler e analisados sob microscópio (Nikon Eclipse E 200) em aumento de 20X. Foram contabilizados todos os espermatozoides presentes nos 100 quadrados da makler e o número encontrado multiplicado por 100.000. Este cálculo fornece a concentração de espermatozoides por mililitro (figura 3).



Figura 3: Desenho da disposição dos espermatozoides na câmara de makler. O número de espermatozoides encontrado nos 100 quadrados, deve ser multiplicado por 100.000 e este será o resultado da quantidade de espermatozoides por mililitro de sêmen. REF: <https://www.crh.com.br/crh.asp?pasta=33&livro=1&txt=3>

3.4.2 Motilidade

A motilidade dos espermatozoides foi classificada em A (móvel progressivo), B (móvel não progressivo) e C (imóvel), seguindo critério sugerido pelo manual WHO de 2010. A porcentagem de espermatozoides A B e C foi feita a partir da concentração de cada tipo de espermatozoide encontrado durante a contagem da concentração (para A:

número de espermatozoides móveis progressivos/número de espermatozoides totais x 100; para B: número de espermatozoides móveis não progressivos/número de espermatozoides totais x 100; para C: número de espermatozoides imóveis/número de espermatozoides totais x 100). Esta análise foi realizada na câmara de makler sob microscópio (Nikon Eclipse E 200) em aumento de 20X num volume de 10µl de amostra.

3.4.3 Vitalidade

A vitalidade espermática foi analisada usando a coloração dos espermatozoides com eosina. Na proporção 1:1 o corante eosina foi incorporado a 10µl de sêmen sob lâmina e lamínula e imediatamente levado ao microscópio óptico modelo Nikon Eclipse E 200 em aumento de 40X. Foram contabilizados um total de 200 espermatozoides corados e não corados em cada amostra e a partir deste valor, a taxa de vitalidade foi extraída (número de espermatozoides não corados / total de espermatozoides contabilizados x 100).

3.4.4 Taxa de recuperação

O cálculo de recuperação espermática foi realizado a partir dos percentuais encontrados antes e depois do congelamento (NALLELA *et al.*, 2004). O quanto foi recuperado do parâmetro observado após congelamento dividido pelo observado antes do congelamento para os parâmetros motilidade progressiva, motilidade total e vitalidade. (% final/% inicial * 100).

3.5 **Congelamento do sêmen**

3.5.1 Meio Irvine Scientific

Vagarosamente, o meio de congelamento TYB Irvine foi adicionado à 0,3mL de sêmen na proporção 1:1 como indicado pelo laboratório e deixado à temperatura ambiente (TA) por 10 minutos no tubo cônico. Em seguida, o volume de 0,5mL da solução de congelamento (meio + sêmen) foi envasado em palheta de congelamento com auxílio de uma seringa e na sequência as palhetas foram seladas e expostas ao vapor de N₂

líquido por 15 minutos a uma altura de 10 centímetros acima da lâmina de N₂ líquido e após este período foram imediatamente imersas (Figura 4).

3.5.2 Meio Life Global

Vagarosamente, o meio de congelamento gema-free da Global foi adicionado à 0,3 mL de sêmen na proporção 1:0,7 sêmen / meio, indicada pelo laboratório e deixado à TA por **15 minutos** em tubo cônico. Em seguida, 0,5mL da solução de congelamento foi envasada em palheta de congelamento com auxílio de uma seringa e na sequência, as palhetas foram seladas e expostas ao vapor de N₂ líquido por 15 minutos a uma altura de 10 centímetros acima da lâmina de N₂ líquido e após este período foram imediatamente imersas (figura 4).

3.5.3 Meio Ingámed

Vagarosamente, o meio de congelamento TYB Ingámed foi adicionado à 0,3mL de sêmen na proporção 1:1 indicada pelo laboratório e deixado à TA por **10 minutos** em tubo cônico. Em seguida, 0,5mL da solução de congelamento foi envasada em palheta de congelamento com auxílio de uma seringa e na sequência, as palhetas foram seladas e expostas ao vapor de N₂ líquido por 15 minutos a uma altura de 10 centímetros acima da lâmina de N₂ líquido e após este período foram imediatamente imersas (figuras 4 e 5).

3.5.4 Meio TYB-UFRJ

Vagarosamente, o meio TYB-UFRJ foi adicionado à 0,3mL de sêmen na proporção 1:1 e deixado à TA por **10 minutos** para equilíbrio osmótico. Em seguida, 0,5mL da solução de congelamento foi envasada em palheta de congelamento com o auxílio de uma seringa e na sequência, as palhetas foram seladas e expostas ao vapor de N₂ líquido por 15 minutos a uma altura de 10 centímetros acima da lâmina de N₂ líquido e após este período foram imediatamente imersas (figura 5).

Sequência de Congelamento – Experimento 1

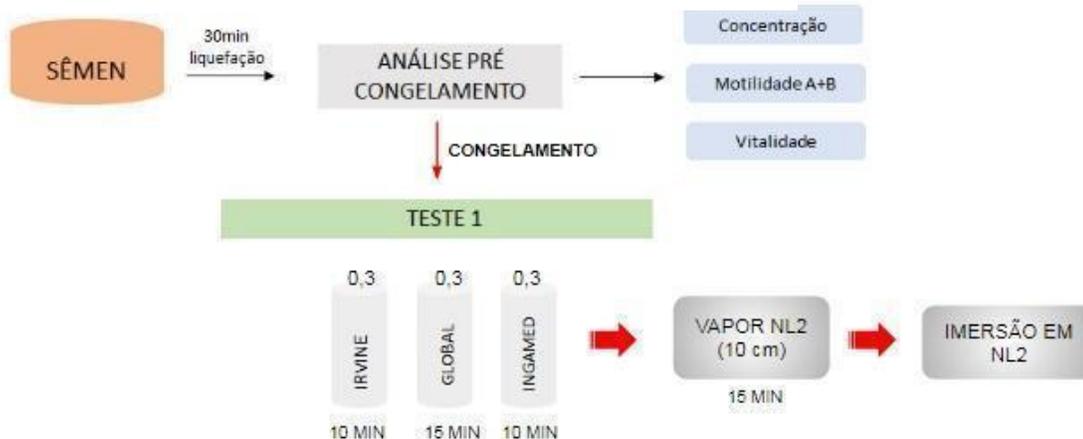


Figura 4: Sequência de eventos do congelamento no experimento 1. As amostras foram avaliadas quanto a concentração, motilidade e vitalidade e dividida em três tratamentos com meios de congelamento Irvine, Global e Ingamed. Após tempo de ação de cada meio, as palhetas preenchidas foram expostas ao vapor de N₂ líquido por 15 minutos e posteriormente imersas em N₂ líquido.

Sequência de congelamento – Experimento 2

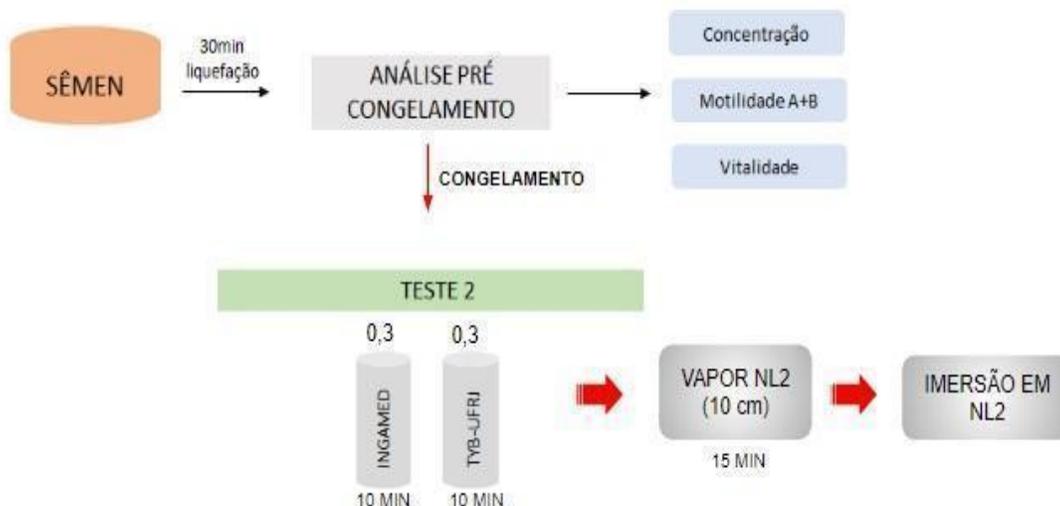


Figura 5: Sequência de passos que o congelamento do experimento 2. O sêmen passou por liquefação de 30 minutos e em seguida foi analisado quanto a concentração motilidade e vitalidade. Em seguida alíquotas de 0,3mL foram separadas e os meios de congelamento foram adicionados. As palhetas foram expostas ao vapor de N₂ líquido e em seguida imersas em N₂ líquido.

