

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Faculdade de Medicina

Renata de Lima Bossi

**ANÁLISE DA ULTRAESTRUTURA DO ESPERMATOZOIDE HUMANO
APÓS LIOFILIZAÇÃO**

Belo Horizonte

2016

RENATA DE LIMA BOSSI

**ANÁLISE DA ULTRAESTRUTURA DO ESPERMATOZOIDE HUMANO
APÓS LIOFILIZAÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Doutora.

Área de concentração:
Reprodução Humana e Patologia Ginecológica.

Orientador: Dr.Selmo Geber

Belo Horizonte

Faculdade de Medicina – UFMG

2016

Agradecimentos

Primeiramente, meu agradecimento especial, ao meu orientador Professor Doutor Selmo Geber, que ao longo dos anos vem me acompanhando e proporcionando meu crescimento profissional;

Agradeço ao Dr. Marcos Sampaio, por instigar a busca por conhecimento e por confiar a mim o laboratório de FIV da Origen há mais de 12 anos;

Aos professores da Faculdade de Medicina pelos saberes compartilhados;

À Professora Mônica Oliveira e Dra. Sávila Caldeira pela receptividade e pela ajuda essencial no desenvolvimento da pesquisa;

Aos funcionários do Centro de Microscopia da UFMG, especialmente Janine e Kinulpe, pelo empenho dedicado ao projeto;

Às amigas e amigos da Clínica Origen pelo auxílio no desenvolvimento da pesquisa, debates construtivos e pela compreensão durante meus momentos de ausência;

Aos amigos e alunos da UNA, que contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional;

Aos pacientes que colaboraram com pesquisa, depositando sua confiança em nossos atos;

Aos meus pais, pela inspiração e modelo de perseverança que sempre foram para mim;

Aos meus irmãos Guilherme, Isabela, Leonardo, Henrique e Fernando que tornaram essa jornada menos árdua promovendo momentos de descontração;

Ao Theo, meu filho, que me trouxe momentos de plena felicidade;

Ao meu marido Samuel, meu pilar, que sempre me apoiou e esteve ao meu lado me fazendo superar qualquer obstáculo.

Sabemos o que somos, mas não sabemos o que poderemos ser.

William Shakespeare

RESUMO

A criopreservação é uma técnica de fundamental importância para a medicina reprodutiva, pois permite o armazenamento de embriões excedentes, oócitos e espermatozoides para futuros tratamentos. Os crioprotetores são substâncias que tem a função de proteger as células contra a formação de cristais de gelo durante o congelamento e evitar que haja uma concentração letal de solutos mantendo a capacidade funcional das organelas celulares. Várias técnicas de congelamento seminal já foram desenvolvidas como: congelamento lento, rápido, vitrificação, congelamento em zona pelúcida vazia. O crioprotetor mais utilizado com essas técnicas é o glicerol. O armazenamento das amostras após congelamento usualmente é feito em nitrogênio líquido. 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. Ela vem sendo utilizada como alternativa ao congelamento convencional uma vez que a desidratação do sêmen elimina a necessidade do armazenamento em nitrogênio líquido ou em gelo seco. Além disso, o armazenamento, em longo prazo, teria um custo reduzido, pois menos espaço seria necessário para manter as amostras. O transporte dessas amostras seria facilitado, sendo possível o envio desse material para qualquer lugar do mundo sem maiores complicações e riscos. Outro fato importante a ser considerado é que a liofilização já demonstrou inativar vírus envelopados e não envelopados. Estudos demonstram que a liofilização causa danos às estruturas espermáticas. O objetivo desse estudo foi analisar a ultraestrutura espermática após liofilização do sêmen humano utilizando a microscopia eletrônica de transmissão. Foram utilizados quatro meios para liofilização: *Freeze medium*, *Sperm Freeze Medium*, mHTF e EDTA. As amostras foram congeladas no método convencional como controle. Vinte e uma amostras foram utilizadas no estudo. As análises de motilidade, concentração, vitalidade, fragmentação do DNA e microscopia eletrônica de transmissão foram feitas pré e pós-liofilização. A análise seminal após liofilização demonstrou danos causados na membrana plasmática, acrossoma, núcleo, peça média, mitocôndrias, estrutura de flagelo, microtúbulos, axonema e fibras densas ocasionadas pela técnica. Essas alterações variaram conforme o meio utilizado na liofilização. Todos os espermatozoides após liofilização demonstraram ausência de motilidade e DNA 100% fragmentado. Para utilização rotineira mais estudos são necessários, a fim de otimizar a técnica de liofilização.

Palavras-chave: Liofilização, sêmen humano, criopreservação, microscopia eletrônica de transmissão.

ABSTRACT

Cryopreservation is a crucial technique for reproductive medicine, allowing the storage of surplus embryos, oocytes and sperm for future treatments. The cryoprotectants are substances that prevent ice crystals formation during the freezing process, protecting the cells, as well as lethal concentration of solutes maintaining the function of organelles. Glycerol is the most commonly used cryoprotectant in several seminal freezing techniques, such as slow freezing, rapid freezing, vitrification, freezing in empty zona pellucida. Sample storing after freezing usually is done in liquid nitrogen. Samples are stored in liquid nitrogen after freezing which leads to a high cost of maintenance, risk of cross contamination, difficulties in shipping and require large spaces for storage. Lyophilization is a technique widely used for dehydrating food products, pharmaceuticals, biotechnology products, vaccines and diagnostic biological materials. It consists in passing the solid material directly to the gaseous state - sublimation - maintaining the temperature sufficiently low under a low pressure. It has been used as an alternative to freezing since dehydration of semen does not require storage in liquid nitrogen or dry ice. Also, it represents storage cost reduction, in the long term, because less space would be needed to keep the samples. It would be possible to ship samples to worldwide without major complications and risks. Also, lyophilization led to inactivation of enveloped and non-enveloped viruses. However, studies show that lyophilization causes damage to sperm structures. The aim of this study was to analyze the sperm ultrastructure of human semen after lyophilization using transmission electron microscopy. Four different media for lyophilization were used: Freeze medium, Sperm Freeze Medium, mHTF and EDTA. Samples were frozen in the conventional method as a control. Twenty-one samples were used in the study. The analyzed parameters in fresh and freeze-dried sperm were: motility, concentration, vitality, DNA fragmentation and ultrastructure by transmission electron microscopy. The semen analysis after lyophilization demonstrated damage to the plasma membrane, acrosome, nucleus, midpiece, mitochondria, flagellum structure, microtubules, axoneme and outer dense fibers. Those damages varied according to the medium used in freeze-dried process. The lyophilized sperm demonstrated no motility and 100% DNA fragmentation. More studies are necessary in order to optimize lyophilization technique.

Keywords: lyophilization, human sperm, cryopreservation, transmission electron microscopy.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

