

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Medicina

Catalina Isabel Quilindo Giraldo.

**AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS APÓS
LIOFILIZAÇÕES UTILIZANDO A TÉCNICA DE CITOMETRIA DE FLUXO**

Belo Horizonte

2020

CATALINA ISABEL QUILINDO GIRALDO

**AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS APÓS
LIOFILIZAÇÕES UTILIZANDO A TECNICA DE CITOMETRIA DE FLUXO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Saúde da Mulher da Universidade Federal de Minas Gerais
como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.
Área de concentração: Reprodução Humana
e Patologia Ginecológica.

Orientador: Dr.Selmo Geber

Belo Horizonte
Faculdade de Medicina-UFMG
2020

Giraldo, Catalina Isabel Quilindo.

G516a Avaliação da viabilidade de espermatozoides humanos após Liofilizações utilizando a Técnica de Citometria de fluxo [manuscrito]. / Catalina Isabel Quilindo Giraldo. - - Belo Horizonte: 2020.

68f.: il.

Orientador (a): Selmo Geber.

Área de concentração: Reprodução Humana e Patologia Ginecológica.

Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Liofilização. 2. Sêmen. 3. Criopreservação. 4. Citometria de Fluxo. 5. Dissertação Acadêmica. I. Geber, Selmo. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. III. Título.

NLM: QY 190

Bibliotecário responsável: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-6/2697

Agradecimentos

Primeiramente a Deus por me dar a oportunidade de viver essa nova experiência profissional. Desejo agradecer ao programa Bercas Brasil PAEC-OEA por a ocasião que me foi concedida para cursar o programa de mestrado numa das melhores universidades do Brasil. Pra mim o mestrado representa muito mais que o diploma. Representa um estilo e uma nova maneira de perceber minha carreira. Sempre com o desejo constante de dar um passo diante do conhecimento todos os dias.

Professor Selmo Geber obrigada pela orientação durante a pesquisa, você forneceu uma base sólida e vasta, permitindo que eu atingisse muito dos meus objetivos.

Agradeço à equipe da Clínica Origen, Renata Bossi, Debora, Patricia Pino, e aos outros membros por compartilhar suas habilidades e conhecimentos comigo, vocês incentivaram minha pesquisa dia a dia. Gostaria de agradecer ao Departamento de Farmácia Professora Simone e a Fundação Oswaldo Cruz Professora Andreia Texeira e Josiane da Silva, foram parcerias muito importantes para melhorar minha pesquisa.

Agradecimentos especiais aos meus primeiros mentores da Universidad del Cauca na Colômbia Professor Mario Delgado e Professor. José Andres Calvache por me ajudar durante a faculdade a conhecer o incrível mundo da pesquisa científica. Além de me incentivar a crescer como cientista e pesquisadora. Aos membros da unidade de epidemiologia clínica, Angela Merchan, Luisa Leon, Claudia Orozco, Lucia Arroyo, Ginna Cabra, Adrian Arroyo, Edison Benavides, obrigada pelas tardes de ensino em metodologia científica. Todos vocês foram meu apoio e minha inspiração ao longo dos anos. Por último, mas definitivamente não menos importante, uma palavra de agradecimento a minha família, para meus pais Irne e Gladys e meu irmão Santiago muito obrigada por seu amor, por seu apoio ilimitado e pelas orações dia após dia.

Gracias.

RESUMO

Nas últimas décadas a preservação de espermatozoides humanos tornou-se cara e difícil. Os bancos de sêmen são fundamentais para promover, em situações especiais a possibilidade de reprodução de casais com dificuldade reprodutiva. No entanto, o uso do nitrogênio líquido leva a um custo elevado de manutenção, risco de contaminação cruzada entre amostras, dificuldades no transporte de alíquotas, além de requerer grandes espaços para armazenamento. A liofilização é uma técnica amplamente utilizada para desidratação de produtos alimentícios, farmacêuticos, produtos biotecnológicos, vacinas, materiais biológicos e diagnósticos. Ela consiste na passagem do material do estado sólido diretamente para o estado gasoso – sublimação - mantendo-se a temperatura suficientemente baixa sob uma baixa pressão e poderia ser uma alternativa mais prática e de baixo custo para a preservação de espermatozoides.

O objetivo do estudo foi avaliar a viabilidade celular de espermatozoides humanos liofilizados utilizando marcadores de integridade da membrana celular por meio da técnica de citometria de fluxo. Foram consideradas trinta e duas amostras pareadas criopreservadas (grupo controle) e liofilizadas (grupo de estudo). As análises de integridade de membrana foram feitas após o descongelamento e após liofilização. A preservação de integridade da membrana celular foi de 38,7 % para as amostras criopreservadas e 27,6% para as liofilizadas, resultado significativo maior no grupo da criopreservação ($p= 0,0004$). Existe viabilidade celular de espermatozoides humanos após liofilização utilizando os corantes Anexina V e iodeto de propídio como marcadores indiretos da preservação da integridade da membrana celular por meio da técnica de citometria de fluxo.

Para utilização rotineira mais estudos são necessários, a fim de otimizar a técnica de liofilização.

Palavras-chave: Liofilização, sêmen humano, criopreservação, citometria de fluxo.

ABSTRACT

In the last decades the preservation of human sperm has become expensive and difficult. Semen banks are fundamental to promote in special situations the possibility of reproduction of couples with reproductive difficulties. However, the use of liquid nitrogen leads to high maintenance costs, risk of cross-contamination between samples, difficulties in aliquot transport, and large storage spaces. Freeze drying is a widely used technique for dehydration of food, pharmaceuticals, biotechnology products, vaccines, biological materials and diagnostics. It consists of moving the solid state material directly into the gaseous state - sublimation - keeping the temperature sufficiently low under low pressure and could be a more practical and cost effective alternative for sperm preservation.

The aim of this study was to evaluate the cell viability of lyophilized human sperm using cell membrane integrity markers by flow cytometry. Thirty-two cryopreserved (control group) and lyophilized (study group) paired samples were considered. Membrane integrity analyzes were done after thawing and after lyophilization. The preservation of cell membrane integrity was 38.7% for cryopreserved samples and 27.6% for lyophilized samples, a significantly higher result in the cryopreservation group ($p = 0.0004$). Human sperm cell viability exists after lyophilization using the dyes Annexin V and propidium iodide as indirect markers of preservation of the integrity of the cell membrane through the flow cytometry technique. For routine use further studies are needed in order to optimize the freeze drying technique.

Keywords: Lyophilization, human semen, cryopreservation, flow cytometry

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

TRA- Tratamentos de reprodução assistida

UFMG- Universidade Federal de Minas Gerais

OMS- Organização Mundial da Saúde

TCLE- Consentimento livre e esclarecido

ICSI- Injeção intracitoplasmática de espermatozoide

EGTA- Ácido tetra-acético etileno-glicol

EDTA-Ácido etilenodiamino tetra-acético

AV- Anexina V

IP –Iodeto de Propídio

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura do espermatozoide humano.....	13
Figura 2: Parâmetros de normalidade seminal segundo OMS.....	14
Figura 3: Marcação celular usando ou kit <i>Annexin V Staining</i>	21
Figura 4: Liofilizador LIOBRAS utilizado para desidratação das amostras.....	27
Figura 5: Amostra no meio TrisHcl/EDTA e amostra após a liofilização.....	27
Figura 6: Distribuição total das amostras pareadas para o análise após o descongelamento e reidratação, e contagem final do numero de células analisadas.....	32
Figura 7: Comportamento de marcação com Anexina V das amostras Criopreservadas e liofilizadas sem a estratégia de seleção (UnGated).....	34
Figura 8: Comparação entre as amostras após descongelamento e reidratação.....	35
Figura 9: Comparação dos resultados da marcação duplo negativo com Anexina V das amostras criopreservadas e liofilizadas sem a estratégia de seleção (Ungated).....	36
Figura 10: Comportamento de marcação das amostras com Anexina V Criopreservadas e Liofilizadas com a estratégia de seleção (Gated).....	37
Figura 11: Comparação entre as amostras após descongelamento e reidratação.....	39
Figura 12: Comparação dos resultados da marcação duplo com Anexina V das amostras criopreservadas e liofilizadas com a estratégia de seleção (Gated).....	40

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Descrição dos parâmetros seminais segundo a OMS (2010) das 32 amostras à fresco.....31
- Tabela 2:** Resultado da marcação celular com Anexina V sem a estratégia de seleção (Ungaed) do total das amostras criopreservadas usando o teste de Annexina V-Iodeto de propídio.....32
- Tabela 3:** Resultado da marcação celular com Anexina V sem a estratégia de seleção (Ungaed) do total das amostras liofilizadas usando o teste de Annexina V-Iodeto de propídio.....33
- Tabela 4:** Comparação entre os valores da marcação com Anexina V obtidos para as amostras criopreservadas e liofilizadas sem a estratégia de seleção (UnGated).....34
- Tabela 5:** Resultado da marcação celular com Anexina V com a estratégia de seleção (Gated) do total das amostras criopreservadas usando o teste de Annexina V-Iodeto de propídio.....36
- Tabela 6:** Resultado da marcação celular com Anexina V com a estratégia de seleção (Gated) do total das amostras liofilizadas usando o teste de Annexina V-Iodeto de propídio.....37
- Tabela 7:** Comparação entre os valores da marcação celular com Anexina V obtidos para as amostras criopreservadas e liofilizadas com a estratégia de seleção (Gated).....38

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	10
1.1 Estrutura espermática.....	12
1.2 Parâmetros seminais.....	13
1.3 Criopreservação.....	15
1.4 Técnicas de congelamento.....	15
1.5 Armazenamento das amostras.....	16
1.6 Liofilização espermática.....	16
1.7 Métodos de avaliação da integridade espermática/ membrana.....	20
1.7.1 Annexina V-Iodeto de propidium.....	20
1.8 Citometria de fluxo.....	21
OBJETIVO.....	23
MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1 Coleta e processamento das amostras.....	25
3.2 Criopreservação das amostras.....	25
3.3 Liofilização das amostras.....	26
3.4 Preparação das amostras para testes de viabilidade celular.....	27
3.4.1 Descongelamento das amostras.....	28
3.4.2 Reidratação das amostras.....	28
3.5 Teste de <i>Annexina V-Iodeto de propidium</i>	28
3.6 Análise por citometria de fluxo.....	29
RESULTADOS.....	31
4.1 Análise das amostras à fresco.....	31
4.2 Testes de <i>Annexina V-Iodeto de propidio</i>	31
4.3 Análises das amostras sem a estratégia de seleção (UnGated).....	32
4.3.1 Amostras criopreservadas.....	32
4.3.2 Amostras liofilizadas.....	33
4.4 A Análises das amostras com a estratégia de seleção (Gated).....	36
4.4.1 Amostras criopreservadas.....	36
4.4.2 Amostras liofilizadas.....	37
DISCUSSÃO	42
CONCLUSÃO.....	47
ANEXOS.....	49
REFERÊNCIA.....	61

INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial de Saúde 7 a 15% dos casais em idade reprodutiva são inférteis (1). Considerasse que os homens são os únicos responsáveis por 20 a 30% dos casos de infertilidade e contribuem para 50% dos casos sem geral (2). Os avanços nos conhecimentos de biologia reprodutiva aplicados para os tratamentos de infertilidade configuram dentre as realizações científicas mais significativas nos últimos anos (3). Atualmente, os tratamentos de reprodução assistida (TRA) são feitos no mundo todo, a taxa de sucesso esta em torno de 30% (4). Existem, porém, variações significativas na prática de TRA entre os diferentes continentes. Por exemplo, na Europa o TRA é um benefício coberto pelo seguro enquanto em muitos países da América não é considerado economicamente nem politicamente possível. De maneira geral os tratamentos de fertilização in vitro custam uma média de 15 mil reais. O armazenamento das amostras envolve os custos de manutenção com nitrogênio líquido de 1500 reais, em média, por semana (5). No entanto, na literatura há a um déficit de informação e os dados ainda são bastante heterogêneos. Hoje os TRA continuam sendo dispendiosos com escalonamento e disparidades para o acesso segundo as condições econômicas dos pacientes (6).

No entanto, se estão propondo o desenvolvimento de novas abordagens para reduzir o custo da tecnologia, desde exames laboratoriais simplificados até estimulação hormonal de baixo custo (7).

O uso de bancos de armazenamento de gametas e embriões para criopreservação faz parte de muitos dos protocolos relacionados aos TRA. A criopreservação está indicada em casos como prévio aos tratamentos de quimioterapia, excesso de embriões após o TRA e preservação de fertilidade.