3.6 Descongelamento do sêmen

3.6.1 Meio Irvine Scientific

Uma a uma, as palhetas criopreservadas foram retiradas do N₂ líquido e colocadas sobre uma gaze estéril a TA até que o descongelamento total fosse observado. Em seguida, elas foram desenvasadas em tubo cônico de 15 mL e uma alíquota de 10µl foi imediatamente analisada na câmara de makler em aumento de 20X no microscópio (Nikon Eclipse E 200). A recuperação da motilidade dos espermatozoides foi registrada. A solução de congelamento passou por uma lavagem na proporção 1:2 com meio tamponado com HEPES MHM Irvine Scientific + 10% HSA, a 1600 rpm. As amostras foram ressuspensas em 0,5 mL de meio tamponado e submetidas à leitura da vitalidade pós aquecimento (figura 6). Na proporção 1:1 10µl de eosina foram adicionados aos espermatozoides lavados sob lâmina lamínula.

3.6.2 Meio Ingámed

As palhetas criopreservadas foram retiradas do N₂ líquido e colocadas sobre uma gaze estéril à TA por 30 minutos seguindo orientações do fabricante. Em seguida, elas foram desenvasadas em tubo cônico e uma alíquota de 10µl foi analisada na câmara de makler em aumento de 20X no microscópio óptico modelo Nikon Eclipse E 200. A recuperação imediata dos espermatozoides móveis foi registrada. A solução de congelamento passou por uma lavagem na proporção 1:2 com meio tamponado com HEPES MHM Irvine Scientific + 10% HSA, a 1600 rpm. As amostras foram ressuspensas em 0,5 mL de meio tamponado e submetidas a uma nova leitura da vitalidade pós aquecimento. Na proporção 1:1 10µl de eosina foram adicionados aos espermatozoides lavados sob lâmina lamínula (figuras 6 e 7).

3.6.3 Meio Life Global

As palhetas criopreservadas foram retiradas do N₂ líquido e colocadas dentro de um tubo cônico preenchido com água à TA por 5 minutos seguindo orientações do fabricante. Em seguida, elas foram desenvasadas em tubo cônico e uma alíquota de 10µl foi analisada na câmara de makler em aumento de 20X no microscópio (Nikon Eclipse E 200). A recuperação imediata dos espermatozoides móveis foi registrada. A solução de

congelamento passou por uma lavagem na proporção 1:2 com meio tamponado com HEPES MHM Irvine Scientific + 10% HSA, a 1600 rpm. As amostras foram ressuspensas em 0,5 mL de meio tamponado e submetidas a uma nova leitura da vitalidade pós aquecimento. Na proporção 1:1 10µl de eosina foram adicionados aos espermatozoides lavados sob lâmina lamínula (figura 6).

3.6.4 Meio TYB-UFRJ

As palhetas criopreservadas foram retiradas do N₂ líquido e colocadas sobre uma gaze estéril à TA. Em seguida, após visualizado o descongelamento total da palheta, foram desensvasadas em tubo cônico e uma alíquota de 10µl foi analisada na câmara de makler em aumento de 20X no microscópio óptico modelo Nikon. A recuperação dos espermatozoides móveis foi registrada imediatamente após o descongelamento total da palheta (5 minutos) e continuamente após 15, 20 e 30 minutos da retirada do N₂ líquido. A solução de congelamento passou por uma lavagem na proporção 1:2 com meio tamponado com HEPES MHM Irvine Scientific + 10% HSA, a 1600 rpm. As amostras foram ressuspensas em 0,5 mL de meio tamponado e 30 minutos após, submetidas a uma nova leitura da motilidade na makler. A vitalidade foi analisada a partir da amostra após lavagem (figura 7).

Sequência de descongelamento – Experimento 1

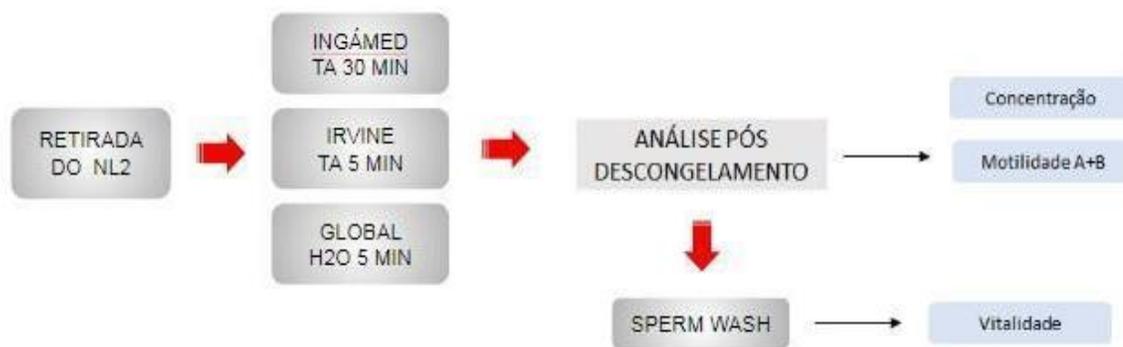


Figura 6: Sequência de eventos que o descongelamento do experimento 1. As palhetas foram retiradas uma a uma do N₂ líquido respeitando o protocolo de cada meio de congelamento. Em seguida a análise de recuperação de concentração e motilidade foram realizadas. A solução de congelamento foi lavada e a vitalidade foi analisada. TA significa temperatura ambiente.

Sequência de descongelamento – Experimento 2

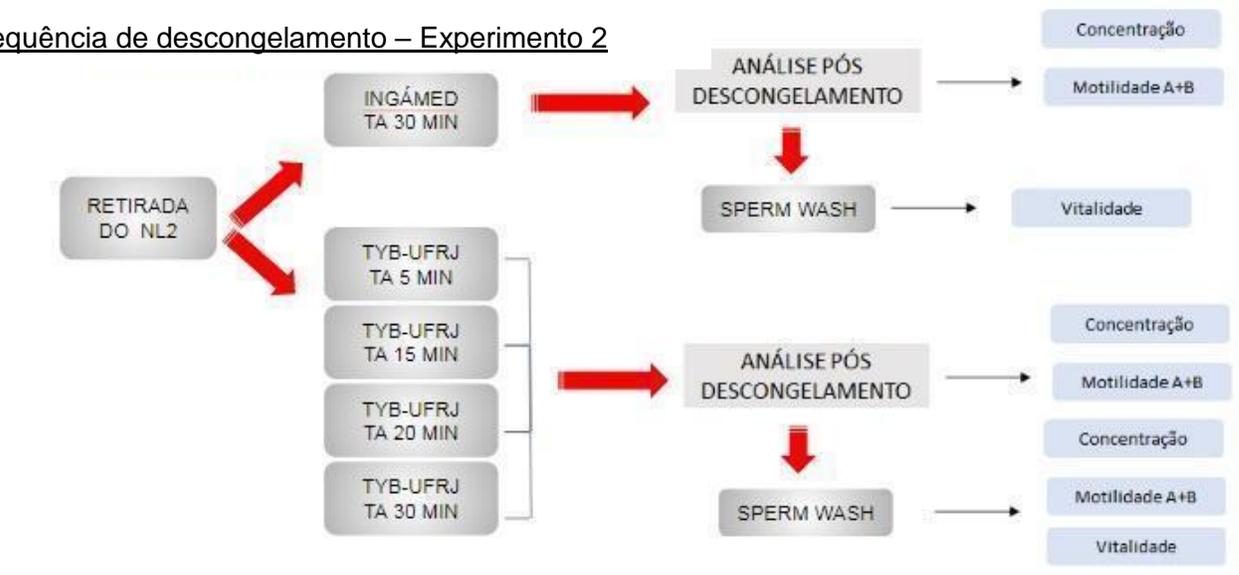


Figura 7: Sequência de eventos no descongelamento do experimento 2. Ingámed: As palhetas foram uma a uma retiradas no N₂ líquido e a motilidade foi registrada. Após as leituras a solução de congelamento foi lavada e a vitalidade registrada. TYB-UFRJ: As palhetas foram retiradas no N₂ líquido e analisadas quanto a motilidade 5 minutos, 15 minutos, 20 minutos e 20 minutos depois de retiradas do N₂ líquido. Após leituras a solução de congelamento foi lavada e a motilidade, concentração e vitalidade foram registradas.