COEP- Comitê de Ética em Pesquisa

DMSO- dimetilsulfóxido

EDTA-ácido etilenodiamino tetra-acético

EG- etilenoglicol

EGTA- ácido tetra-acético etileno-glicol

ESCA- esterilidade sem causa aparente

FISH- hibridização fluorescente *in situ*

HSA- albumina sérica humana

ICSI- injeção intracitoplasmática de espermatozoide

IUI- inseminação intrauterina

MET- microscopia eletrônica de transmissão

mHTF- *Human Tubal Fluid* modificado

OMS- Organização Mundial da Saúde

PROH- propanediol

PVP- polivinilpirrolidona

ROS- espécies reativas de oxigênio

SCD test- teste da dispersão da cromatina

SCSA- ensaio da estrutura da cromatina espermática

SH- ligações sulfidríla

SSS- substituto sintético do soro

TUNEL- *terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*

TYB- *Freeze Medium*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Liofilizador Thermo Fisher Scientific utilizado para desidratação das amostras.....	38
Figura 2: Amostras após liofilização nos diferentes meios: mHTF e <i>Freeze Medium</i> ..	39
Figura 3: Microscópio de Transmissão Tecnai G2-12 - SpiritBiotwin FEI - 120 kV do Centro de Microscopia da UFMG.....	41
Figura 4: Teste de vitalidade espermática.....	42
Figura 5: Espermatozoides após o teste de fragmentação de DNA Halosperm.....	44
Figura 6: Teste de fragmentação do DNA no sêmen descongelado..	50
Figura 7: Amostras de sêmen no liofilizador.....	51
Figura 8: Fluxograma do destino das amostras do estudo	52
Figura 9: Teste de vitalidade espermática com eosina-nigrosina após reidratação.....	53
Figura 10: Teste de fragmentação de DNA.	54
Figura 11: Comparação entre as amostras de sêmen fresca, congelada com crioprotetor e congelada com meio mHTF.	57
Figura 12: Comparação entre as cabeças dos espermatozoides frescos, liofilizados com <i>Sperm Freeze Medium</i> , liofilizados com <i>Freeze Medium</i> e liofilizados com mHTF	58
Figura 13: Comparação entre as peças médias dos espermatozoides fresco, congelado com crioprotetor, liofilizados em <i>Sperm Freeze Medium</i> , liofilizado em <i>Freeze Medium</i> , liofilizados em meio mHTF	59
Figura 14: Comparação entre as estruturas dos axonemas em espermatozoides frescos, liofilizados em <i>Sperm Freeze Medium</i> e liofilizados em <i>Freeze Medium</i>	61
Figura 15: Comparação entre os axonemas de espermatozoides frescos e liofilizados em <i>Sperm Freeze Medium</i>	62
Figura 16: Comparação entre as estruturas dos espermatozoides liofilizados em meio mHTF, congelados com crioprotetor, fresco e liofilizado em <i>Freeze Medium</i>	63
Figura 17: Comparação entre as cabeças de espermatozoides congelados com crioprotetor, liofilizados em mHTF, liofilizados em <i>Freeze Medium</i> , liofilizados em <i>Sperm Freeze Medium</i> e congelados em mHTF	64
Figura 18: Comparação entre flagelos dos espermatozoides frescos, congelados com crioprotetor, liofilizados com mHTF, liofilizados com <i>Freeze Medium</i>	65
Figura 19: Comparação entre as cabeças dos espermatozoides frescos, liofilizados em <i>Sperm Freeze Medium</i> , liofilizados em <i>Freeze Medium</i> , liofilizados em mHTF.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros de normalidade seminal segundo OMS.....	36
Tabela 2: Análise da morfologia e status da cromatina no sêmen fresco pré-liofilização	47
Tabela 3: Variação nos parâmetros concentração e motilidade entre sêmen fresco e congelado com crioprotetor	48
Tabela 4: Número de amostras liofilizadas de acordo com meio/crioprotetor e volume final, previamente congeladas no vapor de nitrogênio e submersas em nitrogênio líquido	51
Tabela 5: Número de amostras liofilizadas de acordo com meio/crioprotetor e volume final, previamente congeladas no freezer	51
Tabela 6: Danos às estruturas espermáticas de acordo com os meios utilizados	56

Sumário

INTRODUÇÃO	11
1.1- Criopreservação.....	12
1.2- Crioprotetores.....	13
1.3- Técnicas de congelamento	14
1.4- Armazenamento das amostras	16
1.5- Liofilização	18
1.5.1- Fatores que afetam a liofilização	23
1.6- Microscopia eletrônica	27
OBJETIVO.....	30
MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1- Espermograma	34
3.2- Congelamento das amostras.....	35
3.3- Liofilização	37
3.3.1- Meios de liofilização.....	38
3.4- Reidratação das amostras.....	39
3.5-Microscopia eletrônica de transmissão	39
3.6- Teste de vitalidade Eosina-Nigrosina	42
3.7- Fragmentação do DNA espermático	43
3.8- Descongelamento.....	44
RESULTADOS.....	46
DISCUSSÃO.....	67
CONCLUSÃO	81
ANEXOS.....	83
REFERÊNCIAS	91

INTRODUÇÃO

1.1- Criopreservação

A criopreservação é uma técnica de fundamental importância para a medicina reprodutiva, pois permite o armazenamento de embriões excedentes, oócitos e espermatozoides para futuros tratamentos. Pacientes que se submeterão a cirurgias ou tratamentos médicos, como radioterapia e quimioterapia, que podem levar à esterilidade, podem criopreservar seus gametas e/ou embriões, preservando assim sua capacidade reprodutiva. A criopreservação permite ainda a existência de bancos de oócitos e espermatozoides com a finalidade de doação de gametas para pacientes inférteis, casais homoafetivos ou para pacientes que optarem por produção independente.

Os primeiros estudos envolvendo criopreservação do gameta masculino datam de 1779 e foram realizados por Lázaro Spallanzani. Ele observou que os espermatozoides poderiam ser congelados na neve e manter sua viabilidade. Paolo Mantegazza propôs a criação de um banco de sêmen para que fossem preservadas linhagens de soldados para guerra. O primeiro relato de congelamento de espermatozoides com utilização de crioprotetores foi reportado por Polge *et al*, no ano de 1949. A descoberta do glicerol com crioprotetor permitiu que amostras seminais fossem criopreservadas e estocadas em gelo seco a uma temperatura de -78°C . No ano de 1954 Bunge *et al*, descreveram a primeira gravidez utilizando-se sêmen congelado. Estudos posteriores realizados por Sherman, no ano de 1963, demonstraram que o armazenamento em nitrogênio líquido poderia manter o sêmen congelado por períodos maiores de tempo preservando o movimento flagelar após descongelamento. Desde então vários estudos foram realizados a fim de melhorar as taxas de sobrevivência espermática, utilizando-se diferentes crioprotetores e diferentes técnicas de

congelamento. Goto *et al* (1990) sugeriram que mesmo sem estarem fisiologicamente vivos, após o descongelamento, os espermatozoides seriam capazes de gerar prole viável, se seu DNA estivesse conservado. Após realização da injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) com os mesmos fisiologicamente mortos, houve o nascimento de dois bezerros saudáveis.

1.2- Crioprotetores

Os crioprotetores são substâncias que tem a função de proteger as células contra a formação de cristais de gelo durante o congelamento e evitar que haja uma concentração letal de solutos mantendo a capacidade funcional das organelas celulares (PEGG, 2002). Os crioprotetores são classificados como penetrantes e não penetrantes, de acordo com sua forma de ação. A expulsão da água intracelular e a consequente redução da formação de gelo são facilitadas pela exposição à crioprotetores penetrantes, substâncias hidrofílicas com peso molecular menor que 400, que ultrapassam a membrana e retiram a água devido à diferença de gradiente. O glicerol, etilenoglicol (EG), propanediol (PROH) e dimetilsulfóxido (DMSO) são classificados como crioprotetores penetrantes, pois além de penetrarem nas células e criarem essa diferença osmótica, abaixam o ponto de congelamento. Existem também os crioprotetores não penetrantes, como por exemplo, a sacarose, trealose, glicose, lipoproteínas e polivinilpirrolidona (PVP). Eles possuem um peso molecular maior que 1000 e não conseguem cruzar a membrana plasmática. Eles auxiliam na desidratação das células permitindo um gradiente contínuo para a desidratação, intensificando a perda de água intracelular (EDGAR & GOOK, 2012).

O glicerol é o crioprotetor mais utilizado para congelamento seminal. Ele atua na estrutura da membrana, na permeabilidade e estabilidade da bicamada lipídica, nas proteínas de membrana e no metabolismo celular (FABBRI, *et al* 2004). Estudos

realizados por Sherman (1990) demonstraram que o uso do glicerol pode levar a danos na membrana plasmática, na membrana interna do acrossoma, do núcleo e da crista mitocondrial. Apesar disso, seu uso é o mais difundido visto que, estudos com demais crioprotetores penetrantes como, PROH e DMSO, demonstraram efeitos tóxicos para os espermatozoides humanos.