Existem, porém, muitas desvantagens, são caros e com altos requisitos técnicos para sua viabilização, requer instalações e pessoal capacitado para a manutenção, exige monitoramento contínuo e fornecimento ininterrupto de suprimentos como nitrogênio líquido e energia, fazendo com que o banco seja suscetível a problemas de continuidade, rastreabilidade das amostras, além de desastres naturais. Isso dificulta muito a manutenção desses biobancos, deixando-os inviáveis em muitos países em desenvolvimento. Além disso, o nitrogênio também é perigoso, complica e aumenta drasticamente o custo de transporte das amostras, pode atuar como meio de transmissão de patógenos, sua produção, transporte e manutenção é complexa (6).

Nos últimos anos o campo da pesquisa para novos tipos de armazenamentos de gametas se expandiu. A estocagem por meio de liofilização de espermatozoides é uma das novas alternativas para sua preservação. Alguns estudos mostraram que os espermatozoides estão imóveis, com DNA preservado, e com danos na membrana citoplasmática após o processo (8,39,40).

Todas as propostas de novos tipos de armazenamento, para serem implementados, novos estudos devem ser conduzidos para demonstrar que a liofilização não compromete a função final dos gametas para os TRA. Isso inclui a avaliação de aspectos genéticos e epigenéticos, bem como desenvolvimento embrionário, fetal e dos descendentes (9,39).

1.1 Estrutura espermática

A estrutura do espermatozoide humano é formada por cabeça e cauda as quais estão contidas em uma única membrana plasmática que integra receptores responsáveis na ligação com a zona pelúcida envolvida durante o processo da fecundação (10). A principal característica da cabeça do espermatozoide é o núcleo achatado de forma oval contendo a

cromatina altamente compactada. Além disso a cabeça é composta pelo acrosoma que compreende o complexo DNA genômico recoberto por protaminas básicas que contem enzimas hidrolíticas principalmente a hialuronidase e acrosina (11).

A cauda do gameta masculino é composta de colo, peça intermediária, peça principal e terminal (Figura 1). A parte central da peça intermediária junto com o comprimento total da cauda forma o axonema. O axonema é composto de dois microtubulos centrais simples e nove pares de microtúbulos periféricos, onde a proteína dineína é responsável pela transformação da energia química em mecânica. Todo esse conjunto é recoberto externamente por numerosas mitocôndrias dispostas em forma de hélice, que geram a energia necessária para a motilidade espermática (12).

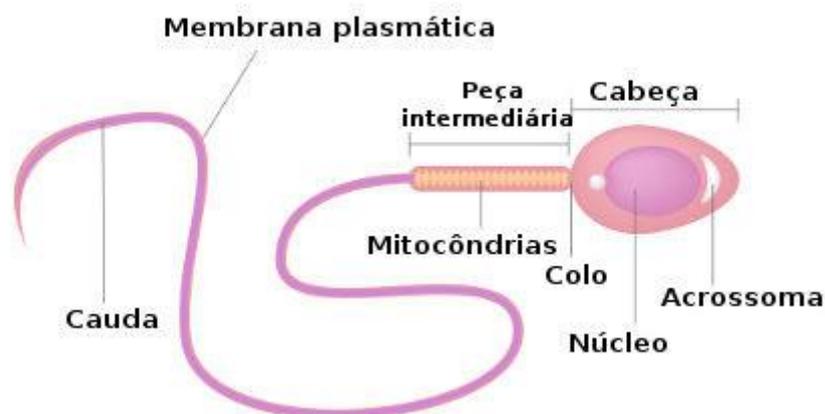


Figura 1. Estrutura do espermatozoide humano Fonte. Vanessa Sardinha dos Santos

1.2 Parâmetros seminais

O estudo de rotina das amostras seminais inclui a avaliação de variáveis macroscópicas, microscópicas e complementares recomendadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS, 2010). As variáveis analisadas no exame macroscópico são a liquefação, viscosidade, aparência, volume e pH, enquanto no exame microscópico são avaliadas a

concentração, a motilidade, a morfologia, presença de células redondas e aglutinação (Figura 2).

Além dessas variáveis, pode ser feito o teste de viabilidade de Eosina o qual quantifica a sobrevivência espermática no sêmen. O teste é feito só nos casos que exista > 40% espermatozoides imóveis. Assim, os espermatozoides mortos são corados de vermelho, pois sua membrana já não é mais funcional permitindo que o corante penetre na célula. Os espermatozoides vivos, por sua vez, permanecem transparentes. O limite aceitável para esse teste é de 58% de espermatozoides vivos em amostras à fresco.

Figura 2. Parâmetros de normalidade seminal (OMS,2010).

Parâmetro espermático	Valores normais
Volume	> 1,5 mL
pH	> 7,2
Cor	Branco opalescente
Liquefação	< 30min, completa
Viscosidade	Normal
Concentração espermática	> 15×10^6 espermatozoides por mililitro de sêmen
Número total de espermatozoides	> 39×10^6 espermatozoides por ejaculado
Motilidade	> 32% de espermatozoides móveis progressivos e > 40% de espermatozoides móveis totais
Morfologia	> 4% com formas normais
Vitalidade	> 58% formas vivas

1.3 Criopreservação

A criopreservação é um componente importante no tratamento da infertilidade e preservação da fertilidade. Sua aplicação facilita e melhora os resultados dos tratamentos de reprodução assistida (TRA). É um procedimento que torna possível estabilizar as células a temperaturas criogênicas. Com os grandes avanços na criopreservação hoje é possível manter uma grande variedade de tipos celulares armazenados em baixas temperaturas, incluindo gametas masculinos e femininos além de embriões (13). A criopreservação de gametas masculinos começou em 1779 por Lázaro Spallanzani (14). Ele observou que os espermatozoides poderiam ser congelados na neve, mantendo assim sua viabilidade. No ano de 1954, foi descrita a primeira gravidez utilizando-se sêmen congelado (15). Finalmente no ano 1963, foi demonstrado que o armazenamento em nitrogênio líquido poderia manter o sêmen congelado por longos períodos de tempo (16).

Atualmente, a criopreservação é reconhecida como um procedimento eficiente para a preservação da fertilidade masculina antes dos tratamentos de doenças malignas que podem levar à insuficiência testicular ou disfunção ejaculatória (17), ou doenças não malignas como a diabetes e transtornos autoimunes. A criopreservação também é utilizada para a inseminação homóloga ou heteróloga e para o armazenamento de espermatozoides prévio aos TRA (18).

1.4 Técnicas de congelamento

Existem duas técnicas convencionais de congelamento usadas em criopreservação de espermatozoides: congelamento lento e congelamento rápido. O congelamento lento foi proposto por Behrman e Sawada em 1996 (19), sendo que a técnica consiste na queda gradual da temperatura para alcançar a temperatura final de armazenamento da amostra (-80°C ou -196°C) podendo esta ser manual ou automática usando um congelador semi-programável

(20). O congelamento rápido foi relatado pela primeira vez por Sherman em 1990, a amostra é inicialmente homogeneizada com o crioprotetor numa proporção 1:1 e deixada para incubar a 4°C por 10 minutos. Posteriormente o procedimento requer contato direto entre as palhetas e os vapores de nitrogênio por 8–10 minutos e imersão em nitrogênio líquido a -196°C. Essa técnica é a mais utilizada hoje em dia, devido à sua boa reprodutibilidade e boas taxas de sobrevivência.

A vitrificação é outra técnica de criopreservação, na qual não existe formação de gelo intracelular, essa técnica é baseada em aumento seguido de diminuição ultra-rápida das temperaturas com ou sem o uso de crioprotetores, tornando esse procedimento menos trabalhoso, mais rápido e presumivelmente mais seguro em comparação com os protocolos tradicionais de congelamento lento (21).

Todas as técnicas descritas acima danificam o espermatozoide. Durante a criopreservação a taxa metabólica é reduzida e o espermatozoide sofre mudanças funcionais e estruturais devido à exposição aos crioprotetores e à formação de cristais de gelo (22). O resfriamento pode levar a alterações nos lipídeos de membrana alterando também, as proteínas de membrana responsáveis pelo transporte de íons (23). O processo de congelamento-descongelamento resulta em danos na fluidez e integralidade da membrana plasmática (24). Os espermatozoides possuem abundantes fosfolipídios nas membranas e são vulneráveis ao estresse oxidativo que leva à peroxidação lipídica, perda de enzimas e inibição da fosforilação oxidativa (25). Estudos indicam que podem ocorrer variações no conteúdo acrossômico (26), alterações na funcionalidade mitocondrial, descondensação da cromatina (27), e fragmentação do DNA (28).

1.5 Armazenamento das amostras

O uso de *containers* de nitrogênio líquido é a forma mais empregada para o armazenamento das amostras após o congelamento (9). No entanto esse armazenamento não está livre de dano. Já foi demonstrado que existe um aumento a fragmentação de DNA dos espermatozoides o que pode piorar nos tratamento de fertilização *in vitro* (29,30). Estudos também indicam a presença de fungos, bactérias e vírus nos *containers* (31) o que aumentaria o risco de contaminação cruzada das amostras. Além disso, é necessário o suprimento contínuo de nitrogênio líquido para manter as amostras, o que envolve altos custos de manutenção.

1.6 Liofilização espermática

Outras técnicas que não requerem nitrogênio líquido estão sendo desenvolvidas para o armazenamento das amostras de espermatozoides em longo prazo. O estabelecimento da conservação espermática por liofilização ou “*freeze-drying sperm*” começou no ano 1949. Polge e colaboradores (1949) utilizaram o sêmen de um galináceo misturado com igual volume de solução de Ringer contendo 20-30% de glicerol e submeteu tal amostra ao congelamento à seco, removendo 90% da água da solução. Nas preparações de reidratação, 50% dos espermatozoides readquiriram a sua motilidade, entretanto, a fertilidade não foi testada (32). O primeiro estudo que testou espermatozoides humanos liofilizados foi realizado por Sherman e colaboradores em 1954, sendo que não se obteve nenhum espermatozoide vivo após a reidratação (33). Portanto, o grupo concluiu que o processo afeta a vitalidade e motilidade dos espermatozoides. Subseqüentes tentativas feitas por *Bialy e Smith* em 1957 para congelar a seco espermatozoides humanos e de touros para obtenção de células viáveis falharam (34).

No ano 1990, Goto e colaboradores revolucionaram os sistemas de conservação de gametas masculinos ao sugerirem que, não há necessidade de que os espermatozoides estejam vivos, no sentido convencional, para proporcionar um desenvolvimento embrionário normal. Esta teoria foi comprovada por estes pesquisadores quando reportaram o nascimento de dois bezerros normais após microinjeção de espermatozoides mortos (35).

Da mesma forma, em 1992, foi demonstrado que núcleos de espermatozoides congelados a seco de hamster e humanos retinham sua habilidade para se desenvolver em pró-núcleo e sintetizar DNA, quando microinjetados após seis meses de estocagem (36).

Hoshi e colaboradores, em 1994, demonstraram o desenvolvimento embrionário a partir do uso de espermatozoides de coelho liofilizados, utilizando a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) (37). Após quatro anos, Wakayama e Yanagimachi obtiveram a primeira prole de camundongos derivada de espermatozoides liofilizados (38). Tal estudo determinou que a ausência de viabilidade fisiológica não significa ausência de viabilidade cromossômica.

Espermatozoides de camundongo liofilizados com um meio protetor à base de Tris-HCl e ácido tetra-acético etileno-glicol (EGTA) mantiveram a integridade cromossômica e quase 100% dos ovócitos microinjetados apresentaram cariótipo normal (39). *Kaneko et, al* em 2003 demonstraram que a capacidade do desenvolvimento embrionário está no núcleo independentemente dos danos causados pela liofilização para o resto das organelas celulares dos espermatozoides (40), sugerindo também que a viabilidade celular e nuclear não são sinônimos.

Em 2004, *Liu* e colaboradores demonstraram a importância de liofilizar sêmen de coelhos devido a sua similaridade com espermatozoides humanos, uma vez ambos são responsáveis pela herança do centrossomo (41). Em 2009, foi descrito a ocorrência de prole viável e saudável em camundongos a partir de sêmen liofilizado (42).

No ano 2008, foi publicado um estudo com sêmen humano em que foi utilizada uma solução tampão com EGTA e foi concluído que não houve nenhuma alteração cromossômica nos grupos de estudo das amostras. Portanto, foi descrito pela primeira vez a possibilidade de se liofilizar espermatozoides humanos sem ocorrência de aberrações do DNA (43).

Finalmente, *Giarnoli* e colaboradores, em 2012, estudaram 30 amostras de sêmen humano. O grupo utilizou solução tampão de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e manteve as amostras a 4°C até sua reidratação. Cada amostra foi dividida para criopreservação em nitrogênio líquido e liofilização. A análise contava com os seguintes parâmetros: contagem, motilidade, morfologia, viabilidade, integridade do DNA, estado cromossômico e propriedades de birrefringência de espermatozoides humanos liofilizados e criopreservados comparados com os mesmos parâmetros na amostra fresca. Embora a viabilidade e a motilidade do esperma estivessem totalmente comprometidas após a liofilização, à estrutura da cromatina de esperma não foi alterada em comparação com amostras frescas, o que sugere que o procedimento de liofilização não afeta a integridade do DNA (9).