3.7 Análise estatística

Para avaliação das diferenças entre os grupos os dados foram primeiramente comparados por análise de variância ANOVA. Quando diferenças com $P < 0,05$ foram identificadas, o teste de Fischer foi utilizado para evidenciar as diferenças entre os grupos. As amostras foram normalizadas através do teste de Kolmogorov - Smirnov. Os dados foram expressos em médias \pm erro padrão.

4. RESULTADOS

4.1 Experimento 1

4.1.1 Análise pré-congelamento

As amostras normozoospermicas apresentaram motilidade progressiva média de $40,0 \pm 2,3\%$, motilidade não-progressiva de $25,8 \pm 1,1\%$ e vitalidade de $81,8 \pm 2,6$. Já as amostras oligoastenozoospermicas apresentaram motilidade progressiva média de $13,4 \pm 2,5\%$, motilidade não progressiva $10,6 \pm 1,8\%$, e vitalidade de $67,0 \pm 6,9\%$ (tabela 3).

Tabela 3. Avaliação da motilidade progressiva (MP), motilidade não-progressiva (B), e vitalidade das amostras do experimento 1 antes de serem submetidas ao congelamento.

	NORMO ZOOSPÉRMICAS (n=18)	OLIGOASTENO ZOOSPÉRMICAS (n=5)
A	40,0 ± 2,3%	13,4 ± 2,5%
B	25,8 ± 1,1%	10,6 ± 1,8%
VIT	81,8 ± 2,6%	67,0 ± 6,9%

A: percentual de espermatozoides móveis progressivos; B: percentual de espermatozoides não-progressivos; VIT:percentual de espermatozoides vivos. Os valores estão expressos em médias. * P<0,05 na comparação entre os meios.

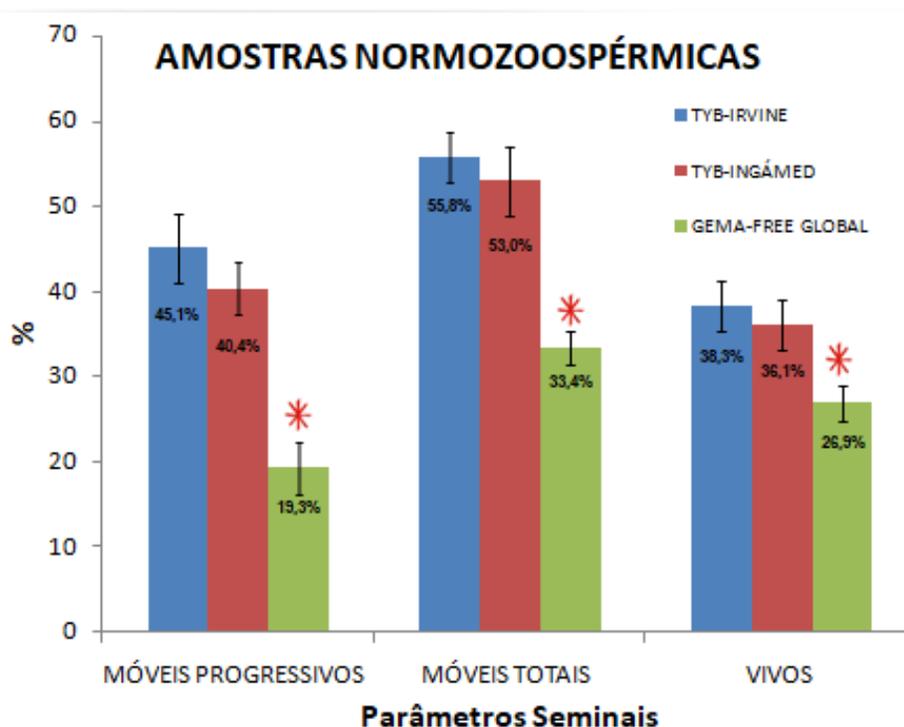
4.1.2 Taxa de recuperação após descongelamento

Nas amostras normozoopérmicas, o meio Global apresentou uma menor taxa de recuperação média da motilidade progressiva (P<0,05) quando comparado aos meios Irvine e Ingamed (45,1±3,62%, 40,4±3,32% e 19,3±2,92% para Irvine, Ingamed e Global, respectivamente). Não houve diferença entre os meios Irvine e Ingamed (figura 8).

Da mesma forma, houve uma redução na taxa de recuperação da motilidade total no meio Global comparado aos Irvine e Ingamed (55,8±3,01 %, 53,0±4,21% e 33,4±2,62% para Irvine, Ingamed e Global, respectivamente). Entre os meios Irvine e Ingamed não houve diferença (figura 8).

A taxa de recuperação da vitalidade encontrada após aquecimento no meio Global também foi menor que a encontrada nos meios Irvine e Ingamed (38,3±2,83%, 36,1±2,24% e 26,9±1,74% para Irvine, Ingamed e Global, respectivamente). Não houve diferenças na vitalidade entre os meios Irvine e Ingamed (figura 8).

Figura 8. **Gráfico** representando a **taxa** de recuperação das motilidades progressiva, total e vitalidade após congelamento/aquecimento de amostras **normozoospermicas** nos meios Irvine, Ingámed e Global utilizados no **experimento 1**.



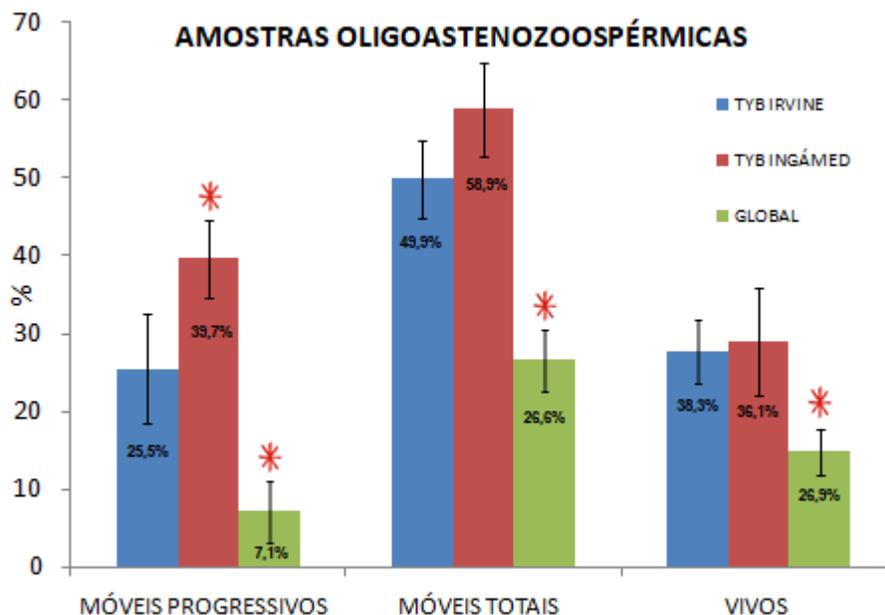
Os valores estão expressos em médias percentuais. * $P < 0,05$ na comparação entre os meios.