Os meios de congelamento seminal geralmente são uma associação de substâncias como glicerol, açúcares, gema de ovo e antibióticos, cuja função é otimizar a sobrevivência das células ao congelamento. O glicerol protege a célula contra choque térmico e osmótico; os açúcares fornecem energia ao espermatozoide, auxiliam na manutenção da osmolaridade e concentração de íons de hidrogênio; a gema de ovo mantém o fluxo constante na membrana plasmática, além de proteger sua estrutura e funções; antibióticos inibem crescimento de bactérias que podem estar presentes no sêmen.

1.3- Técnicas de congelamento

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) podendo esta ser controlada por uma máquina ou não (ISACHENKO *et al*, 2012). Diversos tipos e combinações de crioprotetores podem ser utilizados com essa técnica (EDGAR & GOOK, 2012). A técnica de congelamento lento de espermatozoides foi proposta por Behrman em 1966. É realizada com equipamento automatizado para queda gradual da temperatura por períodos predeterminados. O congelamento rápido do sêmen, no qual não se utiliza o equipamento para queda gradual da temperatura, foi proposto por Sherman em 1990. A técnica consiste no equilíbrio da amostra com crioprotetor por aproximadamente 10

minutos, depois exposição das palhetas ao vapor de nitrogênio com posterior imersão no nitrogênio líquido. Essa técnica é a mais utilizada hoje em dia, devido sua boa reprodutibilidade, boas taxas de sobrevivência e baixo custo.

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 (KUWAYAMA, *et al* 2005; VAJTA & NAGY, 2006). A técnica de congelamento lento permite que um maior volume seminal seja armazenado e uma boa concentração e motilidade espermáticas sejam conseguidas após o descongelamento (ISACHENKO *et al*, 2012). A vitrificação de espermatozoides permite um congelamento mais rápido, mais econômico, de alíquotas menores e sem injúrias celulares, quando comparado ao congelamento lento tradicional (NAWROTH *et al*, 2002; ISACHENKO *et al*, 2003; VUTYAVANICH *et al*, 2010).

Outros métodos de criopreservação para um ou poucos espermatozoides foram criados, como, por exemplo, a criopreservação espermática na zona pelúcida (COHEN *et al*, 1997; ABDELHAFEZ *et al.*, 2009). Sêmens criptozoospermicos ou biópsias testiculares podem conter raros espermatozoides viáveis e utilizáveis para técnicas de fertilização *in vitro*. Nesses estudos os espermatozoides isolados de sêmens criptozoospermicos ou de biópsias testiculares foram injetados com auxílio de uma micropipeta acoplada a um micromanipulador dentro da zona pelúcida vazia. Em seguida a zona pelúcida contendo os espermatozoides foram congeladas seguindo protocolo de congelamento de embriões. Esse método permitiu que os espermatozoides permanecessem viáveis e fossem encontrados após o descongelamento das amostras.

Independentemente do método utilizado na criopreservação, danos podem ocorrer na estrutura celular durante o congelamento ou descongelamento. A formação

de cristais de gelo pode levar a danos mecânicos na membrana e nas organelas. O resfriamento pode levar a mudanças nos lipídeos de membrana alterando também, as proteínas de membrana responsáveis pelo transporte de íons (OEHNINGER *et al*, 2000). Os carboidratos do glicocálice podem ser modificados durante o congelamento interferindo na função das proteínas transmembrana, na proteção imunológica e na reação acrossômica (PAOLI *et al*, 2014). A criopreservação pode ter efeitos adversos na motilidade espermática. Os fosfolipídios são abundantes nas membranas dos espermatozoides e são vulneráveis a peroxidação, o que pode levar a perda de enzimas e inibição da fosforilação oxidativa. As membranas mitocondriais, em especial, são bastante sensíveis a baixas temperaturas, podendo liberar as espécies reativas de oxigênio (ROS) durante a criopreservação. As ROS, por sua vez, podem levar a danos no DNA espermático e a apoptose (WANG *et al*, 2003). Alguns estudos preconizam o uso de antioxidantes nos meios de congelamento seminal, como catalase, ácido ascórbico, vitamina E, ascorbato, porém, sem evidências de melhoras na viabilidade e integridade da cromatina (TAYLOR *et al*, 2009; LI *et al*, 2010; BRANCO *et al*, 2010).

Estudos indicam que podem ocorrer danos ao DNA espermático após congelamento e descongelamento seminal. Já foi observado um aumento da atividade das caspases, do estresse oxidativo e da fragmentação de DNA após congelamento (THOMSON, *et al* 2009). Modelos animais demonstram que a criopreservação poderia induzir um aumento de eventos apoptóticos como, modificações da membrana mitocondrial, ativação das caspases e exteriorização da fosfatidilserina (DURU *et al* 2001; PAASCH *et al*, 2004).

1.4- Armazenamento das amostras

As amostras após congelamento podem ser conservadas em diferentes temperaturas e locais de armazenamento, como freezers, containers de nitrogênio

líquido ou vapor de nitrogênio. Esse armazenamento está relacionado à qualidade e viabilidade da amostra pós-descongelamento.

O congelamento em nitrogênio líquido é a forma mais difundida para armazenamento de amostras seminais, oócitos e embriões, sendo de extrema importância para as técnicas de reprodução humana assistida (GIANAROLI *et al*, 2012). Seu uso foi expandido no início da década de 1970 com o maior uso da inseminação artificial heteróloga (ANGER *et al*, 2003). O nitrogênio líquido também apresenta melhores resultados, para manutenção da motilidade espermática, quando comparado ao armazenamento no vapor de nitrogênio (WALTERS, 2009). Porém, o armazenamento em nitrogênio líquido envolve altos custos de manutenção. Algumas outras desvantagens envolvendo o armazenamento de espermatozoides em nitrogênio líquido já foram demonstradas. Zribi *et al*, (2010) e Thomson *et al*, (2009) demonstraram que existe um aumento a fragmentação do DNA de espermatozoides quando criopreservados em nitrogênio líquido e que essa fragmentação pode piorar resultados em tratamentos de fertilização *in vitro* (SAKKAS & ALVAREZ, 2010). Existe ainda a preocupação com a contaminação de amostras que mantem contato direto com o nitrogênio líquido (BIELANSKI *et al*, 2003; MORRIS, 2005). A contaminação cruzada com agentes etiológicos é outro fator a ser considerado durante o armazenamento de amostras biológicas em nitrogênio líquido (CLARKE, 1999; GIANAROLI *et al*, 2012). Já foi demonstrada a contaminação cruzada de amostras e subsequente contaminação de pacientes pelo vírus da hepatite B, de amostras de células-tronco de medula óssea (HAWKINS *et al*, 1996). Muitas espécies de fungos e bactérias já foram detectadas em tanques de nitrogênio líquido assim como alguns vírus: herpes simplex, papiloma vírus e adenovírus (CLARKE, 1999). Para tentar minimizar o risco de contaminação por contato direto com nitrogênio, foram desenvolvidos sistemas

fechados de criopreservação (KUWAYAMA *et al*, 2005). Para embriões e oócitos já se demonstrou que não há alterações nas taxas de gravidez utilizando-se esses sistemas fechados (PAPATHEODOROU *et al*, 2013). Métodos alternativos de purificação e esterilização do nitrogênio líquido também foram desenvolvidos para tentar minimizar as chances de contaminação durante o processo de congelamento e descongelamento. A esterilização do nitrogênio líquido com ultravioleta antes da imersão das amostras (PARMEGANI *et al*, 2010) e lavagem tripla das palhetas ou hastes a serem descongeladas, em nitrogênio estéril (PARMEGANI *et al*, 2012) demonstraram ser eficientes, porém demandam tempo e aparelhos especiais.

1.5- Liofilização

Novas metodologias e técnicas para congelamento vêm sendo desenvolvidas. 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 (HOCHI *et al*, 2011).

A liofilização do sêmen elimina a necessidade do armazenamento em nitrogênio líquido ou em gelo seco. O armazenamento, em longo prazo, teria um custo reduzido e menos espaço seria necessário para manter as amostras. O transporte dessas amostras seria facilitado, sendo possível o envio desse material para qualquer lugar do mundo sem maiores complicações e riscos (KUSAKABE *et al*, 2008; GIANAROLI *et al*, 2012). Outro fato importante a ser considerado é que a liofilização já demonstrou inativar vírus envelopados e não envelopados (UNGER *et al*, 2009).