Recentemente, em 2016, nosso grupo de pesquisa avaliou a ultraestrutura do espermatozoide humano submetido à liofilização pela técnica de microscopia eletrônica de transmissão. A análise demonstrou danos causados na membrana plasmática, acrossoma, núcleo, peça média, mitocôndrias, estrutura de flagelo, microtúbulos, axonema e fibras densas ocasionadas pela liofilização. Essas alterações variaram conforme o meio utilizado na liofilização. Todos os espermatozoides após liofilização demonstraram ausência de motilidade e DNA 100% fragmentado (44).

Posteriormente, em 2017, foi avaliada a ultraestrutura do espermatozoide humano submetido ao processo de liofilização utilizando a microscopia eletrônica pela técnica de varredura com utilização de diferentes meios de cultivos. O autor concluiu que os

espermatozoides após o processo, apresentaram alterações ultraestruturais evidentes, assim como comprometimento da sua capacidade funcional de manter íntegro o DNA nuclear (45).

Assim ambos os estudos indicaram a necessidade de novas pesquisas relacionadas a técnicas diferentes de liofilização na esperança de se encontrar a melhor maneira de proteção para os espermatozoides durante o processo.

1.7 Métodos de avaliação da integridade espermática/ membrana

1.7.1 Annexina V-Iodeto de propidium.

O kit de detecção de apoptose *Annexin V-FLUOS Staining* baseia-se na observação de que logo após o início do apoptose, as células translocam a fosfatidilserina da face interna da membrana plasmática para a superfície celular. Uma vez na superfície celular a fosfatidilserina pode ser facilmente detectado por coloração com um conjugado fluorescente de Annexina V (AV), uma proteína que tem uma alta afinidade pela fosfatidilserina. O kit conta também com o corante de iodeto de propídio (IP) que pode diferenciar o processo de apoptose e necrose. Assim, quando a célula apresentar somente apoptose inicial será AV positivo, mas se a célula estiver em apoptose tardia ou necrose será AV e IP duplo positiva. No entanto quando a membrana celular estiver íntegra nenhum dos corantes penetra a célula, permanecendo a mesma não marcada (duplo negativa). A utilização de anexina V e IP gera uma medida indireta da viabilidade celular (46) (Figura 3). A detecção pode ser analisada por citometria de fluxo ou por microscopia de fluorescência. No presente trabalho, utilizamos a citometria de fluxo como forma de análise.

A apoptose é um tipo de morte celular programada ou "suicídio celular". É diferente da necrose, na qual as células morrem devido a lesões. Necrose e apoptose ocorrem em diferentes circunstâncias e envolvem etapas diferentes. Simplificando, a necrose é desordenada e causa uma resposta imune da inflamação, enquanto a apoptose é ordenada e

divide a célula em pequenas embalagens que podem ser absorvidas e recicladas por outras células (47).

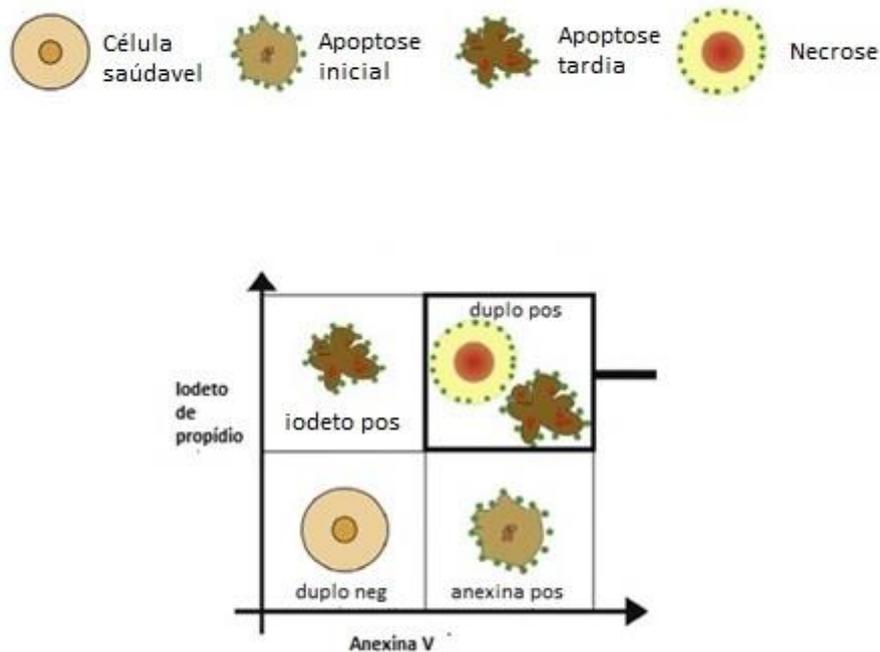


Figura 3. Marcação celular usando o kit *Annexin V Staining*. Adaptado de Pietkiewicz S et, al. (2015)

1.8 Citometria de fluxo.

A citometria de fluxo é uma tecnologia que permite análise simultânea e multiparamétrica de células ou partículas em suspensão, avaliando-as individualmente. À medida que o fluxo de amostra passa por um ou mais feixes de luz (gerados por um ou mais *lasers*), o sistema óptico-eletrônico registra a forma como as estruturas dispersam a luz do *laser* incidente, captando as fluorescências emitidas por os corantes de Iodeto de Propídio e Anexina V. Assim, o equipamento obtém informações de diversos parâmetros, como tamanho relativo, complexidade interna e intensidades de fluorescências de cada célula ou partícula avaliada (48).

Devido ao limitado número de estudos que avaliaram o impacto da liofilização na viabilidade do espermatozoide, das limitadas formas de avaliação e da importância dessa alternativa na preservação do gameta masculino, realizamos este estudo com a finalidade de

avaliar a viabilidade celular de espermatozóides humanos liofilizados utilizando marcadores de integridade da membrana celular: Anexina V e Iodeto de Propídio.

OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi avaliar a viabilidade celular de espermatozoides humanos liofilizados utilizando marcadores de integridade da membrana celular por meio da técnica de citometria de fluxo.

MATERIAIS E METODOS

O presente foi um estudo prospectivo experimental. A pesquisa teve duração de fevereiro/2018 até outubro/2019, após aprovação pelo Comitê de Ética em pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP/UFMG) (CAAE 31828614.0.0000.5149), (ANEXO 1). Um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE, ANEXO 2) foi lido e assinado pelos participantes do estudo. Os critérios de inclusão foram: homens saudáveis, com idade maior que 18 anos e com disponibilidade de doar as amostras na Clínica Origen, em Belo Horizonte.

3.1 Coleta e processamento das amostras

Todas as amostras de sêmen foram colhidas, por masturbação, em sala adequada, em frasco coletor estéril e levadas o laboratório. Uma hora após a coleta, as amostras de sêmen, as mesmas foram avaliadas para verificação dos critérios de adequação. Os critérios finais de inclusão no estudo foram pacientes com espermograma normal, tendo sido avaliados os seguintes parâmetros seminais: motilidade, concentração, vitalidade e morfologia (OMS, 2010).

As 32 amostras que apresentaram os parâmetros necessários foram codificadas para proteção da identidade dos voluntários, e fracionados em duas alíquotas para realização pareada dos dois procedimentos propostos: criopreservação em nitrogênio líquido (preservação usual-Grupo controle) e liofilização (procedimento em avaliação pelo presente projeto-Grupo de estudo).

3.2 Criopreservação das amostras

A criopreservação das amostras foi realizada utilizando-se o congelamento em nitrogênio líquido (49). Resumidamente, o crioprotetor comercial TEST-Yolk Buffer (No. 90128, Irvine Scientific, Santa Ana, USA) foi adicionado de forma gradual à alíquota destinada à criopreservação, em proporções iguais (1:1). A solução final foi homogeneizada e acondicionada aos tubos criogênicos com o volume final de 2mL. Posteriormente foram colocadas no vapor de nitrogênio líquido por 30 minutos. Todas as amostras foram armazenadas em racks de alumínio para acondicionamento de criotubos e imersas no nitrogênio líquido, organizadas dentro do banco de sêmen da Clínica Origen, com dados de identificação e data de criopreservação das amostras para rastreabilidade das mesmas. O período de criopreservação máximo foi de 2 meses.

3.3 Liofilização das amostras

O preparo das amostras para liofilização foi realizado pela adição de solução tamponada 10 mM Tris-HCl e 1mM de EDTA (Sigma, USA) numa proporção 1:1. As amostras ficaram armazenadas a 4 °C por um período de 5 a 7 dias antes do processo da liofilização (50).

A liofilização foi realizada no Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais. Os parâmetros utilizados para liofilização foram: temperatura inicial de -30 °C, secagem inicial a 0,37 mbar por 13 horas e secagem final 0,001 mbar por 6 horas para um tempo total de 19,5 horas (51). Foi utilizado liofilizador LIOBRAS (São Paulo, Brasil).

Após liofilização, todas as amostras foram mantidas a 4°C até o momento de reidratação para testes posteriores. A manutenção das amostras liofilizadas ocorreu no Laboratório da Clínica Origen, com dados de identificação e data de liofilização das amostras para rastreabilidade das mesmas. O período de armazenamento máximo foi de 2 meses.



Figura 4. Liofilizador LIOBRAS utilizado para desidratação das amostras. Faculdade de farmácia UFMG.



Figura 5.(A) amostra antes da liofilização, (B) amostra após a liofilização.

3.4 Preparação das amostras para testes de viabilidade celular

Tanto as amostras criopreservadas quanto as liofilizadas foram transportadas da Clinica Origen para as instalações do Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores do Instituto René Rachou, Fiocruz/MG, para realização das análises de vitalidade. O transporte

das amostras criopreservadas foi realizado em galão de transporte de nitrogênio líquido e as amostras liofilizadas foram transportadas em caixa térmicas, conforme regras de transporte de amostras biológicas (52).

3.4.1 Descongelamento das amostras

As amostras criopreservadas foram retiradas do nitrogênio líquido, e colocadas em banho-maria a 37°C por 1 minuto. O conteúdo dos tubos criogênicos foi transferido para tubos de poliestireno. As amostras foram então lavadas, pela adição de 2mL de *Gamete Buffer* (Sydney, Australia) e centrifugadas a 533 g por 10 minutos a 4°C. Foi usado a centrífuga HERAEUS MEGAFUGE 40R (Langensfeld, Alemanha). O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* foi ressuscitado em 1 mL de *Gamete Buffer* (Sydney, Australia) e foi realizado uma segunda lavagem sob os mesmos parâmetros. O *pellet* final foi ressuscitado e homogeneizado em 1mL de Tampão Fosfato salino (PBS 1X).

3.4.2 Reidratação das amostras

As amostras liofilizadas foram reidratadas com 1 mL de água para transferência de embrião (W150, Sigma Aldrich, USA) previamente filtrada a 0,20 µm. Após a reidratação, as amostras foram homogeneizadas e avaliadas quanto à presença de grumos. Em caso de formação de grumos, as amostras eram homogeneizadas com uso de micropipeta para a obtenção de uma suspensão celular homogênea.

Foi realizado a contagem de todas as amostras na Câmara de Neubauer e tiveram volume final ajustado para $2,0 \times 10^6$ células/mL. Suspensão que foi levada para as avaliações subsequentes.

3.5 Teste de *Annexina V-Iodeto de propidium*.

Para o preparo do reagente foi usado 20µl do corante *Annexin V-FLUOS (AV)*, 1mL de tampão de incubação e adicionado 20µl do Iodeto de propidium (IP). O *pellet* final (após o preparo da amostra seminal) foi ressuscitado e homogeneizado em 100 µl *Annexin V-FLUOS Labeling Solution* e incubado por 15 minutos para a análise no citômetro de fluxo.

3.6 Análise por citometria de fluxo

Cada uma das amostras foi analisada em tubos de poliestireno transparente, no Citômetro FACSCalibur da marca Becton Dickinson (New Jersey, USA), com o filtro 530/30, e o laser Diodo 633nm. Como padrão, foram lidas até 20.000 eventos. Após a leitura os resultados foram analisados no software FlowJo.

Foram consideradas dois tipos de análises: a primeira foi a análise *Gated* quando foi utilizada a estratégia de seleção no software FlowJo para a análises da subpopulação homogênea. O segundo tipo foi a análises *Ungated* quando não foi utilizado a estratégia de seleção.

3.7 Testes de *Annexina V-Iodeto de propidio* em amostras a fresco.

Foram avaliadas inicialmente cinco amostras à fresco com a finalidade de ter o parâmetro de referência de marcação celular. A preservação da integridade de membrana para o grupo a fresco foi de 60-70% e a morte celular aconteceu principalmente pela necrose em 30-40%.