Já nas amostras de pacientes com oligoastenozoospermia, o meio Ingamed apresentou maior ($P < 0,05$) recuperação da motilidade progressiva que os meios Irvine e Global ($25,5 \pm 7,11\%$, $39,7 \pm 16,00\%$ e $7,1 \pm 4,02\%$ para Irvine, Ingamed e Global, respectivamente). Houve diferença estatística entre os meios Irvine e Global (figura 9).

Apesar da motilidade progressiva ter sido maior no meio Ingamed para as amostras oligoastenozoospermicas, na avaliação da motilidade total esta diferença não se manteve. A motilidade total nos meios Irvine e Ingamed foram semelhantes e maiores que o Global ($49,9 \pm 5,83\%$, $58,9 \pm 7,14\%$ e $26,6 \pm 7,23\%$ para os meios Irvine, Ingamed e Global, figura 9, respectivamente).

Já a vitalidade seguiu a tendência dos resultados anteriores e foi menor ($P < 0,05$) no meio Global comparado aos meios Irvine e Ingamed ($27,7 \pm 4,17\%$, $29,0 \pm 4,01\%$ e $14,8 \pm 3,29\%$ para os meios Irvine, Ingamed e Global, respectivamente). Não houve diferença entre os meios Irvine e Ingamed (figura 9).

Figura 9. **Gráfico** representando a **taxa** de recuperação das motilidades progressiva, total e vitalidade após congelamento/aquecimento das amostras **oligoastenozoospermicas** nos meios Irvine, Ingámed e Global utilizados **no experimento 1**.



Os valores estão expressos em médias percentuais. * $P < 0,05$ na comparação entre os meios.

Quando são comparados os resultados entre os grupos de amostras normozoospermicas e oligoastenozoospermicas, é observada uma queda significativa nos parâmetros motilidade progressiva e vitalidade nos meios importados Life Global e Irvine Scientific. (motilidade progressiva global 19,3% x 7,1%; vitalidade global 26,9% x 14,8%) e (motilidade progressiva Irvine 45,1% x 25,5%; vitalidade Irvine 26,9% x 14,8%).

Foi observada uma redução na motilidade progressiva e vitalidade nos meios Irvine e Global, nas amostras oligoastenozoospermicas quando comparadas com as normozoospermicas.

O meio Ingámed manteve constância nos resultados. A recuperação de espermatozoides móveis totais nos 3 meios manteve o mesmo padrão de recuperação tanto nas amostras normozoospermicas, quanto nas amostras oligoastenozoospermicas.

Foi observada uma redução na motilidade progressiva e vitalidade nos meios Irvine e Global nas amostras oligoastenozoospermicas quando comparadas com as normozoospermicas. Não houve diferença nos parâmetros seminais entre amostras oligoastenozoospermicas e normozoospermicas quando o meio Ingamed foi utilizado. A recuperação de espermatozoides móveis totais nos 3 meios manteve o mesmo padrão de recuperação tanto nas amostras normozoospermicas, quanto nas amostras oligoastenozoospermicas.

4.2 Experimento 2

4.2.1 Análise pré-congelamento

As amostras do segundo experimento foram submetidas à análise microscópica antes de passarem pelo processo de congelamento. O objetivo desta etapa do estudo foi avaliar a taxa de recuperação dos parâmetros de viabilidade espermática após submeter as amostras selecionadas ao congelamento com o meio produzido na UFRJ. As amostras *in natura* pré-congelamento apresentaram $69,6 \pm 4,7\%$ de motilidade progressiva, $12,8 \pm 0,9\%$ de motilidade não-progressiva e $91,0 \pm 1,8\%$ vitalidade (tabela 4). Esta etapa do estudo não possui amostras oligoastenozoospermicas.

Tabela 4. Análise microscópica das amostras normozoospermicas *in natura* após 30 minutos de liquefação do **experimento 2**. Concentração espermática (milhões/mL), percentual de espermatozoides móveis progressivos (A), não-progressivos (B), e imóveis (C).

	1	2	3	4	5
[]/ML	45	28	65	28	63
A	78%	68%	69%	53%	80%
B	11%	14%	15%	14%	10%
C	11%	18%	16%	33%	10%
VIT	95%	90%	90%	85%	95%

[]/ML: Concentração espermática em (milhões/mL); A: percentual de espermatozoides móveis progressivos; B: percentual de espermatozoides não-progressivos; C:percentual de espermatozoides imóveis; VIT:percentual de espermatozoides vivos.

4.2.2 Análise pós-descongelamento

A média das análises microscópicas dos parâmetros de motilidade progressiva, não-progressiva e vitalidade, encontradas após descongelamento das amostras nos diversos protocolos do meio TYB-UFRJ e no meio TYB Ingámed estão na tabela 5.

Tabela 5. Espermatozoides móveis progressivos (A), móveis não-progressivos (B) e vivos (VIT) antes e após o congelamento no meio comercial Ingámed e no meio do experimento TYB-UFRJ do **experimento 2**. Os valores são médias das 5 amostras normozoospermicas.

	INGÁMED	TYB 5MIN	TYB 15 MIN	TYB 20 MIN	TYB 30 MIN	TYB LAVADO
A	22,6 ± 3,8%	16,8 ± 5,8%	8,6 ± 2,5%	7,0 ± 2,0%	7,8 ± 2,1%	12,4 ± 1,7%
B	17,6 ± 0,6%	12,0 ± 2,2%	11,6 ± 2,1%	9,0 ± 1,5%	9,0 ± 1,3%	12,2 ± 1,3%
VIT	60,8 ± 4,1%	-	-	-	-	40,4 ± 3,1%

Parâmetros seminais: A: percentual de espermatozoides móveis progressivos; B: percentual de espermatozoides não-progressivos; VIT: percentual de espermatozoides vivos. Os valores estão expostos em médias* $P < 0,05$ na comparação entre os meios.

4.2.3 Taxa de recuperação após descongelamento

O meio TYB-UFRJ apresentou 28,5%±1,79% de recuperação média da motilidade total após o congelamento, com variações de acordo com a tabela 6 nos períodos analisados entre 5 e 30 minutos após o descongelamento. Já a motilidade progressiva teve uma média de 13,3±2,88% com variação de acordo com a tabela 6 nos períodos analisados entre 5 e 30 minutos após o descongelamento.

O meio TYB-UFRJ apresentou menor motilidade total e progressiva após 30 minutos do descongelamento quando comparado com todos os tempos pós congelamento das amostras congeladas com o TYB Ingámed (tabela 6).

O sêmen congelado com o meio TYB UFRJ apresentou uma menor vitalidade (44,4±2,94%) quando comparado com a vitalidade observada com o meio Ingámed (66,9±2,16%, $P < 0,05$).

Tabela 6: **Taxa** de recuperação da motilidade progressiva (A), motilidade total (A+B) e vitalidade (VIT) após congelamento/aquecimento nos meios Ingámed e TYB-UFRJ do **experimento 2**.

PARÂMETROS SEMINAIS	TYB - INGAMED			TYB-UFRJ		
	30 Min	5 Min	15 Min	20 Min	30 Min	Lavado
A	32,2±3,0%*	15,7±2,2 %	12,3±2,4%	9,9±2,0%	11,2±2,5%	17,7±2,0%
A+B	46,8±3,2%*	28,6±3,2 %	26,7±3,6%	22,0±3,1%	20,7±2,2%	28,5±2,4%
VIT	66,9±3,0%					44,4±2,1%*

Parâmetros seminais: A: percentual de espermatozoides móveis progressivos; A+B: percentual de espermatozoides móveis progressivos e não-progressivos; VIT: percentual de espermatozoides vivos. Os valores estão expostos em médias* P<0,05 na comparação entre os meios.

5 DISCUSSÃO

Desde a descoberta da qualidade crioprotetora do glicerol por Polge e colaboradores (1949), estudos têm sido realizados nessa área e avanços foram conseguidos (MEDEIROS *et al.*, 2002). Embora a criopreservação seja uma técnica amplamente realizada, o processo ainda causa efeitos danosos às células espermáticas. Com o intuito de, minimizar tais danos aos espermatozóides, têm se buscado alterações nas formulações dos meios e nas metodologias de criopreservação, a fim de manter a viabilidade dos espermatozóides após o descongelamento, e principalmente, manter a mesma capacidade fertilizante que ele tinha antes de ser submetido a tal processo. Pelo menos 50% da motilidade espermática é perdida durante o processo de congelamento, tendo como causa fatores variáveis como composição do meio, qualidade da amostra, método de congelamento e características individuais de cada homem (GAO & CRITSER, 1997; LEIBO *et al.*, 2001; CREE *et al.*, 2003).