A primeira tentativa de desidratar um espermatozoide foi realizada por Polge *et al* (1949). Eles utilizaram solução de Ringer com glicerol, em sêmen de galo, e

conseguiram remover 90% da água. Após duas horas em temperatura ambiente as amostras foram reidratadas e 50% dos espermatozoides recuperaram motilidade, mas sua capacidade de fertilização não foi avaliada. Sherman, em 1954, liofilizou espermatozoides humanos, mas não obteve espermatozoides vivos após reidratação. Observou-se que durante o processo de liofilização os espermatozoides perdem a capacidade de fertilização, uma vez que perdem sua vitalidade e motilidade. A técnica de ICSI permitiu demonstrar que núcleos de espermatozoides humanos reidratados injetados em oócitos de hamster eram capazes de formar pró-núcleos (UEHARA & YANAGIMACHI, 1976). Katayose *et al* (1992) observaram que núcleos de espermatozoides humanos e de hamster liofilizados eram capazes de gerar pró-núcleos, quando injetados em oócitos, mesmo após um ano armazenados. Hoshi *et al* (1994) demonstraram o potencial de fertilização e desenvolvimento embrionário, de espermatozoides de coelho liofilizados, injetados nos respectivos oócitos. A liofilização de sêmen de coelhos foi importante devido a sua similaridade com espermatozoides humanos, uma vez ambos são responsáveis pela herança do centrossomo (LIU *et al*, 2004). Verificado o desenvolvimento embrionário era necessário saber se era possível obtenção de prole a partir de espermatozoides liofilizados e reidratados.

Wakayama & Yanagimachi (1998) obtiveram primeira prole de camundongos derivada de espermatozoides liofilizados, utilizando-se ICSI. Dessa forma eles demonstraram que a ausência de viabilidade espermática não necessariamente queria dizer ausência de viabilidade cromossômica, uma vez que todos os espermatozoides reidratados e utilizados para ICSI estavam fisiologicamente mortos. Kusakabe *et al* (2001) demonstraram a capacidade de desenvolvimento embrionário murino ao injetar espermatozoides liofilizados em oócitos, mesmo na ausência total de atividade fisiológica. Eles utilizaram um novo meio com tampão a base de Tris-HCl com 50 mM

de ácido tetra-acético etileno-glicol (EGTA) e 50 mM NaCl para proteger o DNA espermático dos danos causados pela liofilização. Os autores conseguiram 90% de ativação oocitária espontânea após ICSI e 9% de aberrações cromossômicas, semelhante à ICSI com espermatozoides frescos. Kaneko *et al*, 2003 também demonstraram que mesmo sem sobreviver ao processo de liofilização a habilidade em iniciar desenvolvimento embrionário era mantida no núcleo. Liu *et al*, (2005) demonstraram que os espermatozoides liofilizados de murinos e bovinos, injetados nos oócitos, eram capazes de induzir oscilações de cálcio, essenciais para processo de formação de pró núcleos.

A liofilização, portanto, começou a ser utilizada com sucesso para armazenamento de sêmen de alguns animais, em 1998. Estudos já demonstraram sucesso na liofilização, com nascimento de prole viável, após a reidratação do sêmen de camundongos (WAKAYAMA & YANAGIMACHI, 1998; KUSAKABE *et al*, 2001; KANEKO *et al*, 2003; WARD *et al*, 2003; KAWASE & SUZUKI, 2011) coelhos (LIU *et al*, 2004), ratos (HIRABAYASHI *et al*, 2005; HOCHI *et al*, 2008) hamster (MUNETO & HORIUCHI, 2011), cavalos (CHOI *et al*, 2011).

Animais domésticos, como cães, já tiveram seu sêmen liofilizado e a fragmentação do DNA avaliada. Esse estudo demonstrou uma potencial utilização de espermatozoides liofilizados de animais domésticos para obtenção de prole viável utilizando-se ICSI (OLACIREGUI *et al*, 2015). Kaneko *et al* (2014) liofilizaram sêmens de animais selvagens como girafa, chimpanzé, jaguar, doninha e conseguiram demonstrar o potencial desenvolvimento embrionário injetado esses espermatozoides em oócitos de camundongos. Esse estudo é importante, pois cria uma alternativa econômica e viável para armazenamento de sêmens de espécies ameaçadas ou em extinção.

Além de demonstrar geração de prole viável é importante saber sobre a saúde e fertilidade desses indivíduos gerados a partir de sêmen liofilizado. Li *et al* (2009) demonstraram que ao realizar ICSI com espermatozoides reidratados era possível obter prole viável, saudável e geneticamente estável em camundongos, por duas gerações.

Em humanos, o primeiro estudo realizado com liofilização de sêmen, foi publicado em 2008 por Kusakabe, *et al*. Nele os autores concluíram que a liofilização poderia ser feita em espermatozoides humanos utilizando-se uma solução tampão de EGTA, armazenando-se os frascos a 4 graus sem danos aos cromossomos. A análise cromossômica foi realizada injetando-se esses espermatozoides em oócitos de camundongos previamente enucleados. Foram criados 4 grupos de estudo para primeira amostra seminal (A), na qual houve variação no tempo de exposição ao tampão e o processo de liofilização. Três amostras foram imediatamente homogeneizadas com EGTA e liofilizadas, a outra ficou exposta ao tampão 6-7 dias. Após a liofilização das amostras outros quatro grupos foram criados de acordo com o tempo em que permaneceram, a temperatura de 4 graus, armazenadas: a primeira amostra permaneceu armazenada um dia, a segunda 3-7 dias, a terceira 4 semanas e a quarta 3 semanas. Para a outra amostra seminal (B) foram criados três grupos de estudo com diferentes tempos de exposição ao EGTA. Imediatamente expostos e liofilizados; quatro horas de exposição e dois dias de exposição. No total foram injetados 478 oócitos murinos enucleados com espermatozoides reidratados, nos diferentes grupos de exposição ao tampão e tempo de armazenamento pós-liofilização. Eles observaram que a exposição prolongada dos espermatozoides a solução EGTA (6-7 dias amostra seminal A) e tempo maior de armazenamento (armazenamento pós-liofilização de três semanas) atrapalhou a ativação oocitária quando comparada aos outros grupos de exposição ao tampão e tempo de armazenamento (73% x 89%, 86% e 91%). Esse fato também foi observado

na amostra seminal B (exposição ao meio EGTA por dois dias e armazenamento 17 dias a 4 semanas) teve piores resultados de ativação oocitária quando comparados aos outros grupos de exposição e armazenamento (73% x 92% e 88%) Porém, não houve diferenças entre os grupos, na presença de anormalidades cromossômicas. Não houve nenhuma aberração cromossômica, apenas algumas quebras de DNA, nas amostras liofilizadas. Esse estudo, portanto, demonstrou que era possível liofilizar sêmen humano sem causar danos ao DNA espermático.

Em 2012, Gianaroli *et al*, utilizaram amostras de sêmen humano para liofilização. Eles utilizaram o tampão de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e mantiveram as amostras a 4°C até sua reidratação. Foram utilizadas 30 amostras seminais, sendo 19 normozoospermicas e 11 levemente teratozoospermicas. Cada amostra foi submetida ao congelamento convencional e a liofilização. Ao reidratar as amostras eles observaram que nenhum espermatozoide encontrava-se viável e móvel após o processo. Em contrapartida o DNA estava preservado, após teste de dispersão da cromatina (*SCD test*), eles observaram que 80,6% dos espermatozoides liofilizados estavam com DNA intacto, enquanto o sêmen fresco tinha 77,8% de DNA intacto, não sendo significativa a diferença. A birrefringência da cabeça dos espermatozoides submetidos à liofilização foi maior do que aquela apresentada pelos espermatozoides submetidos ao congelamento em nitrogênio líquido (22,4% x 11,7%). Isto significa que a liofilização não leva a danos no acromossoma como a criopreservação tradicional. A birrefringência pode ser utilizada como critério de seleção de espermatozoides reidratados para ICSI. Apesar da morfologia espermática apresentar-se mais alterada nos espermatozoides liofilizados (7,2% x 11,3%), a fragmentação do DNA foi maior nos espermatozoides submetidos ao congelamento em nitrogênio líquido (80,6% x 62,8%). Esses resultados demonstram que ambas as técnicas de conservação levam a

danos ao espermatozoide. Foi demonstrado por hibridização fluorescente *in situ* (FISH), em seis amostras com um total de 4800 espermatozoides, que a incidência de aneuploidia antes e depois da liofilização não variou (0,55% x 0,56%) assim como a incidência de diploidia (0,20% x 0,16%).