3.8 Análises estatística

Para a análise, foi utilizado o pacote estatístico IBM SPSS Statistics Data Editor V23 em sua versão portátil. As variáveis quantitativas foram resumidas com média, desvio padrão e mediana. O teste *t de Student* foi aplicado para as variáveis quantitativas e foi considerado $P < 0,05$ como estatisticamente significativo.

RESULTADOS

Foram analisadas 32 amostras seminais de doadores saudáveis, com idade média de $39 \pm 6,2$ anos variando de 31 a 50 anos. A média de dias de abstinência sexual dos pacientes foi de $3,8 \pm 0,8$ dias, variando de 3 a 6 dias. Quando realizamos a leitura final pela citometria de fluxo, duas amostras foram consideradas com padrão de citometria inadequado (*outliers*) e por tanto foram excluídas do estudo.

4.1 Análise das amostras à fresco.

O tempo de liquefação completa para as análises das amostras variou de 15 a 30 minutos. Ao exame macroscópico todas as amostras foram de cor branca opalescente, pH > 7,2 viscosidade e aparência normal. Ao exame microscópico todas as amostras apresentaram morfologia normal e vitalidade > 58%. As descrições dos demais parâmetros seminais se encontram na Tabela 1.

Tabela 1. Descrição dos parâmetros seminais segundo a OMS (2010) das 32 amostras à fresco.

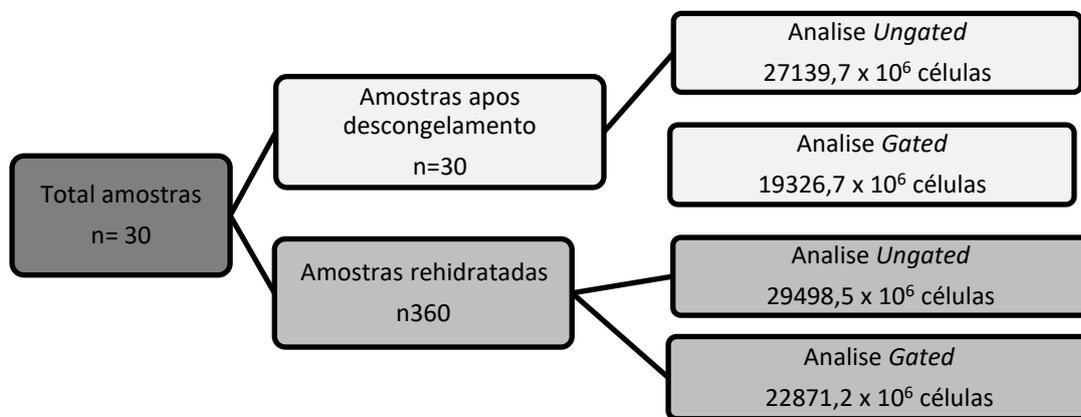
	Media±DP (n=32)
Volume (mL)	3,3±1,4
Concentração (N° de espermatozoides em milhões/ mL)	54,9±34,1
Moveis progressivos A+B (%)	46,9±10,8
Moveis não progressivos C (%)	8,6±4,4
Imóveis D (%)	40,7±10,9
Morfologia	Normal

As 32 amostras foram, inicialmente incluídas no estudo e as comparações foram feitas com amostras pareadas (criopreservadas e liofilizadas). As variáveis foram analisadas após o descongelamento ou a reidratação das amostras. O tempo médio de armazenamento foi de 2 meses.

4.2 Testes de *Annexina V-Iodeto de propidio*.

O resultado obtido foi classificado segundo o tipo de marcação apresentada: necrose (Duplo positivo), apoptose tardia (IP positivo AV negativo), apoptose inicial (AV positivo IP negativo), integridade da membrana celular preservada (Duplo negativo) (Figura 8). As amostras foram analisadas com o parametro *Ungated e Gated*. Na Figura 9 se apresenta a distribuição e o número de células analisadas. Cada um das amostras foi dividida para criopreservação e liofilização respectivamente por tanto ao final obtivemos 30 amostras para a análise.

Figura 6. Distribuição total das amostras pareadas para o análise após o descongelamento e reidratação, e contagem final do número de células analisadas.



4.3 Análises das amostras sem a estratégia de seleção (*UnGated*).

4.3.1 Amostras criopreservadas.

As amostras criopreservadas, apresentaram morte principalmente por necrose na media de 30,2%. A integridade da membrana foi preservada em 38,7% da população com um valor mínimo de 14,6% e máximo de 59,4% (Tabela 2). Na Tabela A (Anexo) se apresentam os resultados da marcação celular para cada uma das amostras.

Tabela 2. Resultado da marcação celular com Anexina V sem filtragem (*Ungaed*) do total das amostras criopreservadas usando o teste de *Annexina V-Iodeto de propidio*.

Amostra criopreservada	Amostra a fresco
---------------------------	---------------------

Tipo de marcação	Media (n=30)	Mediana (n=30)	Media (n=5)
Duplo Positivo	30,2 ± 14,7	30,8	30±10
PI positivo			
AV negativo	24,2±13,9	25,6	0
AV positivo	6,7 ± 8,1	3,4	0
IP negativo			
Duplo Negativo	38,7 ± 10,8	39,4	60±10

4.3.2 Amostras liofilizadas

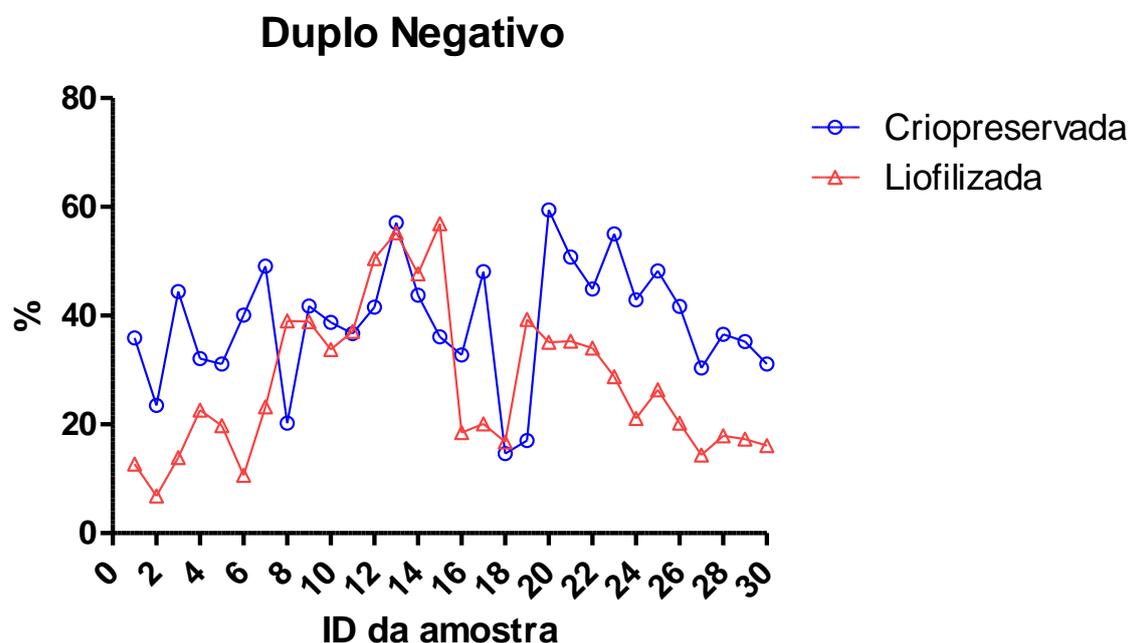
As amostras liofilizadas apresentaram 34,7% de morte por apoptose tardia e 33,5% por necrose, a presença de integridade de membrana foi de 27,6% com valor mínimo de 6,8% e máximo de 56,9% (Tabela 3). Na Tabela B (Anexo) se apresentam os resultados da marcação celular para cada uma das amostras.

Tabela 3. Resultado da marcação celular com Anexina V sem filtragem (*UnGated*) do total das amostras liofilizadas usando o teste de *Annexina V-Iodeto de propidio*.

	Amostra liofilizada	Amostra a fresco	
Tipo de marcação	Media (n=30)	Mediana (n=30)	Media (n=5)
Duplo positivo	33,5 ± 21,9	28,7	30±10
PI positivo			
AV negativo	34,7±17,6	32,6	0
AV positivo			
IP negativo	3,9 ± 2,7	3,1	0
DuploNegativo	27,6 ± 13,5	22,9	60±10

Foram feitas as comparações dos resultados duplo negativo das amostras Criopreservadas e Liofilizadas *UnGated*. Na Tabela C (Anexo) apresentamos os resultados da marcação duplos negativos para cada uma das amostras. A Figura 7 ilustra o comportamento de marcação celular duplo negativo das amostras Criopreservadas e Liofilizadas *UnGated*.

Figura 7. Comportamento de marcação com Anexina V das amostras Criopreservadas e Liofilizadas sem a estratégia de seleção (*UnGated*).



Para ambos os grupos a morte celular ocorreu principalmente pela necrose e apoptose tardia (Duplo positivo) sendo 13,8 % maior para a população liofilizada comparada com a população criopreservada. A preservação de integridade da membrana celular (Duplo negativo) foi de 38,7 % para as amostras criopreservadas e 27,6% para as liofilizadas, resultado significativo maior no grupo da criopreservação ($p= 0,0004$) (Tabela 4).

Tabela 4. Comparação entre os valores da marcação com Anexina V obtidos para as amostras criopreservadas e liofilizadas sem a estratégia de seleção (*UnGated*).

Tipo de marcação	Ungated Criopreservada	Ungated Liofilizada	Valor de p
Duplo Positivo	30,2 ± 14,7	33,5 ± 21,9	-
PI positivo			
AV negativo	24,2±13,9	34,7±17,6	-
AV positivo			
IP negativo	6,7 ± 8,1	3,9 ± 2,7	
Duplo Negativo	38,7 ± 10,8	27,6 ± 13,5	0,0004

A Figura 8 ilustra o comportamento padrão de duas amostras analisadas criopreservadas (1a, 2a, 3a) e liofilizadas (1b, 2b, 3b) e a comparação da marcação sem filtragem duplo negativo das amostras.