A inseminação artificial foi uma das primeiras técnicas de reprodução assistida e o resfriamento do sêmen e seu posterior congelamento também são técnicas pioneiras nessa área (MEDEIROS *et al.*, 2002; MOURA *et al.*, 2009). O avanço tecnológico das

técnicas de congelamento tem sido bem mais lento que avanços no campo da fertilização *in vitro*, cultivo embrionário, micromanipulação embrionária entre outras (NIEDERBERGER *et al.*, 2018). É questionável se o máximo de sobrevivência e recuperação seminal após a criopreservação já foi alcançado e se ainda há espaço para mais desenvolvimento nessa área e quais são essas demandas por novas tecnologias na criopreservação do sêmen.

O presente estudo teve dois objetivos: comparar a recuperação da motilidade e vitalidade em diferentes meios de congelamento utilizados na Clínica de Reprodução Humana Androlab e em avaliar um meio preparado no Laboratório de Reprodução Assistida Experimental da UFRJ. O primeiro experimento teve como objetivo atender a uma demanda da área laboratorial da Clínica enquanto que o segundo foi o passo inicial para uma linha de pesquisa que permitirá o estudo de novas formulações de meios de congelamento de sêmen humano.

Apesar da lentidão dos avanços na área de congelamento de sêmen nos últimos anos comparado a outras áreas da reprodução assistida, é reconhecido que boa parte das células espermáticas morre durante o processo de criopreservação (WATSON, 2000). Entre os diversos parâmetros seminais, a motilidade espermática é particularmente afetada nesse processo e talvez a principal forma de avaliar a recuperação após criopreservação. Apesar de ser reconhecido que a motilidade espermática é reduzida após a criopreservação, o mecanismo exato pelo qual isso ocorre ainda é desconhecido (WATSON, 2000; HOLT, 2000a).

Há décadas, o principal componente utilizado em meios diluentes para congelamento de sêmen humano tem sido gema de ovo. Entretanto, nos últimos anos tem se tentado remover a gema da composição do meio em função do risco de contaminação por bactérias ou micoplasma (BOUSSEAU *et al.*, 1998). Mesmo sem uma definição precisa sobre o real papel da gema no mecanismo de ação da proteção da membrana contra os cristais de gelo, vários experimentos têm sido desenvolvidos com a utilização das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) no congelamento do sêmen de várias espécies (MOUSSA *et al.*, 2002; NEVES, 2008), obtendo-se resultados semelhantes ou superiores aos da gema. Isto demonstra que este pode ser o caminho

para a produção de meios diluidores com composição conhecida e sanitariamente melhor controlados.

Vários meios de congelamento estão disponíveis no mercado e estes podem ser divididos em dois grupos principais baseado na sua composição: meios que incluem a gema do ovo em sua composição e meios sem gema. Os meios sem gema são mais recentes no mercado.

Devido a esta situação com a oferta de vários meios e com diferentes composições, surgiu a demanda do banco de sêmen da clínica Androlab para testar os meios comerciais. O objetivo era identificar aqueles com menor variabilidade entre amostras e melhor recuperação da motilidade e vitalidade geral após congelamento/aquecimento. Desta forma, no experimento 1, as 23 amostras foram classificadas quanto a motilidade e concentração espermática e divididas em 18 amostras normozoospermicas e 5 oligoastenozoospermicas. As amostras que apresentaram os padrões de concentração e motilidade dentro dos valores de referência fornecidos pelo WHO (2010) foram consideradas normozoospermicas, e as amostras abaixo dos valores de referência de concentração (15 milhões de espermatozoides por mL), e motilidade (<32% de móveis) foram consideradas oligoastenozoospermicas. O banco de sêmen da Androlab possui amostras de todas as classificações, que estão criopreservadas em diversos meios comerciais, sendo a maioria delas criopreservadas nos meios usados neste estudo. A avaliação dos grupos separados de acordo com sua classificação foi importante, pois a qualidade das amostras tem sido descrita como fator de influência nos resultados de congelamento (HAMMADEH *et al.*, 2001). No experimento 1 do presente estudo, as amostras normozoospermicas congeladas nos meios TYB, que são a base de gema, das marcas Irvine e Ingámed não apresentaram diferença significativa na taxa de recuperação da vitalidade e nas motilidades progressiva e total entre elas. Neste mesmo grupo de pacientes, a taxa de recuperação destes mesmos parâmetros foi significativamente menor com o meio gema-free da marca Global. Estes resultados demonstram o porquê dos meios TYB a base de gema serem os mais utilizados apesar da presença de um composto de origem animal em sua composição. Estes dados seguem aqueles já relatados na literatura (HAMMADEH *et al.*, 2001; NALLELLA *et al.*, 2004; MAHADEVAN & TROUNSON, 1983) que mostram a

importante e desconhecida função dos compostos indefinidos da gema de ovo de galinha na proteção ao espermatozóide contra as crioinjúrias (SILVA & GUERRA 2011). Resultados semelhantes ao do presente estudo foram observados quando 3 meios de congelamento comerciais foram testados (NALELLA *et al.*, 2004). Os meios TYB proporcionaram uma melhor recuperação espermática além de maior vitalidade, e morfologia quando comparados ao meio sem a presença da gema.

Um outro estudo feito por Hammadeh e colaboradores (2001) realizou alguns ensaios no espermatozóide submetido ao congelamento com meio TYB da Irvine, um meio sem gema de ovos. O meio TYB apresentou melhores resultados em todos os parâmetros avaliados, inclusive, na motilidade e vitalidade. A média de recuperação da motilidade em amostras de baixa qualidade neste estudo foi de 47% e a vitalidade de 55%. Em amostras de boa qualidade a recuperação da motilidade foi de 62% e a vitalidade foi de 57%. Os resultados encontrados por Hammadeh e colaboradores (2001) divergem dos resultados do presente estudo quanto a taxa recuperação da vitalidade. Nas amostras de boa qualidade o presente estudo obteve 38,3% contra 57% da literatura. Já amostras de baixa qualidade espermática apresentaram 27,7% de recuperação no presente estudo contra 55% da literatura.

No experimento 1 também avaliou amostras de baixa qualidade espermática classificadas como oligoastenozoospermicas e submetidas aos três meios de congelamento. Foi observado um aumento significativo de motilidade progressiva no meio Ingámed. Já na motilidade total houve um aumento 10% no meio Ingámed comparado ao Irvine. Este aumento não foi estatístico, mas pode ser considerado numericamente e clinicamente diferente entre os pacientes. Já na vitalidade não houve diferenças entre os meios Ingámed e Irvine e os dois foram maiores que o meio Global.

As categorias de acordo com os parâmetros seminais das amostras apresentam comportamento distintos durante a criopreservação, sendo imprevisível a taxa de recuperação. Ejaculados oligoastenozoospermicos quando são submetidos ao processo de congelamento têm pior desempenho comparado à amostras normozoospermicas (SHARMA *et al.* 2015).

Em outro estudo as taxas de recuperação nos parâmetros motilidade total e vitalidade foram inferiores (LASS *et al.*, 1998). A recuperação da motilidade total dos

espermatozóides não foi significativamente diferente entre amostras normozoospermicas e oligoastenozoospermicas com os meios Ingamede Irvine. Já no global houve uma redução nesses parâmetros. o meio ingamed demonstrou menor variação na recuperação das características seminais independente da qualidade da amostra antes de passar o processo de congelamento e aquecimento. Os motivos pelos quais amostras se comportam de maneira divergente em diferentes meios depois de submetidas ao processo de congelamento permanecem desconhecidos (BENSON *et al.*, 2012).

O segundo experimento foi realizado com objetivo de testar um meio preparado no laboratório de reprodução assistida da UFRJ baseado na formulação estabelecida por Prins e Weidel (1986) e denominado aqui como meio TYB-UFRJ. Foram realizados testes de sobrevivência e recuperação da motilidade após congelamento e descongelamento. Como controle foi utilizado o meio Ingámed devido aos bons resultados obtidos no experimento 1.