A ausência de motilidade, associada a danos nos centríolos e mitocôndrias, pode fazer necessária a ativação dos oócitos no momento da ICSI quando esses espermatozoides forem utilizados.

1.5.1- Fatores que afetam a liofilização

Os principais fatores que afetam a eficácia da liofilização são temperatura, pressão do vácuo, período de desidratação, meio das amostras no momento da liofilização e temperatura de estocagem das amostras (HOCHI *et al*, 2011).

Kwon *et al* (2004) observaram que aumentando-se gradualmente o tempo de desidratação em sêmen de suínos, de 4 até 24 horas, havia uma redução na habilidade do espermatozoide em participar do desenvolvimento embrionário *in vitro*. Em outro estudo, Kawase *et al* (2007) observaram que durante a desidratação primária, a pressão era importante para manter a integridade do DNA nos espermatozoides de camundongos e nos embriões que se desenvolveram *in vitro e in vivo*. Eles concluíram que uma pressão de 0.37 hPa era melhor que a pressão de 1.03 ou 0.04 hPa.

Os meios que contem as amostras no momento da liofilização também podem influenciar nos resultados de recuperação espermática. Wakayama & Yanagimachi, (1998) foram os primeiros a obter prole viável após liofilização de espermatozoides de camundongo, utilizando meios de cultivo durante o processo de desidratação. Kusakabe *et al*, 2001 propõe a utilização de um meio tamponado com 10mM Tris-HCl, 50 mMNaCl e 50 mM de EGTA. O EGTA atua como um quelante e previne a ação de endonucleases que são liberadas pelas membranas lesadas dos espermatozoides e levam

a danos nos cromossomos. Em 2008, o mesmo autor, observou que espermatozoides de camundongos e também de humanos poderiam ser liofilizados sem danos cromossômicos, utilizando-se meio com EGTA. Outros agentes quelantes, como o EDTA, também já demonstraram eficácia na prevenção a danos cromossômicos em espermatozoides de camundongos (KUSAKABE *et al*, 2001). Kaneko *et al*, (2003) concluíram que uma solução com pH mais básico conferia um efeito protetor durante o processo de liofilização de espermatozoides de camundongos. Kusakabe & Kamiguchi, (2004) demonstraram que a adição de DMSO, um crioprotetor, ou a adição de um agente antioxidante aumentavam a proteção contra o processo de desidratação em espermatozoides de camundongos. A trealose, um dissacarídeo, também conferiu proteção durante o processo de liofilização de sêmen de bovinos (MARTINS *et al*, 2007) e, mais recentemente, Men *et al* (2013), observaram esse efeito protetor em sêmen de javali. A trealose provavelmente se une a membrana do espermatozoide tornando-a mais estável.

O período de tempo entre a reidratação e o uso dos espermatozoides para ICSI pode afetar a taxa de sucesso do desenvolvimento *in vivo e in vitro*. A membrana lisada pode liberar alguns componentes ativos do citoplasma no momento em que se reidrata a amostra (NAKAI *et al*, 2007).

A temperatura em que se armazena a amostra após liofilização pode ter um papel fundamental nos resultados de fertilização, desenvolvimento embrionário *in vitro e in vivo*.

Ward *et al*, (2003) armazenaram sêmen de camundongos a 4°C, por um ano e meio. Eles obtiveram uma proporção de nascidos vivos, a partir de embriões de duas células transferidos, de 21% (15/72). Esses camundongos, oriundos de sêmen liofilizado, atingiram maturidade e se reproduziram normalmente. Esse resultado de

nascidos vivos é inferior ao obtido com sêmen murino congelado, sem crioprotetor, de 59% (40/68). Apesar de significativamente menores as taxas de nascidos vivos com sêmen liofilizado ($P \leq 0,001$) a técnica pode ser utilizada.

Kaneko & Serikawa (2012a) relataram nascimento de camundongos a partir de sêmen liofilizado armazenados por três anos a uma temperatura de 4°C. Cinquenta e um por cento dos embriões de duas células transferidos, derivados de sêmens liofilizados e armazenados 4°C, implantaram. Desses, 33% desenvolveram em camundongos nascidos vivos. Dessa maneira os autores provaram que é possível obtenção de prole viva, a partir de sêmen liofilizado e armazenado, por longo período, a temperatura de 4°C.

Hochi *et al* (2008) armazenaram sêmen de ratos liofilizados por um ano à temperaturas de +25°C, +4°C e -196°C. Ao injetar os espermatozoides reidratados em oócitos, não houve diferenças entre as taxas de fertilização, mesmo comparando-se com grupo controle de congelamento convencional (79% x 75% x 70% e 73%). Após a transferência de mais 80 zigotos em cada grupo, as taxas de nascidos vivos para sêmen congelado, liofilizados armazenados a 25°C, +4°C e -196°C foram respectivamente, 36%, 0%, 7% e 14%. Esse estudo demonstrou, portanto, que amostras de sêmen de ratos liofilizadas, armazenadas a temperaturas de +25°C, não podem ser utilizadas para geração de prole. Além disso, os autores observaram uma incidência de 100% de aberrações cromossômicas nessas amostras, comparadas a 41% nas amostras congeladas, 65% nas amostras armazenadas +4°C e 35% nas amostras armazenadas a -196°C.

Kwon *et al* (2004) observaram, após um ciclo de liofilização de 4 horas de sêmen de suínos, que apenas os sêmens que foram armazenados a 4°C formaram blastocistos *in vitro* após ICSI (10,7% de blastocistos de 66 oócitos cultivados). Para amostras desidratadas por 9 horas e armazenadas a 4°C ou 25°C, houve uma diminuição

significativa de embriões de 4 células de acordo com a temperatura de estocagem (28,5% x 13,1% $P < 0,05$). Para amostras desidratadas por 16 horas mesma diminuição foi observada em embriões de 4 células (28% x 15,9% $P < 0,05$).

Os estudos foram demonstrando que a temperatura ideal para estocagem do sêmen após liofilização era de 4°C.

Mesmo após um longo período de estocagem a temperatura de 4°C foi capaz de manter a viabilidade dos espermatozoides de ratos. Kaneko & Serikawa (2012b) relataram nascimento de ratos após armazenamento, de 5 anos a 4°C, a partir de sêmen liofilizado. Foram transferidos 92 zigotos, sendo que 20% implantaram e 11% nasceram vivos.

O estágio de maturação em que o espermatozoide é liofilizado também influencia no resultado da liofilização e na integridade do DNA espermático. Kaneko *et al* (2003) observaram, ao liofilizar espermatozoides de camundongos epididimários e testiculares, que quanto mais pontes dissulfeto associadas às protaminas os espermatozoides possuíam, ou seja, quanto mais maduros eles eram, mais estável seu DNA se mantinha após a desidratação. Os espermatozoides foram reidratados, injetados e o conteúdo cromossômico foi analisado nos zigotos. Os embriões oriundos de espermatozoides testiculares liofilizados, quando analisados cromossomicamente, mostraram apenas 3% de normalidade, enquanto os embriões oriundos de espermatozoides liofilizados obtidos da cauda do epidídimo apresentavam 70% de normalidade. Em 2012 (b), Kaneko & Serikawa fizeram as mesmas observações em sêmen liofilizado de ratos. Eles demonstraram que após a transferência de 54 oócitos inseminados com espermatozoides epididimários reidratados, 28% implantaram e 11% nasceram vivos. Para os espermatozoides oriundos do testículo, foram inseminados 36 oócitos e não houve implantação e nascidos vivos. Para aumentar a tolerância dos

espermatozoides testiculares os autores fizeram o tratamento das amostras com diamina. A diamina oxida as ligações sulfidríla (SH), associadas à protaminas, para ligações dissulfeto, mais estáveis. Dessa maneira ao injetar, 50 oócitos de ratos, com os espermatozoides reidratados de testículo tratados com diamina, obtiveram 8% de implantação e 8% de nascidos vivos.