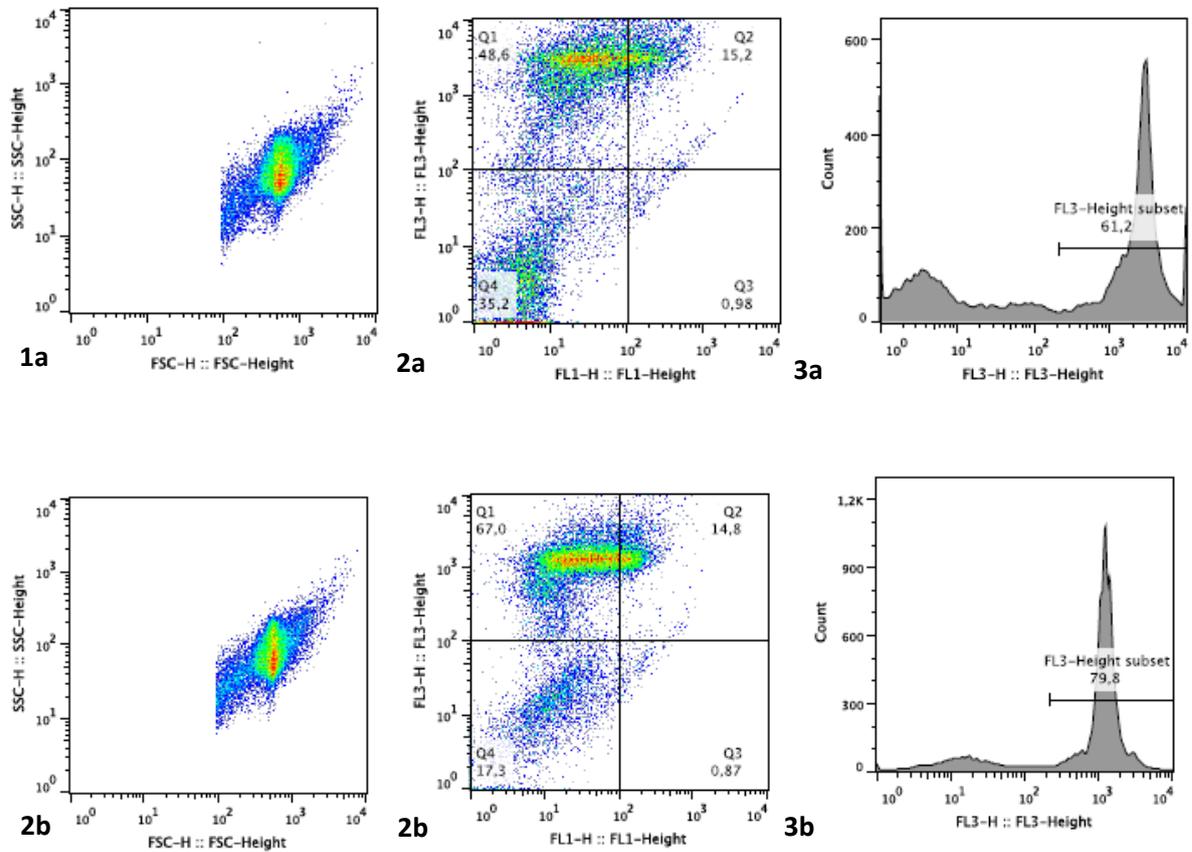
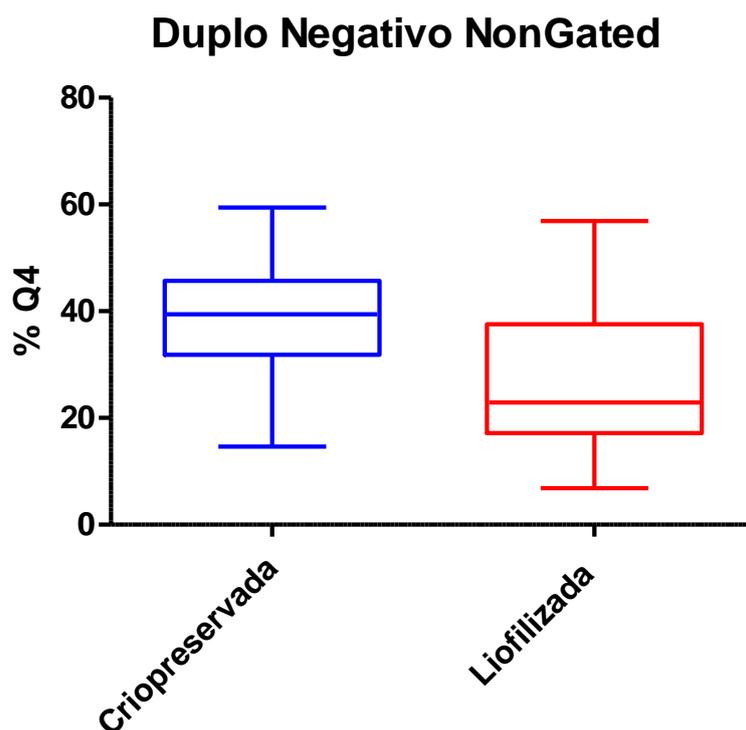


Figura 8. Comparação entre as amostras após descongelamento e reidratação. 1a população *Ungated* criopreservada analisada. 1b população *Ungated* liofilizada. 2a e 2b marcação celular segundo o corante de morte celular Q1 (IP positivo AV negativo) e Q2 (Duplo positivo), Q3 (AV positivo IP negativo), Q4 (Duplo negativo). 3a e 3b histograma de morte celular por apoptose tardia e necrose.

A figura 9 ilustra a comparação dos resultados da marcação duplo negativo com Anexina V das amostras criopreservadas e liofilizadas sem a estratégia de seleção (*Ungated*).

Figura 9. Comportamento de marcação com Anexina V das amostras Criopreservadas e Liofilizadas sem a estratégia de seleção (*UnGated*).



4.4 Análises das amostras com a estratégia de seleção (*Gated*).

4.4.1 Amostras criopreservadas

As amostras criopreservadas, apresentaram morte principalmente por necrose na média de 34,4%. A integridade de membrana foi preservada em 30,2% da população com um valor mínimo de 12,4% e máximo de 68,9% (Tabela 5). Na Tabela D (Anexo) apresentamos a marcação celular para cada uma das amostras.

Tabela 5. Resultado da marcação celular com Annexina V com a estratégia de seleção (*Gated*) do total das amostras criopreservadas usando o teste de *Annexina V-Iodeto de propídio*.

	Amostra criopreservada		Amostra a fresco
Tipo de marcação	Media (n=30)	Mediana (n=30)	Media (n=5)
Duplo Positivo	34,4 ± 17,9	34,8	30±10
PI positivo	31,1±14,5	31,2	0

AV negativo			
AV positivo			
IP negativo	4,2 ± 5,5	2,9	0
Duplo Negativo	30,2 ± 13,1	29,6	60±10

4.4.2 Amostras liofilizadas

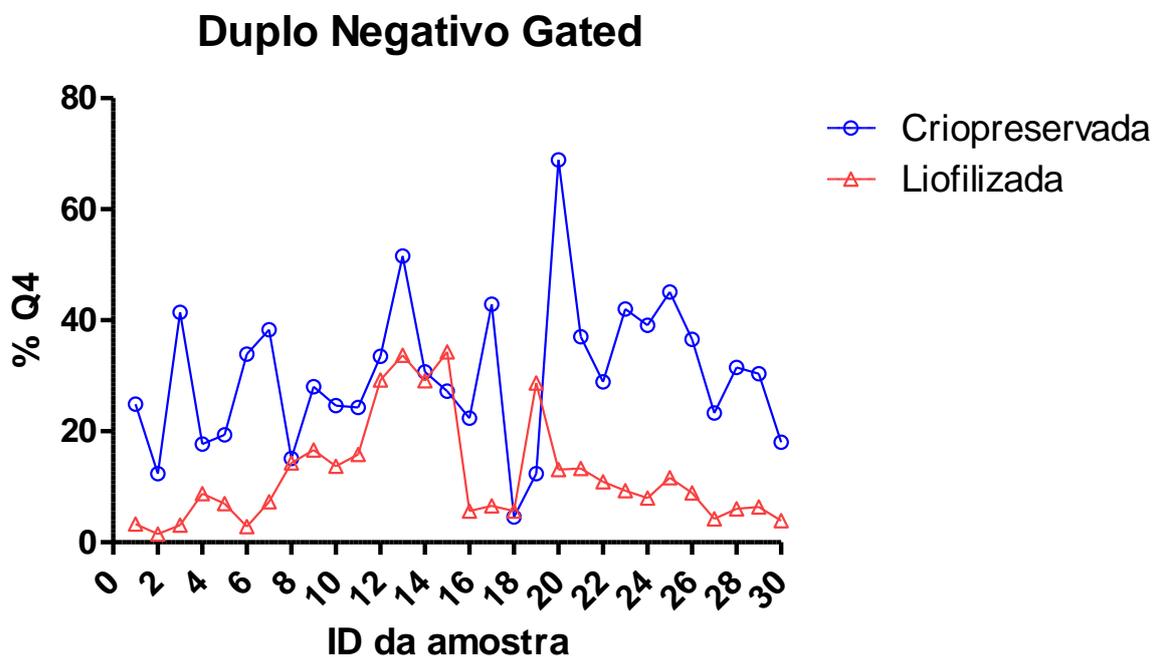
As amostras liofilizadas apresentaram 40,2% de morte por apoptose tardia e 42,2% por necrose, a presença de integridade de membrana foi de 12% com valor mínimo de 1,4% e máximo de 34,3% (Tabela 6). Na Tabela E (Anexo) apresentamos a marcação celular para cada uma das amostras.

Tabela 6. Resultado da marcação celular com Anexina V com a estratégia de seleção (Gated) do total das amostras liofilizadas usando o teste de Annexina V-Iodeto de propídio.

	Amostra liofilizada		Amostra a fresco
Tipo de marcação	Media (n=30)	Mediana (n=30)	Media (n=5)
Duplo Positivo	42,2 ± 26	38,5	30±10
PI positivo			
AV negativo	40,6± 24	45,9	0
AV positivo			
IP negativo	5 ± 5,4	4,3	0
Duplo Negativo	12 ± 9,5	8,8	60±10

Foram feitas as comparações dos resultados duplo negativo das amostras Criopreservadas e Liofilizadas *Gated*. A Tabela F (Anexo) apresentamos os resultados da marcação celulares duplos negativos para cada uma das amostras. A Figura 10 ilustra o comportamento de marcação celular duplo negativo das amostras das amostras Criopreservadas e Liofilizadas *Gated*.

Figura 10. Comportamento de marcação das amostras com Anexina V Criopreservadas e Liofilizadas com a estratégia de seleção (*Gated*).



Para ambos os grupos a morte celular ocorreu principalmente pela necrose e apoptose tardia (Duplo positivo) sendo 17,4% maior para a população liofilizada comparada com a população criopreservada. A preservação de integridade de membrana celular (Duplo negativo) foi de 30,2% para as amostras criopreservadas e 12% para as liofilizadas, resultado estatisticamente significativo em favor da criopreservação ($p= 0,0001$) (Tabela 7).

Tabela 7. Comparação entre os valores da marcação celular com Anexina V obtidos para as amostras criopreservadas e liofilizadas com a estratégia de seleção (*Gated*).

Tipo de marcação	<i>Gated</i> Criopreservada	<i>Gated</i> Liofilizada	Valor de p
Duplo Positivo	34,4 ± 17,9	42,2 ± 26	-
PI positivo			
AV negativo	31,1±14,5	40,6± 24	-
AV positivo			
IP negativo	4,2 ± 5,5	5 ± 5,4	-

Duplo Negativo	30,2 ± 13,1	12 ± 9,5	0,0001
-----------------------	-------------	----------	--------

A Figura 11 ilustra o comportamento padrão das duas amostras analisadas criopreservadas (1a, 2a, 3a) e liofilizadas (1b, 2b, 3b) e faz a comparação da marcação com a estratégia de seleção duplo negativo das amostras.

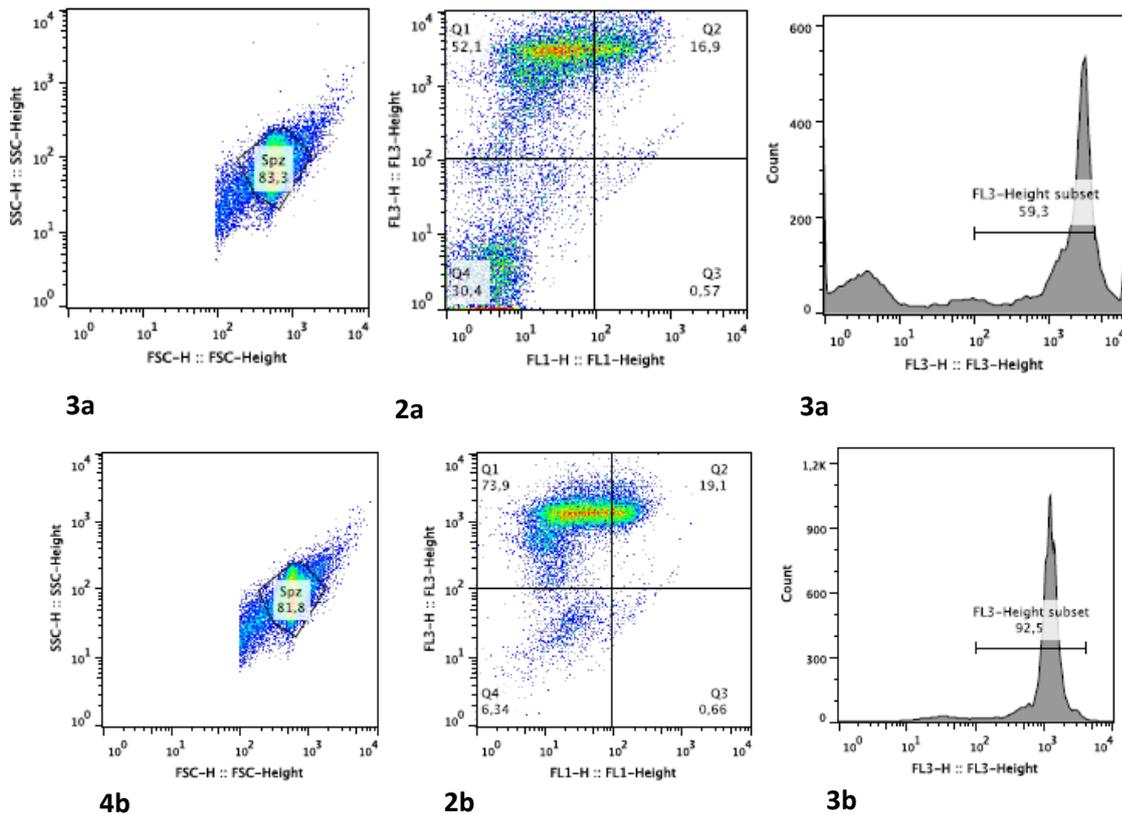
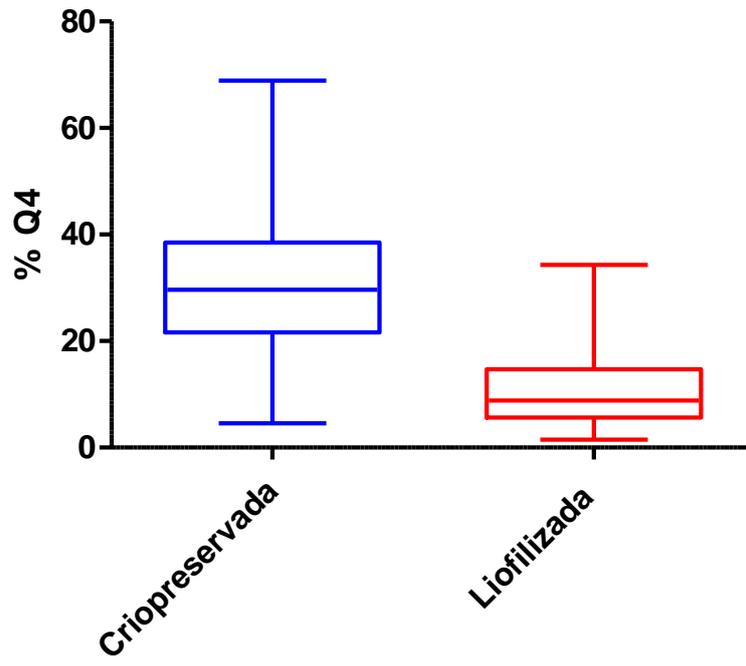


Figura 11. Comparação entre as amostras após descongelamento e reidratação. 1a população *Gated* criopreservada analisada. 1b população *Gated* liofilizada. 2a e 2b marcação celular segundo o corante de morte celular Q1(IP positivo AV negativo), Q2 (Duplo positivo), Q3 (AV positivo IP negativo), Q4 (Duplo negativo). 3a e 3b histograma de morte celular por apoptose tardia e necrose.