Um total de 5 amostras foram criopreservadas no meio TYB-UFRJ e Igámed. O meio controle obteve uma taxa de recuperação significativamente maior para motilidade progressiva, total e vitalidade. A motilidade espermática total e progressiva recuperada com o meio TYB-UFRJ variou significativamente nos períodos pós congelamento avaliados. Apesar de não estatisticamente diferente, a motilidade progressiva recuperada imediatamente após o descongelamento foi numericamente maior quando comparado em 15, 20 e 30 minutos. Já a motilidade total recuperada foi maior com 15 minutos quando comparada com outros tempos após o descongelamento. A análise da recuperação espermática em tempos diferentes é importante para estabelecer o melhor protocolo para o meio preparado na UFRJ . Porém, mais estudos terão que ser conduzidos para avaliar a reprodutibilidade destes resultados. Cada meio comercial indica um protocolo diferente de aquecimento, mesmo que a composição seja semelhante como no caso do TYB Irvine e TYB Ingámed, por exemplo.

Com exceção de Prins e Weidel (1986) não foram encontradas trabalhos que elaboraram seu próprio meio de congelamento de sêmen como o elaborado neste trabalho e desta forma se torna difícil a comparação com um meio preparado em laboratório de pesquisa. A formulação descrita por Prins & Weidel (1986) foi a única

encontrada com detalhes de sua formulação. Os meios comerciais indicam seus componentes, mas não detalham sua concentração. No meio de Prins e Weidel, a concentração dos ingredientes foi indicada em osmolaridade o que também tornou a preparação do meio mais complexo devido a dificuldade de encontrar este equipamento em funcionamento no Centro de Ciências da Saúde (CCS) da URFJ.

Não houve diferenças estatísticas nas análises pós-congelamento do meio TYB-UFRJ. Porém, parece haver uma queda na motilidade total com o tempo até 30 minutos e essa motilidade é recuperada após a lavagem do crioprotetor. Após ser submetido a lavagem, uma porcentagem dos espermatozoides retomam a motilidade. Este fato também é explicado pela suplementação do meio de lavagem e ressuspensão com albumina humana. A albumina interage com as proteínas de membrana do espermatozoide, conferindo reparos na motilidade por mecanismos não totalmente elucidados (HOLT 2000b).

No trabalho de Prins e Weidel (1986) foi comparada a eficácia de oito sistemas tampão com diferentes crioprotetores em 12 amostras normais com o objetivo de determinar o melhor sistema tampão para a criopreservação de espermatozoides humanos disponível na época. Dentre os meios testados, a formulação Test-yolk-buffer TEST C-1 se destacou positivamente. A taxa de recuperação do TEST C-1 descrita pelos autores foi bem diferente da encontrada no presente estudo (83% x 15,3%). Os parâmetros seminais de referência mudaram consideravelmente desde a execução do trabalho de Prins e Weidel e os dias atuais (WHO 1999; WHO 2010). A avaliação seminal é hoje, bem mais criteriosa e tem se observado uma queda na qualidade do sêmen ao longo dos anos (BAKER K *et al.*, 2015). A metodologia de congelamento e descongelamento foi diferente das utilizadas pelo presente estudo. No trabalho de Prins e Weidel as amostras foram lentamente resfriadas em palhetas de 0,5 mL. O descongelamento foi feito em banho-maria a 37°C. O processo de congelamento feito pelo presente estudo seguiu o protocolo semi-rápido de congelamento, que leva as amostras da temperatura ambiente diretamente ao vapor de N₂ líquido e após 15 minutos, imerge as palhetas em N₂ líquido. O descongelamento retira as palhetas do N₂ líquido e as expõe diretamente a temperatura ambiente. Este protocolo de congelamento semi-rápido é o protocolo mais utilizado no laboratório de reprodução assistida e também

é o adotado na clínica Androlab. Ele se encaixa melhor na rotina do embriologista, pois leva menor tempo de execução.

Apesar das baixas taxas de motilidade e vitalidade, o meio TYB-UFRJ demonstrou potencial para se tornar um meio com resultados semelhantes aos meios comerciais. O meio TYB-UFRJ também apresentou alta variabilidade entre as amostras criopreservadas, inclusive, em palhetas diferentes de uma mesma amostra. Espermatozoides de diferentes indivíduos ou até mesmo diferentes ejaculados do mesmo indivíduo, exibem diferentes padrões de respostas às mesmas condições de congelamento, resultando em perda de eficiência do método (LEIBO *et al.*, 2001). Em geral, tem sido observado que o congelamento causa uma diminuição na porcentagem de espermatozoides móveis progressivos em todos os homens. A extensão da diminuição deste parâmetro varia amplamente entre doadores individuais (LEIBO *et al.*, 2001). Nenhum protocolo existente é capaz de apresentar-se igualmente eficiente para todas as amostras.

A literatura apresenta a descrição de alguns meios à base de gema de ovo e glicerol Test-Yolk-Buffer (GILMORE *et al.*, 1997; MAHADEVAN & TROUSON 1983; PRINS & WEIDEL, 1986). Foram realizados testes com diferentes concentrações de glicerol e de gema de ovo, e a formulação de maior sucesso durante o aquecimento tinha 6% de glicerol e 20% de gema de ovo chamada de TEST C-1. A concentração do crioprotetor é o ponto mais variável entre os protocolos encontrados. Meios com concentração de glicerol menor que 2% ou maior que 15% são ineficientes ou tóxicos para a célula espermática (McLOUGHLIN *et al.*, 1992).

O objetivo deste trabalho foi reproduzir a formulação do meio TYB TEST C-1 produzido por Prins e Weidel (1986), a fim de obter resultados na recuperação dos parâmetros de motilidade e vitalidade, semelhantes aos meios comerciais normalmente utilizados na clínica. Estes meios têm a presença da gema de ovo, o que tem sido criticado devido aos riscos sanitários envolvidos (BOUSSEAU *et al.*, 1998). A indústria ligada a RHA tem se mobilizado no desenvolvimento de um meio que não contenha gema (BOUSSEAU *et al.*, 1998) e produtos sem este componente já estão no mercado. Porém, os resultados como o demonstrado no presente estudo indicam que a recuperação nos meios sem gema ainda não está no mesmo nível que os meios com gema.

Para planejar modificações em um meio de congelamento já existente e comercializado, o primeiro passo é preparar este meio até obter resultados semelhantes aos meios comerciais. Uma vez estabelecido e testado o meio poderá ter seus componentes alterados e nesse caso a gema poderá ser substituída por outros ingredientes. O laboratório de Bioquímica de Lipídios do Instituto de Bioquímica Médica da UFRJ conseguiu fracionar os lipídios da gema de ovos de galinha. Uma vez estabelecido a produção de um meio de congelamento na UFRJ, estes lipídeos isolados poderão ser testados para avaliar a substituição da gema.

Os mecanismos de proteção ao espermatozoide durante o processo de criopreservação ainda não são claros e talvez por esta razão, seja tão difícil substituir seus componentes e obter os mesmos resultados (JOLIVET *et. al*, 2006). Os resultados deste indicam que o meio TYB-UFRJ formulado no laboratório de Reprodução assistida da UFRJ tem potencial para alcançar resultados semelhantes aos comerciais. Mais lotes com a mesma formulação devem ser preparados e testados. A osmolaridade dos ingredientes deve ser mais vezes testada para a incorporação destes componentes.

Mesmo com taxas mais baixas, o meio preparado na UFRJ foi capaz de recuperar a motilidade de espermatozoides e colocá-los em condições potenciais para serem utilizados nas técnicas de FIV e ICSI. Estas técnicas utilizam quantidades pequenas de espermatozoides no caso da FIV e apenas um espermatozoide no caso da ICSI.

A tendência nos últimos anos ao uso da técnica de ICSI para quase todos os ciclos pode ter ocasionado uma desaceleração nas pesquisas por melhores taxas de recuperação de sêmen congelado. Não há necessidade de uma alta recuperação quando apenas 5-15 espermatozoides são necessários para fertilizar 5-15 oócitos.