A liofilização é uma técnica que requer o congelamento da amostra e em seguida uma desidratação intensa a uma baixa pressão. A liofilização do espermatozoide pode levar a injúrias na membrana plasmática e organelas devido ao estresse osmótico, formação de cristais de gelo e estresse oxidativo. Segundo Jeyendran *et al* (1983) a umidade residual é essencial para sobrevivência espermática. Uma desidratação completa é prejudicial aos espermatozoides provavelmente por alterar estruturas no plasma seminal.

1.6- Microscopia eletrônica

O desenvolvimento da microscopia óptica e dos corantes, em meados do século XIX, possibilitou a aquisição de melhores contrastes e visualização de estruturas celulares antes desconhecidas. Nos anos 40, com surgimento da microscopia eletrônica, foram necessários mais estudos sobre fixação e preparo das amostras para que a técnica finalmente pudesse ser utilizada como ferramenta de pesquisa.

A resolução obtida por qualquer microscopia é limitada pela fonte de radiação utilizada, seja ela feixe de luz visível ou feixe de elétrons. A microscopia eletrônica utiliza-se de outra fonte de radiação para obtenção de imagens possibilitando, dessa forma, analisar estruturas menores, que apenas com luz visível, não seria possível. O comprimento de onda do elétron diminui à medida que sua velocidade aumenta. Um microscópio que possui uma voltagem de aceleração de 100.000 V consegue um comprimento de onda do elétron de 0.004 nm. O poder de resolução dos microscópios

eletrônicos, entretanto, é de 0.1nm devido às aberrações que ocorrem nas lentes, o que equivale a uma resolução 200 vezes melhor do que a de um microscópio óptico (ALBERTS *et al*, 2008, BOZZOLA & RUSSEL, 1999).

O funcionamento do microscópio eletrônico de transmissão (MET) depende do aquecimento de um filamento ou cátodo, no vácuo, que irá produzir os elétrons. Os elétrons são acelerados, devido a uma diferença de potencial existente entre o cátodo e ânodo, e passam por um pequeno orifício criando um feixe. O feixe de elétrons é orientado ao passar por lentes eletromagnéticas. As amostras, previamente preparadas, são colocadas no vácuo na direção dos feixes dos elétrons. Alguns elétrons atravessam o espécime e são espalhados por estruturas elétron densas, formando pontos escuros na imagem. As amostras podem também, dispersar os elétrons por difração ou por diferença de tensão. Os componentes celulares desviam pouco os elétrons e formam diferentes escalas de cinza na imagem (ALBERTS *et al*, 2008; GRIFFITHS, 2006; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2000).

A MET permite observar danos ocasionados na ultraestrutura espermática, como lesões na membrana plasmática, acrossoma, mitocôndrias, núcleo e também avaliação da morfologia da cabeça, peça média e flagelo. Assim, é uma excelente ferramenta para avaliar os possíveis efeitos da liofilização sobre espermatozóides humanos, oferecendo dados para se aprimorar a técnica.

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. Assim, o desenvolvimento da técnica de liofilização permitirá o armazenamento de espermatozoides sem a necessidade de nitrogênio líquido, reduzindo os potenciais riscos

de contaminação cruzada das amostras ou mesmo contaminação com microrganismos que podem estar presentes no nitrogênio líquido. Além disso, haverá uma redução nos custos e será minimizado o espaço para armazenamento das amostras.

OBJETIVO

Avaliar os possíveis efeitos causados pela técnica de liofilização nos espermatozoides humanos utilizando a microscopia eletrônica de transmissão.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa teve início após a aprovação pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) sob parecer número 743.984 (ANEXO 1) e foi realizada de agosto de 2014 a agosto de 2015. Vinte um pacientes que estavam realizando tratamentos de Reprodução Assistida no Centro de Medicina Reprodutiva-ORIGEN doaram amostras seminais excedentes. O estudo foi do tipo descritivo, observando as alterações após liofilização de sêmen humano em diferentes tipos de meios.

Para inclusão no estudo, os pacientes assinaram o TCLE (ANEXO 2) após as amostras terem sido submetidas a um exame de espermograma seguindo os parâmetros definidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS), 2010 (TABELA 1).

As amostras seminais doadas para pesquisa foram divididas em grupos controle e estudo. A mesma amostra foi dividida para congelamento e liofilização, nos diferentes tipos de meios. As amostras controle foram congeladas e armazenadas, em palhetas, utilizando-se método convencional de congelamento com um dos crioprotetores comerciais de eficácia já demonstrada, *Freeze Medium* (Irvine Scientific, EUA) ou *Sperm Freeze Solution* (Vitrolife, Suécia) ou a solução tamponada com 10 mM Tris-HCl e 1mM de EDTA (GIANAROLI *et al*, 2012) ou meio de cultivo Human Tubal Fluid modificado (mHTF) (Irvine Scientific, EUA). As amostras do estudo foram acondicionadas em frascos de liofilização, no volume final de 0,5 mL ou 1mL, com crioprotetores *Freeze Medium* ou *Sperm Freeze Solution* ou meio tamponado com EDTA ou meio de cultivo comercial mHTF. Essas amostras foram congeladas e armazenadas em nitrogênio líquido até liofilização ou em freezer -80° C.

A liofilização foi realizada no laboratório de Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica da UFMG. Após a liofilização as amostras foram acondicionadas em refrigerador 4°C até sua reidratação. As amostras reidratadas foram fixadas e preparadas

para serem analisadas por microscopia eletrônica de transmissão, no Centro de Microscopia da UFMG, para verificar as alterações nas organelas e morfologia espermática. As amostras também foram analisadas quanto à concentração, motilidade, vitalidade, fragmentação do DNA. As amostras criopreservadas (grupo controle) foram analisadas quanto à concentração, motilidade e fragmentação do DNA.

3.1- Espermograma

Foi realizado um exame de espermograma para avaliação dos parâmetros seminais macroscópicos (volume, viscosidade e pH) e microscópicos (concentração, motilidade, morfologia, células redondas e aglutinação) (TABELA 1).

Após liquefação de 60 minutos, o volume foi medido com auxílio de uma pipeta sorológica e foi observada a filância do sêmen. O pH foi medido mergulhando-se o papel indicador de pH (Merck, Alemanha) no sêmen.

Uma alíquota de 10 µl foi colocada na câmara de Makler para contagem da concentração e motilidade espermáticas. A motilidade foi categorizada da seguinte forma:

- Tipo A ou I: motilidade progressiva linear
- Tipo B ou II: motilidade progressiva ondulatória
- Tipo C ou III: motilidade não progressiva
- Tipo D ou IV: imóveis

Foi feito também um esfregaço, que após seco, foi corado utilizando-se o kit InstantProv (NewProv Produtos para Laboratório, Brasil) para observação da morfologia espermática. As lâminas com os esfregaços secos foram imersas na solução 1 (ciclohexadienos a 0,1%) cinco vezes. Após a secagem elas foram imersas na solução 2 (azobenzenosulfônicos a 0,1%), três vezes. O excesso de corante foi retirado posicionando-se um papel embaixo da lâmina, na vertical. Depois disso, as lâminas

foram imersas solução 3 (fenotiazinas a 0,1%), seis vezes. Posteriormente as lâminas foram lavadas com água destilada pelo verso. Com essa coloração foi possível avaliar tamanho e forma da cabeça; tamanho do acrossoma; formato, tamanho e inserção da peça média; formato, tamanho, inserção do flagelo. Além disso, também foi analisado o status da cromatina. Se o espermatozoide estivesse com cabeça totalmente corada em roxo, sua cromatina tinha grandes chances de estar alterada segundo Sousa *et al*, (2009). Um valor acima de 32% de espermatozoides normalmente corados, com acrossoma rosa e citoplasma roxo, indicava um status da cromatina normal e maiores chances de desenvolvimento embrionário e gravidez.