A Figura 12 ilustra a comparação dos resultados da marcação duplo com Anexina V das amostras criopreservadas e liofilizadas com a estratégia de seleção (*Gated*).

Figura 12. Comportamento de marcação das amostras com Anexina V Criopreservadas e Liofilizadas com a estratégia de seleção (*Gated*).

Duplo Negativo Gated



DISCUSSÃO

Nosso estudo demonstrou, provavelmente pela primeira vez, a viabilidade celular em espermatozoides humanos liofilizados utilizando os corantes Anexina V e iodeto de propídio como marcadores indiretos da preservação da integridade da membrana celular por meio da técnica de citometria de fluxo. Para ter uma base de comparação a mesma análise foi feita em amostras criopreservadas, de maneira convencional, em nitrogênio líquido, utilizando um crioprotetor de eficácia comprovada ou o meio de cultura tamponado com EDTA para o processo da liofilização (53). Os meios que contem as amostras no momento da liofilização são importantes e podem influenciar nos resultados finais da preservação do espermatozoide. *Wakayama* em 1998, foi o primeiro em obter espermatozoides de camundongos viáveis após liofilização utilizando meio de cultivo durante o processo (38). Posteriormente *Kusakabe et al*, demonstrou que espermatozoides de camundongos e humanos poderiam ser liofilizados sem danos cromossômicos utilizando de um meio tamponado com 10mM Tris-HCl, 50 mMNaCl e 50 mM de EGTA, com a finalidade de proteger os espermatozoides dos danos próprios da liofilização (43). O EGTA funciona como um quelante e previne a ação de endonucleases que são liberadas pelas membranas lesadas das células. Posteriormente no ano 2001 o mesmo autor comprovou que outros agentes quelantes, como o EDTA, também tem eficácia na prevenção a danos cromossômicos nos espermatozoides (39).

A descoberta mais relevante foi à presença de integridade de membrana celular em espermatozoides humanos liofilizados e reidratados.

O estudo incluiu amostras seminais normais de acordo com os parâmetros descritos pela OMS (2010), com a finalidade de obter uma população homogênea para nossas análises. Duas amostras foram excluídas do estudo, pois não apresentaram o padrão de citometria

esperado e foram consideradas *outliers*. Assim reduzimos a possibilidade de viés de seleção amostral.

Foram avaliadas amostras após liofilização e após o congelamento de sêmen humano em amostras pareadas. Assim, a mesma amostra seminal foi dividida em duas alíquotas diferentes, uma para liofilização e outra para criopreservação, isso permitiu retirar possíveis viés que poderiam influenciar no resultado final. A análise foi feita usando os parâmetros *UnGated* e *Gated* para cada par de amostras. O tipo *Gated* é uma estratégia de seleção disponível nos softwares de citometria de fluxo que permite identificar uma subpopulação celular mais homogênea tendo em conta determinado padrão de distribuição ou estimando a densidade populacional diferencial (54). Por outro lado, o parâmetro *UnGated* analisa todo o grupo populacional celular sem nenhum tipo de discriminação, portanto a estratégia de seleção *Gated* no presente estudo contribuiu eliminando a população de restos celulares como caudas, cabeças espermáticas, espermatogonias e debrís diminuindo o viés de informação e confusão para nossas análises.

Identificamos, após a análise de 28.318 células, a presença de viabilidade espermática pós-liofilização de 27,6% usando o parâmetro *UnGated* e 12% com a estratégia de seleção *Gate*. As amostras criopreservadas em nitrogênio líquido tiveram resultados também menores com média de 38,7% com o parâmetro *UnGated* e 30,2% com a estratégia de seleção *Gate*. Acreditamos que os resultados nos espermatozoides pós-liofilização foram menores comparados com os espermatozoides criopreservados, devido à agressividade mesma do processo de secagem na liofilização e dano possivelmente irreversível à membrana plasmática.

O dano à membrana plasmática ocorre pelas diferentes vias de morte celular. Na via inicial ou de apoptose a fosfatidilserina é exposta sob a superfície celular, seguido por a

formação de bolhas na membrana, fragmentação nuclear, diminuição do volume celular e formação de corpos apoptóticos (55). Assim a fosfatidilserina exposta é detectada por a proteína AV. Posteriormente a morte pela necrose inclui ruptura precoce da membrana plasmática, citoplasma rápido e inchaço nuclear e decomposição de organelas gerando dupla coloração AV e IP positivos (56).

A perda da integridade da membrana plasmática pode ser causada por diferentes fatores. Como já foi relatada em estudos anteriores (57,58) a viabilidade dos espermatozoides diminui após o descongelamento, a razão mais provável para isso parece ser o ambiente físico e químico ao qual o espermatozoide é exposto (59). A formação de cristais de gelo é o principal fator físico que afeta a célula (60). Além disso, o intercâmbio celular de água durante as fases iniciais do procedimento provoca inchaços e encolhimentos das células (61). Ainda, as rápidas mudanças na osmolaridade frequentemente causam deformações nas membranas celulares (62). Em contrapartida o efeito mais notável do processo de liofilização de espermatozoides até hoje conhecido é a perda total de motilidade e viabilidade após a reidratação das amostras. Kusakabe *et al* (2008) (63), Gianaroli *et al* (2016) (9) Kaneko *et al* (2003) (40) observaram após teste de vitalidade que todos os espermatozoides murinos, pós-liofilização, estavam altamente corados, indicando danos à membrana plasmática. Esses espermatozoides foram considerados fisiologicamente mortos pelos pesquisadores. O DNA do sêmen liofilizado também já foi analisado em diferentes estudos (9,63) que observaram que apesar de os espermatozoides estarem fisiologicamente mortos ainda possuíam DNA íntegro. Kusakabe *et al* (50), injetaram espermatozoides humanos, pós-liofilização, em oócitos de camundongos e conseguiram demonstrar que, apesar da ausência de motilidade, o conteúdo acrosômico se mantinha íntegro e era capaz de permitir o desenvolvimento embrionário. Portanto o nascimento da prole nos modelos animais indica que esses efeitos têm implicações funcionais, mas o espermatozoide liofilizado ainda tem a capacidade de

induzir fertilização e desenvolvimento embrionário quando é usada a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) nos tratamentos de reprodução assistida.

A liofilização é uma técnica promissora que permite a diminuição dos custos de manutenção das amostras uma vez que não utiliza nitrogênio líquido para armazenamento. Além disso, há uma redução no espaço necessário para armazenamento e diminuição do risco de perdas acidentais durante manipulação das amostras. O transporte também se torna mais fácil e mais econômico, permitindo o frete para mundo inteiro sem maiores complicações. Consideramos que uma das falhas do estudo foi não incluir nas análises amostras ao fresco pareadas, no entanto existem dificuldades laboratoriais e técnicas que fazem impossível incluí-las no estudo.

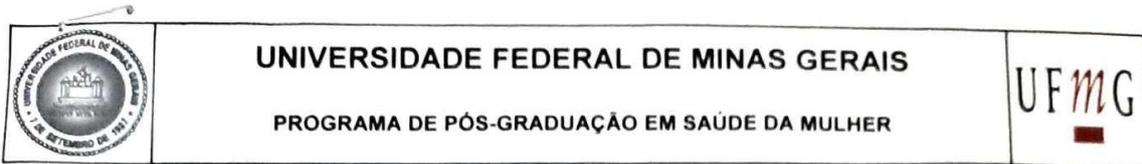
Nos últimos anos, o campo de pesquisa para novos tipos de armazenamento de gametas se expandiu e a liofilização dos espermatozoides é uma das novas alternativas para sua preservação (64). No entanto, antes que esse tipo de armazenamento possa ser implementado rotineiramente, outros estudos devem ser realizados para demonstrar que essa nova técnica de preservação não compromete a função final dos gametas da TARV. Isso inclui a avaliação dos aspectos genéticos e epigenéticos, bem como dos embriões, fetos e filhotes. A criopreservação é uma técnica já padronizada há muito tempo, possivelmente por isso os resultados de integridade de membrana foram melhores comparados com os espermatozoides liofilizados (nova técnica de preservação).

Mais estudos são necessários para que haja a implementação da liofilização como técnica rotineira nas clínicas de Reprodução Assistida, no entanto o seguinte passo seria estabelecer se o espermatozoide após a liofilização ainda tem seu DNA íntegro e se tem a capacidade de fertilizar normalmente. Parâmetros como temperatura, pressão, tempo e meio de liofilização devem ser otimizados para que se consigam ótimas amostras liofilizadas.

CONCLUSÃO

Nosso estudo demonstrou a presença de viabilidade celular de espermatozoides humanos após liofilização utilizando os corantes Anexina V e iodeto de propídio como marcadores indiretos da preservação da integridade da membrana celular por meio da técnica de citometria de fluxo.

ANEXOS



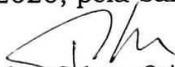
FOLHA DE APROVAÇÃO

LIOFILIZAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS

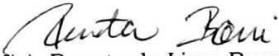
CATALINA ISABEL QUILINDO GIRALDO

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em SAÚDE DA MULHER, como requisito para obtenção do grau de Mestre em SAÚDE DA MULHER, área de concentração PATOLOGIA GINECOLÓGICA E REPRODUÇÃO.

Aprovada em 21 de fevereiro de 2020, pela banca constituída pelos membros:


Prof(a). Selmo Geber - Orientador
UFMG


Prof(a). Andrea Teixeira de Carvalho
Fiocruz


Prof(a). Renata de Lima Bossi
ORIGEN

Belo Horizonte, 21 de fevereiro de 2020.

ANEXO 1

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: IMPACTO DA TÉCNICA DE LIOFILIZAÇÃO NA PRESERVAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS

Pesquisador: Selmo Geber

Área Temática: Reprodução Humana (pesquisas que se ocupam com o funcionamento do aparelho reprodutor, procriação e fatores que afetam a saúde reprodutiva de humanos, sendo que nessas pesquisas serão considerados "participantes da pesquisa" todos os que forem afetados pelos procedimentos delas).
(Reprodução Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP);

Versão: 1

CAAE: 31828614.0.0000.5149

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina da UFMG

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 743.984

Data da Relatoria: 18/07/2014

Apresentação do Projeto:

A criopreservação é uma técnica de fundamental importância para a medicina reprodutiva, pois permite o armazenamento de embriões, oócitos e espermatozoides para futuro tratamento. Permite ainda a existência de bancos de oócitos e espermatozoides com a finalidade de doação de gametas para pessoas inférteis. Várias técnicas para congelamento de gametas e embriões foram desenvolvidas ao longo dos anos. A técnica de congelamento lento consiste na queda gradual da temperatura para alcançar a temperatura final de armazenamento da amostra (-80 ou -196 graus centígrados). Diversos tipos e combinações de crioprotetores podem ser utilizados com essa técnica. A vitrificação é uma outra técnica de criopreservação na qual não existe a formação de cristais de gelo intracelular. Uma mudança de estado líquido para um estado vítreo ocorre, proporcionada por altas concentrações de crioprotetores e /ou uma rápida queda da temperatura. Em ambos os casos, a amostra é armazenada em nitrogênio líquido, por período indeterminado. A liofilização é uma técnica amplamente utilizada para desidratação de produtos alimentícios, farmacêuticos, produtos biotecnológicos, vacinas, materiais biológicos e diagnósticos. Consiste na

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad S1 2005
Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901
UF: MG Município: BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4592 E-mail: coep@prpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 743.904

passagem do material do estado sólido diretamente para o estado gasoso – sublimação - mantendo-se a temperatura suficientemente baixa sob uma baixa pressão. A técnica começou a ser utilizada com sucesso para armazenamento de sêmen de animais, em 1998. Em humanos, o primeiro artigo foi descrito em 2008, e até o momento poucos estudos foram publicados. O desenvolvimento dessa técnica permitirá o armazenamento de espermatozoides sem a necessidade de nitrogênio líquido, reduzindo os potenciais riscos, os custos e principalmente os problemas com espaço para armazenamento. Assim, o objetivo do estudo é padronizar uma técnica de liofilização para preservar espermatozoides humanos. Serão avaliadas as diferentes temperatura, pressão do vácuo, período de desidratação, meio das amostras no momento da liofilização e temperatura de estocagem das amostras. Serão analisados motilidade, concentração, vitalidade e morfologia seminal, com sêmen fresco, congelado pelo método tradicional em nitrogênio líquido e liofilizado.