Porém, mesmo com o avanço do uso da ICSI, a remoção de um produto animal da composição do meio de congelamento de sêmen humano é importante e este trabalho apresentou o primeiro passo para se chegar a esta nova composição.

6 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, e com os dados oferecidos pela literatura, conclui-se que, até os dias de hoje, nenhum meio para congelamento de sêmen humano livre de gema de ovos de galinha conseguiu promover resultados semelhantes aos

resultados obtidos com as formulações TYB. Muitos estudos devem ser realizados neste campo com o intuito de retirar este componente animal dos meios comercialmente disponíveis. O nosso trabalho objetivou dar o primeiro passo para que novas formulações de meios de congelamento humano sejam desenvolvidas e os resultados obtidos precisam ser melhorados para que os compostos do TYB-UFRJ sejam substituídos por compostos 100% sintéticos.

7 IMPLICAÇÕES DO ESTUDO

Partindo da importância da recuperação dos espermatozoides móveis progressivos após o processo de congelamento/aquecimento na determinação da indicação de tratamento de RA, o grupo da Androlab adotou em sua rotina laboratorial o meio nacional com gema de ovo TYB Ingámed, visto que o meio nacional não apresentou diferença significativa nos resultados comparado ao meio TYB importado. Além disso, trabalhar com meios nacionais oferece maior conforto para a clínica, pois o preço e o prazo de entrega são menores, e o tempo de transporte também é reduzido, oferecendo menor risco à integridade do material durante o traslado.

Devido ao baixo desempenho da marca Global, seu uso na rotina do laboratório Androlab está suspenso.

8 PERSPECTIVAS FUTURAS

- Novos lotes do meio TYB-UFRJ devem ser produzidos para atestar reprodutibilidade.
- A formulação do meio TYB-UFRJ precisa passar por alterações a fim de alcançar resultados semelhantes aos meios comerciais com gema de ovos.
- Substituir a gema completa de ovos por frações lipídicas definidas a fim de identificar e conhecer melhores funções de cada componente.
- Produzir um meio gema-free que obtenha resultados semelhantes aos resultados obtidos com os meios TYBs.

9 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ANGER J.T., GILBERT B.R., GOLDSTEIN M. **Cryopreservation of sperm: indications, methods and results.** The Journal of Urology, vol.170, p.1079-1084, 2003.

ANTON M., GANDEMER G. **Composition, solubility and emulsifying properties of granules and plasma of egg yolk.** Journal of Food Science, vol. 62, p.484-487, 1997.

BAAS, J.W., MOLAN, P.C., SHANNON, P. **Factors in seminal plasma of bulls that affect the viability and motility of spermatozoa.** Journal of Reproduction and Fertility. vol.68, p. 275-280, 1983.

BAKER K., JIANBO LI, AND EDMUND SABANEH JR. **Analysis of semen parameters in male referrals: impact of reference limits, stratification by fertility categories, predictors of change, and comparison of normal semen parameters in subfertile couples.** Fertility and Sterility. vol. 103, p. 59–65, 2015.

BALL B.A., VO,A. **Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectant on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential.** Journal of Andrology, vol.22, p.1061-1069, 2001.

BARROS T.B., & TONIOLLI R. **Uso potencial da água de coco na tecnologia de sêmen.** Revista Brasileira de Reprodução Animal, vol. 35, p.400-407, 2011.

BENSON J.D., WOODS E.J., WALTERS E.M., CRITSER J.K. **The cryobiology of spermatozoa.** Theriogenology, vol. 78, p. 1682–1699, 2012.

BOUSSEAU S., BRILLARD P., MARQUANT-LE., GUIENNE B. **Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents.** Theriogenology, vol. 50, p.699-706, 1998.

CASTRO S.V., CARVALHO A.A., SILVA C.M.G., FAUSTINO L.R., FIGUEIREDO J.R., & RODRIGUES N.P.R. **Agentes crioprotetores intracelulares: características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e oócitos.** Acta Scientiae Veterinariae, vol.39, p.957, 2011.

COOKSON A.D., THOMAS A.N., FOULKES J.A. **Immunochemical investigation of the interaction of egg-yolk lipoproteins with bovine spermatozoa.** Journal of

Reproduction and Fertility, vol.70, p.599-604, 1984.

CREE M.E.T., MCCLURE N., DONNELLY E.T., STEELE K.E., LEWIS S.E. **Effects of cryopreservation on testicular sperm nuclear DNA fragmentation and its relationship with assisted conception outcome following ICSI with testicular spermatozoa.** *Reprod Biomed Online*, vol 7, p.449 –455, 2003.

DALIMATA A.M., GRAHAM, J.K. **Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with trehalose and methyl cellulose.** *Theriogenology*, vol. 48, p. 831-841, 1997.

DONNELLY E.T., MCCLURE N., LEWIS S.E.M. **Cryopreservation of semen and prepared human sperm.** *Fertility & Sterility*, vol. 76, p.892-900, 2001.

FELDSCHUH J., BRASSEL J., DURSO N., LEVINE A. **Successful sperm storage for 28 years.** *Fertility & Sterility*, vol.84, p.1017, 2005.

FOOTE R.H., & KAPROTH M.T. **Large batch freezing of bull semen: Effect of time of freezing and fructose on fertility.** *Journal Dairy Science*, vol.85, p.453-456, 2002.

GAO D., MAZUR P., CRITSER J. **Fundamental cryobiology of mammalian spermatozoa.** In: *Reproductive Tissue Banking*, Karow AM, Critser J (Eds.). Academic Press, p. 263–328, 1997.

GAO D.Y, ASHWORTH.E, WATSON P.F, KLERINHANS F.W, MAZUR P, CRITSER J.K **Hyperosmotic tolerance of human spermatozoa: separate effects of glycerol, sodium chloride, and sucrose on spermolysis.** *Biology of Reproduction*, vol.49, p.112-123, 1993.

GAO D.Y., LIU J., LIU C., MCGANN, L.E., WATSON P.F., KLEINHANS F.W., MAZUR P., , CRITSER E.S., & CRITSER J.K. **Andrology: Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol.** *Human Reproduction*, vol.10, p.1109-1122, 1995.

GILMORE J.A., LIU J., GAO D.Y., & CRITSER J.K. **Determination of optimal cryoprotectants and procedures for their addition and removal from human spermatozoa.** *Human Reproduction*, vol.12, p.112-118, 1997.

GRAHAM J.K. **Cryopreservation of stallion spermatozoa.** Veterinary Clinic of North. American: Equine Practice, vol.12, p.131-147, 1996.

HAMMADEH M.E., GREINER S., ROSENBAUM P., & SCHMIDT W. **Comparison Between Human Sperm Preservation Medium and TEST-Yolk Buffer on Protecting Chromatin and Morphology Integrity of Human Spermatozoa in Fertile and Subfertile Men After Freeze-Thawing Procedure.** Journal of Andrology, vol. 22, p.1012-1018, 2001.

HOLT W.V., & NORTH R.D. **The role of membrane-active lipids in the protection of ram spermatozoa during cooling and storage.** Gamete Research, vol. 19, p.77-89, 1988.

HOLT W.V. **Basic aspects of frozen storage of semen, Animal Reproduction Science.** vol.62, p.3-22, 2000b.

HOLT W.V. **Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences.** Theriogenology, vol. 53, p. 47-58, 2000a.

INHORN M.C., & PATRIZIO P. **Infertility around the globe: new thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century.** Human Reproduction Update, vol.21, p.411–426, 2015.

JOLIVET P., BOULARD C., BEAUMAL V., CHARDOT T., & ANTON M. **Protein components of low-density lipoproteins purified from hen egg yolk.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol.54, p.4424-4429, 2006.

LASS A., AKAGBOSU F., ABUSHEIKHA N., HASSOUNEH M., BLAYNEY M., AVERY S. **A programme of semen cryopreservation for patients with malignant disease in a tertiary infertility centre: lessons from 8 years' experience.** Human Reproduction vol. 13, p.3256–3261, 1998.