Uma alíquota de 10µl foi colocada em lâmina sob lamínula para observação de células redondas e aglutinação. Para contagem de células redondas (células epiteliais e leucócitos) foram observados quatro campos aleatórios e feita uma média. Aglutinação foi classificada como presente quando os espermatozoides se encontravam em grumos.

3.2- Congelamento das amostras

As amostras foram congeladas, como controle, em quatro diferentes meios: *Freezing Medium*, *Sperm Freeze Solution*, mHTF e solução EDTA.

O *Freeze Medium* é um meio a base de glicerol (12% v/v) que contém gema de ovo (20%) e sulfato de gentamicina (10µg/mL). O congelamento foi realizado segundo orientação do fabricante: uma alíquota de sêmen foi colocada em um tubo de ensaio e na proporção 1:1, o crioprotetor em temperatura ambiente, foi adicionado de forma gradual. A solução foi homogeneizada, acondicionada em palhetas de 0,5 mL CryoBiosystem (IMV Technologies, França) ou em frascos próprios de liofilização com 0,5 mL ou 1 mL (6R 10ml, Christ). As amostras foram colocadas no freezer – 30°C por 30 minutos. Após esse tempo as palhetas e os frascos foram colocadas no vapor de nitrogênio por mais 30 minutos e então imersas no nitrogênio líquido.

Tabela 1: Parâmetros de normalidade seminal segundo OMS. Fonte: *World Health Organization: WHO Laboratory manual for the examination and processing of human semen*, 5th ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2010

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

O *Sperm Freeze Medium* é um meio a base de glicerol em tampão MOPS, que contém sulfato de gentamicina e albumina sérica humana (HSA). Para congelamento uma alíquota de sêmen foi colocada em um tubo de ensaio e na proporção 1:1, o crioprotetor em temperatura ambiente, foi adicionado de forma gradual. A solução foi homogeneizada, deixada 10 minutos em temperatura ambiente e acondicionada em palhetas (0,5 mL) ou em frasco próprios de liofilização (0,5 mL ou 1mL) (6R 10ml,

Christ). As palhetas e frascos foram colocados no vapor de nitrogênio por 30 minutos e imersas no nitrogênio líquido, conforme recomendação do fabricante.

As amostras seminais também foram congeladas nos meios tamponado a base de EDTA ou meio de cultivo mHTF.

A solução tampão a base de EDTA foi feita utilizando-se 10 mM de Tris-HCl e 1mM de EDTA. A solução foi armazenada a 4°C até sua utilização. Para utilização o meio foi colocado à temperatura ambiente.

O meio de cultivo mHTF é composto por cloreto de sódio, cloreto de potássio, sulfato de magnésio, fosfato de potássio monobásico anidro, cloreto de cálcio monobásico, bicarbonato de sódio, glicose, piruvato de sódio, lactato, gentamicina, HEPES e vermelho de fenol. Ele deve ser suplementado com uma fonte proteica como, substituto sintético do soro (SSS) ou soro albumina humana (HSA). O meio foi colocado à temperatura ambiente para utilização.

Para verificar se a temperatura inicial no processo de liofilização faria diferença nos resultados oito amostras foram congeladas em freezer e mantidas -80° C até momento liofilização.

3.3- Liofilização

As amostras congeladas em nitrogênio líquido ou no freezer -80°C, nos frascos de liofilização, nos diferentes meios, foram encaminhadas ao laboratório de Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica da UFMG. Os frascos contendo as amostras congeladas foram colocadas no equipamento de liofilização (ModulyoD-115, Thermo Fisher Scientific) por 24 horas. Durante o processo de liofilização a temperatura foi mantida a - 50°C e a pressão entre 50-100 microbar (FIGURA 1). As amostras liofilizadas foram armazenadas em refrigerador 4°C até sua reidratação.

3.3.1- Meios de liofilização

Os meios utilizados para o processo de liofilização foram os dois crioprotetores, *Freeze Medium* ou *Sperm Freeze Solution*, ou a solução tamponada de EDTA ou meio de cultivo mHTF. Todas as soluções foram acondicionadas na concentração 1:1 em frascos próprios de liofilização (FIGURA 2). O volume final variou de 0,5 mL a 1 mL, conforme volume seminal disponível. Todas as amostras foram congeladas segundo protocolo de congelamento citado anteriormente. Os diferentes meios tamponados e crioprotetores foram utilizados para verificar o comportamento das organelas, membranas e demais estruturas do espermatozoide durante os processos de congelamento e desidratação.



Figura 1: Liofilizador Thermo Fisher Scientific utilizado para desidratação das amostras. Fonte: Savia Caldeira, UFMG.

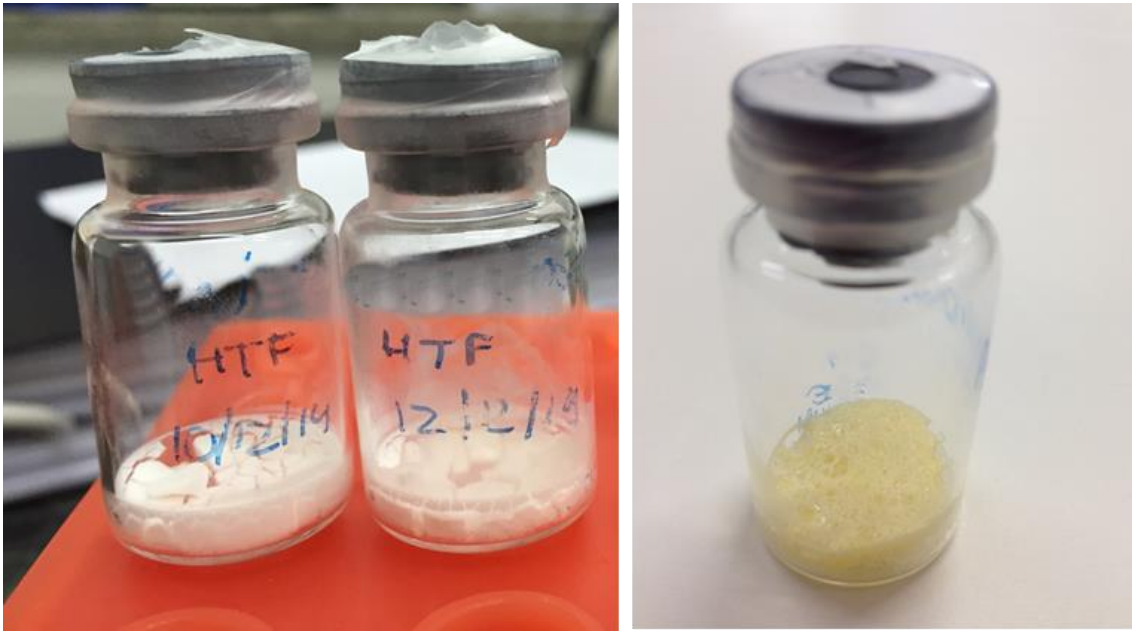


Figura 2: Amostras após liofilização nos diferentes meios: mHTF e *Freeze Medium*.

3.4- Reidratação das amostras

As amostras, até sua reidratação, foram mantidas a 4°C em refrigerador. O período de armazenamento variou de um mês a quatro meses. Para análise as amostras foram reidratadas conforme volume inicial antes do processo de liofilização, 0,5 mL ou 1 mL de água Sigma para transferência de embrião (Sigma Aldrich, EUA, W1503). Logo em seguida foram retiradas alíquotas de 10 µl para contagem em câmara de Makler, confecção de esfregaço, realização do teste de vitalidade e teste de dispersão da cromatina espermática. O restante da amostra foi fixado para microscopia eletrônica de transmissão.