Serão avaliadas as diferentes variáveis aplicadas no processo de liofilização de espermatozoides, dentro de cada fator que afeta a sua eficácia, isto é, temperatura, pressão do vácuo, período de desidratação, meio de cultura das amostras no momento da liofilização e temperatura de estocagem das amostras. Serão analisados motilidade, concentração, vitalidade e morfologia seminal, com sêmen fresco, congelado pelo método tradicional em nitrogênio líquido e liofilizado.

Serão avaliadas as diferentes variáveis aplicadas no processo de liofilização de espermatozoides, dentro de cada fator que afeta a sua eficácia, isto é, temperatura, pressão do vácuo, período de desidratação, meio de cultura das amostras no momento da liofilização e temperatura de estocagem das amostras. Serão analisados os parâmetros seminais como motilidade, concentração, vitalidade e morfologia.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Padronizar uma técnica de liofilização para preservar espermatozoides humanos.

Objetivo Secundário:

Avaliar a eficácia do método como alternativa para preservação de espermatozoides

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Por se tratar de um estudo que vai analisar o uso de uma técnica de preservação de amostras de espermatozoides e esses não serão utilizados

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad Sl 2005
Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901
UF: MG Município: BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4592 E-mail: coep@prpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 743.984

posteriormente, não existem riscos relacionados.

Benefícios:

O sucesso no desenvolvimento dessa técnica uma alternativa com menor custo, maior facilidade e menos riscos para a preservação de espermatozoides.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O aprimoramento das técnicas de criopreservação é de grande valia para a medicina reprodutiva. Aprofundamento nessa área do conhecimento, com a descoberta de novos métodos, é essencial para a continuidade dos avanços nesse campo, por isso se fazem necessárias mais pesquisas relacionadas a essa área do conhecimento.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatória foram apresentadas

Recomendações:

Não há recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado segundo parecer.

Continuação do Parecer: 743.984

BELO HORIZONTE, 08 de Agosto de 2014

Assinado por:
Telma Campos Medeiros Lorentz
(Coordenador)

ANEXO 2-TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Gostaríamos de convidá-lo a participar da pesquisa que estamos realizando no Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais. O objetivo da pesquisa é desenvolver um novo método para preservar espermatozoides (liofilização) e comparar com o método que já existe e é utilizado de rotina (congelamento). A sua participação consistirá em permitir o uso da amostra de sêmen que você colheu para fazer o espermograma, para testarmos o método de liofilização e compararmos com o congelamento. Parte da amostra do seu sêmen será liofilizado e outra parte congelada. Em seguida será submetido ao processo inverso (hidratação e descongelamento) e analisado. Após a análise, todas as partes da amostra serão desprezadas, não sendo usadas para nenhuma outra aplicação. Por ser uma avaliação do sêmen já colhido, o estudo não apresenta riscos nem transtornos para você. Essa pesquisa poderá ajudar a desenvolver uma técnica nova que irá facilitar a preservação de espermatozoides, para todos os homens. Serão resguardadas a sua identidade e privacidade, sendo consideradas confidenciais todas as informações pessoais. Serão divulgadas apenas os resultados da pesquisa, em eventos medico-científicos ou publicações científicas, sem qualquer identificação dos participantes. Se você não participar ou retirar sua autorização, a qualquer momento, não haverá prejuízo para você. Eu, _____, após a leitura deste documento, declaro que conversei com o/a pesquisador/a responsável, para esclarecer todas as minhas dúvidas, estando suficientemente informado a respeito dos objetivos da pesquisa, dos possíveis danos ou riscos deles provenientes e da garantia de confidencialidade e de esclarecimentos sempre que desejar. Declaro estar ciente de que a participação no estudo é voluntária e que não farei jus a nenhum tipo de remuneração ou indenização ao final da pesquisa, sendo a revogação deste consentimento permitida a qualquer tempo, por escrito, mediante recibo, sem qualquer penalidade. Diante do exposto, expresso minha concordância de espontânea vontade em participar deste estudo e permito ao pesquisador a utilização dos dados obtidos, para serem incluídos na pesquisa, sem que isso implique na minha identificação.

ASS. participante.....

ASS. pesquisador:.....

SelmoGeber (tel: 34099764) CRM: 22188

COEP/UFMG – Av. Antônio Carlos, 6627 Unidade Administrativa II - 2º andar - Sala 2005
Campus Pampulha Belo Horizonte, MG – Brasil - 31270-901 - Tel34094592

DATA:____/____/____ BELO HORIZONTE – MG

ANEXO A

Tabela 3. Resultados de marcação ceular para cada uma das amostras criopreservadas
Ungated.

Duplo Positivo	IP positivo AV negativo	AV positivo IP negativo	Duplo Negativo
27,9	6,13	30	35,9
53,7	5,35	17,5	23,5
24,6	7,94	23	44,4
35,8	8,31	23,8	32,1
31,4	29,4	8,11	31,1
26,4	8,07	25,4	40,1
34,6	11,8	4,5	49,1
39,1	39,6	1,17	20,2
15	39,7	3,5	41,8
30,2	26,2	4,81	38,8
33,5	25	4,84	36,7
21	33,1	4,31	41,6
31,4	3,3	8,26	57,1
25,2	22,9	8,13	43,8
30,6	26,2	7,21	36,1
4,41	62,7	0,14	32,8
11,7	39,4	0,82	48,1
71	11,7	2,64	14,6
54,4	26,9	1,69	17
0,56	40,1	0	59,4
23,7	22	3,49	50,8
31	18,7	5,37	44,9
12	31,1	1,81	55
36,3	19,1	1,76	42,9
37,1	12,4	2,29	48,2
27,8	29	1,59	41,7
37,8	30,3	1,57	30,4
32,1	29,8	1,47	36,6
15,2	48,6	0,98	35,2
53	13,7	2,19	31,1

Anexo B

Tabela 5. Resultados de marcação celular para cada uma das amostras liofilizadas.

Duplo Positivo	IP positivo AV negativo	AV positivo IP negativo	Duplo Negativo
60,1	19,3	7,89	12,7
77	11,2	4,96	6,82
68,8	14	3,25	13,9
48,5	24,1	4,86	22,6
51,4	26,3	2,48	19,8
64,9	12,6	11,9	10,6
62	11,7	3,08	23,2
27,2	31,7	2,09	39
32,2	23,5	5,41	38,9
31,3	29,5	5,41	33,8
22,5	35,4	5,06	37,1
10,9	32,8	5,79	50,5
7,16	32,4	5,18	55,2
11	35,5	5,77	47,7
11,6	24,5	7,08	56,9
21,2	59,7	0,61	18,5
63,7	13,8	2,41	20,1
70	10,6	2,56	16,8
15,8	43,8	1,1	39,3
24,4	33,8	6,66	35,1
4,71	58,5	1,5	35,3
23	37,3	5,73	34
30,3	32,4	8,5	28,8
31,7	44,8	2,39	21,1
23,9	47,7	1,99	26,4
5,47	73,6	0,76	20,2
43,8	39,6	2,2	14,4
15	66	1,1	17,9
14,8	67	0,87	17,3
33,2	50,4	0,22	16,1

Anexo C

Tabela7. Resultados duplo negativo para amostras Criopreservadas vs Liofilizadas
UnGated.

N° da amostra	Duplo Negativo Criopreservada	Duplo Negativo Liofilizada
1	35,9	12,7
2	23,5	6,82
3	44,4	13,9
4	32,1	22,6
5	31,1	19,8
6	40,1	10,6
7	49,1	23,2
8	20,2	39
9	41,8	38,9
10	38,8	33,8
11	36,7	37,1
12	41,6	50,5
13	57,1	55,2
14	43,8	47,7
15	36,1	56,9
16	32,8	18,5
17	48,1	20,1
18	14,6	16,8
19	17	39,3
20	59,4	35,1
21	50,8	35,3
22	44,9	34
23	55	28,8
24	42,9	21,1
25	48,2	26,4
26	41,7	20,2
27	30,4	14,4
28	36,6	17,9
29	35,2	17,3
30	31,1	16,1

Anexo D

Tabela 8. Resultados de marcação celular para cada uma das amostras criopreservadas *Gated*.

Duplo Positivo	IP positivo AV negativo	AV positivo IP negativo	Duplo Negativo
33,7	35,8	5,66	24,9
63,2	20,3	4,11	12,4
25,6	25,8	7,26	41,4
44,6	30,2	7,48	17,7
40	11	29,6	19,4
29,9	28,9	7,39	33,9
43,3	15,4	2,99	38,3
40,7	43,2	0,89	15,1
16,8	52,3	2,96	28
36,9	34,7	3,71	24,6
39,5	32,3	3,89	24,3
16,6	46,1	3,8	33,5
31,9	5,88	10,6	51,6
27,9	34	7,33	30,7
29,6	36,8	6,41	27,2
3,77	73,7	0,099	22,4
11,1	45,4	0,59	42,9
81,8	12,4	1,22	4,55
57,8	28,1	1,64	12,4
0,0051	31,1	0	68,9
30,2	29,9	2,9	37
44,2	20,7	6,31	28,9
12,2	43,7	2	42
39,8	19,7	1,4	39,1
40,5	12,5	1,98	45,1
31,3	31,3	0,77	36,6
43,4	32,5	0,86	23,3
36	31,8	0,73	31,5
16,9	52,1	0,57	30,4
65	15,5	1,52	18

Anexo E

Tabela 10. Resultados de marcação celular para cada uma das amostras liofilizadas.

Duplo Positivo	IP positivo AV negativo	AV positivo IP negativo	Duplo Negativo
74,4	9,65	12,6	3,33
88	4,81	5,71	1,48
83,5	3,8	9,57	3,08
64,9	6,13	20,2	8,77
68	2,69	22,4	6,94
75,3	12,9	8,9	2,85
78,4	13	1,33	7,27
38,2	46,1	1,44	14,3
44,8	33,8	4,74	16,6
41,5	40,6	4,21	13,7
29,4	50,3	4,48	15,8
13,7	51,5	5,56	29,2
7,26	53,4	5,68	33,7
11,5	54,2	5,22	29,1
14,9	44,2	6,53	34,3
24	70	0,3	5,62
76,7	15,3	1,46	6,56
81,2	11,6	1,55	5,65
21,5	49,2	0,67	28,7
35,4	45,8	5,74	13,1
6,85	78,1	1,75	13,3
31,4	51,8	5,89	10,9
38,9	45,5	6,34	9,31
43,5	46,3	2,27	7,95
32,7	53,2	2,44	11,6
7,25	83,3	0,59	8,88
52	42,7	1,12	4,23
19,5	73,7	0,75	6,06
19,1	73,9	0,66	6,34
44,9	51,1	0,13	3,91

Anexo F

Tabela 12. Resultados duplo negativo para amostras Criopreservadas vs Liofilizadas

Gated.