LEIBO S., PICTON H.M., GOSDEN R. **Cryopreservation of human spermatozoa. In: Medical, Ethical and Social Aspects of Assisted Reproduction.** Current Practices and Controversies in Assisted Reproduction: Report of a WHO meeting, Vayena E, Rowe P, Griffin P (Eds.). World Health Organization, p. 152– 65, 2001.

MAGELSSSEN H., BRYDOY M., & FOSSA S.D. **The effects of cancer and cancer treatments on male reproductive function.** Nature, vol.3, p.312-322, 2006.

MAHADEVAN M., & TROUSSON A.O. **Effects of cryoprotective media and dilution methods on the preservation of human spermatozoa.** *Andrology*, vol.15, p.255-366, 1983.

MANJUNATH P., NAUC V., BERGERON A., MÉNARD M. **Major proteins of bovine seminal plasma bind to the lowdensity lipoprotein fraction of hen´s egg yolk.** *Biology of Reproduction*, vol.67, p.1250-1258, 2002.

MASCARENHAS M.N., FLAXMAN S.R., BOERMA T., VANDERPOEL S., STEVENS G.A. **National, Regional, and Global Trends in Infertility Prevalence Since 1990: A Systematic Analysis of 277 Health Surveys.** *Plos Medicine*, vol.9, p.1-12, 2012.

MAZUR P. **Freezing of living cells: mechanisms and implications.** *American Journal Physiology.*, vol. 247, p. C125-42, 1984.

MAZUR P. **The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates.** *Cryobiology*, vol.14, p.251-272, 1977.

MCLAUGHLIN E.A., FORD W.C.L., & HULL M.G.R. **The contribution of the toxicity of a glycerol-egg- yolk-citrate cryopreservative to the decline in human sperm motility during cryopreservation.** *Journal Reproduction Fertility*, vol.95 p.479-454, 1992.

MOURA M.D., SOUZA M.C.B., SCHEFFER B.B. **Reprodução assistida. Um pouco de história.** *Rev. SBPH* vol. 12 nº. 2, 2009.

MOUSSA M., MARTINET V., TRIMECHE A., TAINTURIER D., ANTON M. **Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen.***Theriogenology*, vol.57, p.1695-1706, 2002.

NALLELLA K.P., SHARMA R.K., ALLAMANENI S.S.R., AZIZ N., & AGARWAL A. **Cryopreservation of human spermatozoa: comparison of two cryopreservation methods and three cryoprotectants.** *Fertility and Sterility* vol. 82, p.913-918, 2004.

NEVES M.M., HENRY M. **Gema do ovo de galinha e a ação protetora de suas lipoproteínas de baixa densidade na criopreservação do sêmen: uma revisão.** *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, vol.36, p.209-214, 2012.

NIEDERBERGER C., PELLICER A., COHEN J., GARDNER D.K., PHIL D., PALERMO G., **Forty years of IVF.** *Fertility & Sterility* Vol. 110, p. 185–324, 2018.

PACE, M.M., & GRAHAM, E.F. **Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing.** *Journal of Animal Science*, v, 39, p.1144-9, 1974.

PALERMO G.D., JORIS H, DEVROEY P., STEIRTEGHEM A.C. **Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte.** *Lancet*, vol.340, p.17-18, 1992.

PALERMO G.D., NERI Q.V., ROSENWAKS Z. **To ICSI or Not to ICSI.** *Semin Reproductive Medicine*, vol. 33, p.092-102, 2015.

PARKS J. E., & GRAHAM J. K. **Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes.** *Theriogenology*, vol.38, p.209-222, 1992.

PARKS J.E., MEACHAM T.N., SAACKE R.G. **Cholesterol and phospholipids of bovine spermatozoa. I. Selection of a PIPES-Buffered diluent for evaluating the effect of egg yolk lipoprotein on sperm cholesterol and phospholipids.** *Biology of Reproduction*, vol.24, p.393-398, 1981.

PASQUALOTTO F.F. **Câncer e infertilidade: criopreservação de sêmen humano.** *Guideline de Andrologia SBRH*, p.51, 2011.

PASQUALOTTO F.F., & AGARWAL A. **Should we offer semen cryopreservation to men with testicular cancer?** *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, vol.68, p.101-102, 2001.

PEÑA A.I. **Flow cytometry in the assessment of fresh and frozenthawed dog semen, and the effects of different cryopreservation methods on ostthaw sperm survival and longevity.** *Doctoral thesis, Uppsala*, 2000.

PHILLIPS P.H., & LARDY H.A. **A yolk-buffer for the preservation of bull semen.** *Journal of Dairy Science.*, N^o.23, p.399-404, 1940.

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

PRINS G.S., & WEIDEL L. **A comparative study of buffer systems as cryoprotectants for human spermatozoa.** *Fertility & Sterility*, vol.46, p.148-150, 1986.

REED M.L., PEACE C.E., HAMIC A., THOMPSON D.J., CAPERTON C.L. **Soy lecithin replaces egg yolk for cryopreservation of human sperm without adversely affecting postthaw motility, morphology, sperm DNA integrity, or sperm binding**

to hyaluronate. Fertility and Sterility, vol. 92, No. 5, 2009.

RONCOLETTA M., MORANI E.S.C., RODRIGUES L.H., FRANCESCHINI P.H., ESPER C.R. In: 15th INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION. **Proceedings...**, p.187, 2004.

SCHMEHL M.K., ANDERSON S.P., VAZQUEZ I.A., GRAHAM E.F. **The effect of dialysis of extended ram semen prior to freezing on post-thaw survival and fertility.** Cryobiology, vol. 23, p.406-414, 1986.

SHIVAJI S., & BHARGAVA P.M. **Antifertility factors of mammalian seminal fluid.** Bioassays vol.7, p.13-17,1987

SILVA S.V., & GUERRA M.M.P. **Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para a redução das crioinjúrias.** Revista Brasileira de Reprodução Animal, vol.35, p.370-384, 2011.

SOUSA R.C.S., COIMBRA J.S.R., ROJAS E.E.G., MINIM L.A., OLIVEIRA F.C., MINIM V.P.R. **Effect of pH and salt concentration on the solubility and density of egg yolk and plasma egg yolk.** Food Sci Technol, vol.40, p.1253-1258, 2007.

SQUIRES E.L., PICKETT B.W., GRAHAM J.K., VANDERWALL D.K., McCUE P.M., BRUEMMER J.E. **Principles of cryopreservation. Cooled and frozen Stallion Semen,** b.9, 1999.

STITTS D.P., & ERICKSON R.P. **Suppressive effect of seminal plasma on lymphocyte activation.** Nature, vol.253, p.727, 1975.

VISHWANATH R., SHANNON P. **Storage of bovine semen in liquid and frozen state.** Animal Reproduction Science, v.62, p.23-53, 2000.

VISHWANATH R., SHANNON P., CURSON B. **Cationic extracts of egg yolk and their effects on motility, survival and fertilizing ability of bull sperm.** Animal Reproduction Science, vol.29, p.185-194, 1992.

WATSON P.F. **Recent developments and concepts in the cryopreservation of their post-thawing function.** Reproduction, Fertility and Development, vol.7, p.871-891, 1995.

WATSON P.F. **The causes of reduced fertility with cryopreserved semen.** Animal Reproduction Science, vol.60-61, p.481-492, 2000.

WATSON P.F. **The effects of cold shock on sperm membranes.** In: Clarke A, Morris GJ (Ed.). Effects of low temperatures on biological membranes. London: Academic Press, p.89-218, 1981.

WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 4th edition. Cambridge University Press, UK. World Health Organization, 1999.

WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th edition. Cambridge University Press, UK. World Health Organization, 2010.

WILHELM K.M., GRAHAM J.K., SQUIRES E.L. **Effects of phosphatidylserine and cholesterol liposomes on the viability, motility and acrossomal integrity of stallion spermatozoa prior and after cryopreservation.** Cryobiology, vol.33, p.320-329, 1996.

WOLFE J., & BRYANT G. **Cellular cryobiology: thermodynamic and mechanical effects.** International Journal of Refrigeration, vol.24, p.438-450, 2001.

YOSHIDA M. **Conservation of sperms: current status and new trends.** Animal Reproduction Science, vol. 60-61, p. 349-355, 2000.