N° da amostra	Duplo Negativo Criopreservada	Duplo Negativo Liofilizada
1	24,9	3,3
2	12,4	1,4
3	41,4	3
4	17,7	8,7
5	19,4	6,9
6	33,9	2,8
7	38,3	7,2
8	15,1	14,3
9	28	16,6
10	24,6	13,7
11	24,3	15,8
12	33,5	29,2
13	51,6	33,7
14	30,7	29,1
15	27,2	34,3
16	22,4	5,6
17	42,9	6,5
18	4,5	5,6
19	12,4	28,7
20	68,9	13,1
21	37	13,3
22	28,9	10,9
23	42	9,3
24	39,1	7,9
25	45,1	11,6
26	36,6	8,8
27	23,3	4,2
28	31,5	6
29	30,4	6,3
30	18	3,9

REFERENCIAS

1. Montoya JM, Bernal A, Borrero C. Diagnostics in assisted human reproduction. *Reprod Biomed Online*. 2002; 5(2):198-210.
2. Agarwal A, Mulgund A, Hamada A, Chyatte MR. A unique view on male infertility around the globe. *Reprod Biol Endocrinol*. 2015;2:13-37.
3. Schenker JG. Assisted reproduction practice in Europe: legal and ethical aspects. *Hum Reprod Update*. 1997; 3(2): 173-184.
4. Schieve LA, Reynolds MA. What is the most relevant standard of success in assisted reproduction? Challenges in measuring and reporting success rates for assisted reproductive technology treatments: What is optimal?, *Hum Reprod*, 2004,19(4) 778-782.
5. Lakryc, E, Rodrigues R, Panovyk D, Monteleone P, Motta E. Modelo de impacto orçamentário da aplicação do single embryo transfer consecutivo comparado com o double embryo transfer em tratamentos de fertilização in vitro no Sistema de Saúde Suplementar. *Brazilian Journal of Health Economics/Jornal Brasileiro de Economia da Saúde*. 2019; 11(3) 10-14.
6. Herndon CN, Anaya Y, Noel M, Cakmak H, Cedars MI. Outcomes from a university based lowcost in vitro fertilization program providing access to care for a low-resource socioculturally diverse urban community. *Fertil Steril*. 2017; 108(4):642-649.
7. Hovatta O, Cooke I. Cost-effective approaches to in vitro fertilization: means to improve access. *Int J Gynecol Obstet* 2006; 94:287–291.
8. Saragusty J, Loi P. Exploring dry storage as an alternative biobanking strategy inspired by Nature. *Theriogenology*. 2019; 126 (1):17-27.
9. Gianaroli L, Magli MC, Stanghellini I, Crippa A, Crivello AM, Pescatori ES, et al. DNA integrity is maintained after freeze-drying of human spermatozoa. *Fertil Steril*. 2012; 97(5):1067-1073.
10. Flesch FM, Barend MG.. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization *Biochim Biophys Acta*. 2000; 1469(3): 197-235.
11. Guzick DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P, Brazil CK, Nakajima ST, Coutifaris C, et al. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *N Engl J Med* 2001; 345(19):1388–1393.

12. Cánovas S, Pilar C. Aspectos moleculares de la fecundación: unión y fusión de gametos. *Rev Invest Clín.* 2008; 60(5): 403-413.
13. Di Santo M, Tarozzi N, Nadalini M, Borini A. Human Sperm Cryopreservation: Update on Techniques, Effect on DNA Integrity, and Implications for ART. *Adv Urol.* 2012, 2012: 85483.
14. Sztejn JM, Takeo T, Nakagata N. History of cryobiology, with special emphasis in evolution of mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology.* 2018; 82:57-63.
15. Bunge RG, Sherman JK. Frozen human semen. *Fertil Steril.* 1954; 5:193-194.
16. Walters EM, Benson JD, Woods EJ, Critser JK. The history of sperm cryopreservation. *Sperm banking theory and practice.* Cambridge University Press, London. 2009; 1-17.
17. Dearing CG, Jayasena CN, Lindsay KS. Human sperm cryopreservation in cancer patients: Links with deprivation and mortality. *Cryobiology.* 2017; 79:9-13.
18. Anger JT, Gilbert BR, Goldstein M. Cryopreservation of sperm: indications, methods and results. *J Urol.* 2003;170(4):1079-1084.
19. Behrman SJ, Sawada Y. Heterologous and homologous inseminations with human semen frozen and stored in a liquid-nitrogen refrigerator. *Fertil Steril.* 1996; 17(4) 457-466.
20. Isachenko E, Isachenko V, Katkov II, Dessole S, Nawroth F. Vitrification of mammalian spermatozoa in the absence of cryoprotectants: from past practical difficulties to present success. *Reprod Biomed Online.* 2003; 6(2): 191-200.
21. Katkov II, Isachenko V, Isachenko E, Kim MS, Lulat A, Mackay AM et al. Low-and high-temperature vitrification as a new approach to biostabilization of reproductive and progenitor cells. *International Journal of Refrigeration.* 2006; 29(3): 346-357.
22. Gómez-Torres MJ, Medrano L, Romero A, Fernández-Colom PJ, Aizpurúa J. Effectiveness of human spermatozoa biomarkers as indicators of structural damage during cryopreservation. *Cryobiology.* 2017; 78: 90-94.
23. Oehninger S, Duru NK, Srisombut C, Morshedi M. Assessment of sperm cryodamage and strategies to improve outcome. *Mol Cell Endocrinol.* 2000; 169 (2): 3-10.
24. Chatterjee S, Gagnon C. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing, *Mol. Reprod.* 2001; 59 (3): 451-458.
25. Wang X, Sharma RK, Sikka SC, Thomas AJ Jr, Falcone T, Agarwal A. Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility. *Fertil Steril.* 2003; 80(3): 531-535.

26. Boitrelle F, Albert M, Theillac C, Ferfour F, Bergere M, F, Vialard, R et al. Cryopreservation of human spermatozoa decreases the number of motile normal spermatozoa, induces nuclear vacuolization and chromatin decondensation, *J. Androl.* 2012; 33 (6):1371-1378.
27. F. Boitrelle, M. Albert, C. Theillac, F. Ferfour, M. Bergere, F. Vialard, R. Wainer, M. Bailly, J. Selva, Cryopreservation of human spermatozoa decreases the number of motile normal spermatozoa, induces nuclear vacuolization and chromatin decondensation, *J. Androl.* 33 (2012) 1371e1378.
28. Chohan KR, Griffin JT, Carrell DT. Evaluation of chromatin integrity in human sperm using acridine orange staining with different fixatives and after cryopreservation. *Andrologia.* 2004; 36 (5):321-326.
29. Sakkas D, Alvarez JG. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril.* 2010; 93(4): 1027-1036.
30. Sakkas D, Alvarez JG. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin impact on reproductive outcome, and analysis. *Revista Mexicana de Medicina de la Reproducción.* 2011; 3(4): 160-175.
31. Clarke GN. Sperm cryopreservation: is there a significant risk of cross-contamination. *Hum Reprod.*1999; 14(12): 2941-2943.
32. Polge C, Smith AU, Parkes AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature.*1949; 164(4172): 666.
33. Sherman JK. Freezing and freeze-drying of human spermatozoa. *Fertil Steril.* 1954; 5(4): 357-371.
34. Bialy G, Smith VR. Freeze-drying of bovine spermatozoa. *J Dairy Sci.* 1957; 40(7): 739-745.
35. Goto K, Kinoshita A, Takuma Y, Ogawa K. Fertilisation of bovine oocytes by the injection of immobilised, killed spermatozoa. *Vet Rec.* 1990; 127 (21): 517-520.
36. Katayose H, Matsuda J, Yanagimachi R. The ability of dehydrated hamster and human sperm nuclei to develop into pronuclei. *Biol Reprod.* 1992; 47(2): 277-284.
37. Hoshi K, Yanagida K, Katayose H, Yazawa H. Pronuclear formation and cleavage of mammalian eggs after microsurgical injection of freeze-dried sperm nuclei. *Zygote.* 1994; 2(3): 237-242.
38. Teruhiko W, Yanagimachi R. Development of normal mice from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. *Nat Biotechnol.* 1998; 16(7): 639

39. Kusakabe Hirokazu, Szczygiel MA, Whittingham DG, Yanagimachi, R. Maintenance of genetic integrity in frozen and freeze-dried mouse spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98(24): 13501-13506.
40. Kaneko T, Whittingham DG, Overstreet JW, Yanagimachi R. Tolerance of the mouse sperm nuclei to freeze-drying depends on their disulfide status. *Biol Reprod*. 2003; 69(6): 1859-1862.
41. Liu, JL, Kusakabe H, Chang CC, Suzuki H, Schmidt DW, Julian M, et al. Freeze-dried sperm fertilization leads to full-term development in rabbits. *Biol Reprod*. 2004; 70(6): 1776-1781.
42. Li MW, Willis BJ, Griffey SM, Spearow JL, Lloyd, KC. Assessment of three generations of mice derived by ICSI using freeze-dried sperm. *Zygote*. 2009; 17(3): 239-251.
43. Kusakabe H, Yanagimachi R, Kamiguchi Y. Mouse and human spermatozoa can be freeze-dried without damaging their chromosomes. *Hum Reprod*. 2007; 23(2): 233-239.
44. Bossi. Análise da ultraestrutura do espermatozoide humano após liofilização.[tesis doctoral].Belo Horizonte: Biblioteca digital, Universidade Federal de Minas Gerais;2016.
45. Araujo. Avaliação ultraestrutural e funcional do espermatozoide humano submetido ao processo de liofilização.[tesis doctoral].Belo Horizonte: Biblioteca digital, Universidade Federal de Minas Gerais;2017.
46. Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*. 1994; 84(5): 1415-1420.
47. Conte AM, Silva PM. Morte Celular por Apoptose: uma visão bioquímica e molecular. *Metrocamp pesquisa* 2007, 1(1): 37-58.
48. Schwartz A, Fernández-Repollet E. Development of clinical standards for flow cytometry. *Ann N Y Acad Sci*. 1993; 677: 28-39
49. Anger JT, Gilbert BR, Goldstein M. Cryopreservation of sperm: indications, methods and results. *J Urol*. 2003; 170(4): 1079-1084
50. Kusakabe H, Yanagimachi R, Kamiguchi Y. Mouse and human spermatozoa can be freeze-dried without damaging their chromosomes. *Hum Reprod*. 2007; 23(2): 233-239.

51. Kawase Y, Hani T, Kamada N, Jishage K, Suzuki H. Effect of pressure at primary drying of freeze-drying mouse sperm reproduction ability and preservation potential. *Reproduction*. 2007; 133(4): 841-846.
52. Aires CAM, Araujo CF, Lisboa M, Rusak LA, Assis U, Montenegro DC, et al. Biossegurança em transporte de material biológico no âmbito nacional: um guia breve. *Rev Pan-Amaz de Saude*. 2015; 6(2): 73-81.
53. Amidi F, Pazhohan A, Shabani Nashtaei M, Khodarahmian M, Nekoonam S. The role of antioxidants in sperm freezing: a review. *Cell Tissue Bank*. 2016; 17(4): 745-756.
54. Spidlen J, Leif RC, Moore W, Roederer M. International Society for the Advancement of Cytometry Data Standards Task Force, Brinkman RR. Gating-ML: XML-based gating descriptions in flow cytometry. *Cytometry A*. 2008; 73(12):1151-1157
55. Krammer PH, Arnold R, Lavrik IN. Life and death in peripheral T cells. *Nat Rev Immunol*. 2007; 7(7): 532-542.
56. Vanden Berghe T, Vanlangenakker N, Parthoens E, Deckers W, Devos M, Festjens N et al. Necroptosis, necrosis and secondary necrosis converge on similar cellular disintegration features. *Cell Death Differ*. 2010; 17(6): 922-930.
57. Hallak J, Sharma RK, Wellstead C, Agarwal A. Cryopreservation of human spermatozoa: comparison of TEST-yolk buffer and glycerol. *Int J Fertil Womens Med*. 2000;45(1):38-42.
58. Wang X, Sharma RK, Sikka SC, Thomas AJ Jr, Falcone T, Agarwal A. Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility. *Fertil Steril*. 2003; 80(3): 531-535.
59. Ozkavukcu A, Erdemli E, Isik A, Oztuna D, Karahuseyinoglu S. Effects of cryopreservation on sperm parameters and ultrastructural morphology of human spermatozoa. *J Assist Reprod Genet*. 2008; 25:403-411.
60. Morris GJ. Rapidly cooled human sperm: no evidence of intracellular ice formation. *Hum Reprod* 2006; 21(8):2075–2083.
61. Medeiros CMO, Forell F, Oliveira ATD, Rodrigues JL. Current status of sperm cryopreservation: Why isn't it better? *Theriogenology* 2002; 57(1): 327–344.
62. Alamaneni SS, Agarwal A, Rama S, Ranganathan P, Sharma RK. Comparative study on density gradients and swim-up preparation techniques utilizing neat and cryopreserved spermatozoa. *Asian J Androl* 2005;7(1):86–92.

63. Kusakabe H, Yanagimachi R, Kamiguchi Y. Mouse and human spermatozoa can be freeze-dried without damaging their chromosomes. *Hum Reprod.* 2008; 23(2):233-239.
64. Olaciregui M, Gil L. Freeze-dried spermatozoa: A future tool? *Reprod Domest Anim.* 2017; 52 Suppl 2:248-254.