3.5-Microscopia eletrônica de transmissão

As amostras preparadas para microscopia eletrônica de transmissão foram fixadas com solução *karnovsky* modificada (2% de paraformaldeído e 2,5% de glutaraldeído) em tampão fosfato 0,1 M por 24h a 4°C. Após esse tempo a solução de

fixação foi removida centrifugando-se a amostra a 2.500 rpm, durante 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e foi adicionado ao pellet 4 mL de tampão fosfato 0,1 M. As amostras foram acondicionadas em geladeira até sua entrega ao Centro de Microscopia da UFMG para realização da fixação secundária.

Já no Centro de Microscopia as amostras foram imersas na solução de tetróxido de ósmio (OsO_4) a 2% em tampão, por duas horas em temperatura ambiente, para fixação secundária. Em seguida as amostras foram lavadas cinco vezes, por 10 minutos, em solução fisiológica com 17,8% de sacarose. Posteriormente as amostras foram imersas em solução aquosa de acetato de uranila 2% contendo 13,3% de sacarose, *overnight* a 4°C.

No dia seguinte as amostras foram lavadas com água destilada, três vezes por 5 minutos e desidratadas em concentrações crescentes de álcool (35% -100%)

- Álcool 35% - 2 vezes de 10 min
- Álcool 50% - 2 vezes de 10 min
- Álcool 70% - 2 vezes de 10 min
- Álcool 85% - 2 vezes de 10 min
- Álcool 95% - 2 vezes de 10 min
- Álcool 100% - 3 vezes de 10 min

Seguindo-se a desidratação, as amostras foram colocadas em solução de acetona por 15 minutos, duas vezes. Posteriormente foram acondicionadas em solução de acetona e Epon, para inclusão, na concentração 2:1 em recipiente fechado, por duas horas; depois na concentração 1:1 (acetona, Epon), por mais duas horas em recipiente fechado; na concentração 1:2 (acetona, Epon) em recipiente aberto, *overnight*, na capela de exaustão de gases. No dia seguinte foram incluídas em solução Epon pura, em recipiente fechado, por 3 horas. Para polimerização da resina as amostras foram

acondicionadas em estufa a 45°C, por uma hora, e posteriormente na estufa a 60°C, por mais 48 horas.

As amostras foram colocadas no micrótomo para cortes de 50-60nm.

Para contraste das amostras foi utilizado citrato de chumbo – solução de Reynolds (1,33 g de nitrato de chumbo $Pb(NO_3)_2$; 1,76 g de citrato de sódio $Na_3(C_6H_5O_7) \cdot 2H_2O$; 30 ml de água destilada isenta de CO_2)

A análise das amostras foi realizada no microscópio eletrônico de Transmissão Tecnai G2-12 - SpiritBiotwin FEI - 120 kV, com a voltagem de mais ou menos 80 kV. (FIGURA 3).



Figura 3: Microscópio de Transmissão Tecnai G2-12 - SpiritBiotwin FEI - 120 kV do Centro de Microscopia da UFMG.

3.6- Teste de vitalidade Eosina-Nigrosina

O teste de vitalidade Eosina-Nigrosina foi utilizado para quantificar a sobrevivência espermática no sêmen liofilizado. Uma amostra de 10 μ l de sêmen foi pipetada em um tubo de ensaio, onde foram adicionados 10 μ l de corante vital Eosina amarela 1%. A solução foi homogeneizada por 1 minuto, quando foram adicionados 20 μ l de Nigrosina 6%. A amostra foi homogeneizada e foram feitos esfregaços. As lâminas foram observadas sob imersão. 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 com contorno em roxo, definido pela Nigrosina. O limite aceitável para esse teste é de 58% de espermatozoides vivos (OMS, 2010) (FIGURA 4).

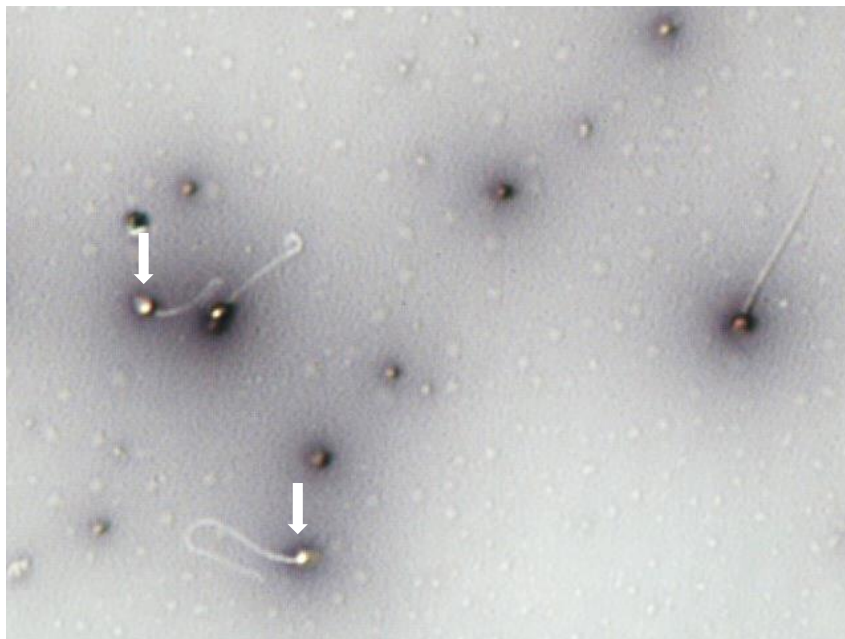


Figura 4: Teste de vitalidade espermática. Os espermatozoides vivos (setas) são transparentes apenas com membrana corada pela Nigrosina. Os espermatozoides mortos estão corados, demonstrando que sua membrana plasmática perdeu a função.

3.7- Fragmentação do DNA espermático

As amostras congeladas e liofilizadas foram submetidas ao teste de fragmentação do DNA.

O teste de fragmentação de DNA espermático utilizado foi baseado na dispersão da cromatina (SCD). Foi utilizado o kit Halotech DNA- Halosperm G2®.

Primeiramente foram derretidos, em micro-ondas por 30 segundos, 100 µl de gel de agarose contidos em um *ependorf*. O *ependorf* contendo a agarose foi mantido a 37°C por 5 minutos para que a temperatura equilibrasse. Cinquenta microlitros de sêmen, após ser processado, foram adicionados ao *ependorf* com agarose e homogeneizado. Uma amostra de 8 µl foi pipetada nas lâminas do kit, pré-tratadas, cobertas com a lamínula de 22x22 mm e mantidas em posição horizontal. As lâminas foram colocadas sobre uma superfície de metal, pré-refrigeradas a 4°C, no refrigerador por 5 minutos para que fosse formado um gel. A lamínula foi gentilmente deslizada e retirada. As lâminas foram acondicionadas sobre placas de 35 mm, que serviram como suporte, dentro de placas de Petri 100 mm para que a soluções desnaturante, de lise e fixadora fossem colocadas. Primeiramente foram colocadas 5 gotas de solução ácida desnaturante (AD), por 7 minutos. As lâminas foram vertidas e foram colocadas 5 gotas da solução de lise (LS), durante 20 minutos. A solução de lise remove as proteínas nucleares e na ausência de fragmentação do DNA produz nucleoides com largos halos, o que não ocorre nos espermatozoides com DNA fragmentado, pois esse está disperso. Posteriormente a lise, as lâminas foram vertidas e lavadas com água destilada, abundantemente, por 5 minutos. As lâminas foram fixadas cobrindo-as com etanol 70%, por 2 minutos, seguido por etanol 100% por mais 2 minutos. As lâminas foram colocadas para secar a temperatura ambiente para serem coradas. Com as lâminas secas foi adicionada solução corante A do kit (SSA) por 7 minutos, o excesso de corante foi

removido vertendo-se a lâmina e depois a solução corante B do kit (SSB) por mais 7 minutos. O excesso de corante foi removido e as lâminas foram colocadas para secar a temperatura ambiente. Foram contados 300 espermatozoides observando-se presença ou ausência de halo (FIGURA 5). Um valor abaixo de 30% de fragmentação de DNA espermático foi considerado normal.

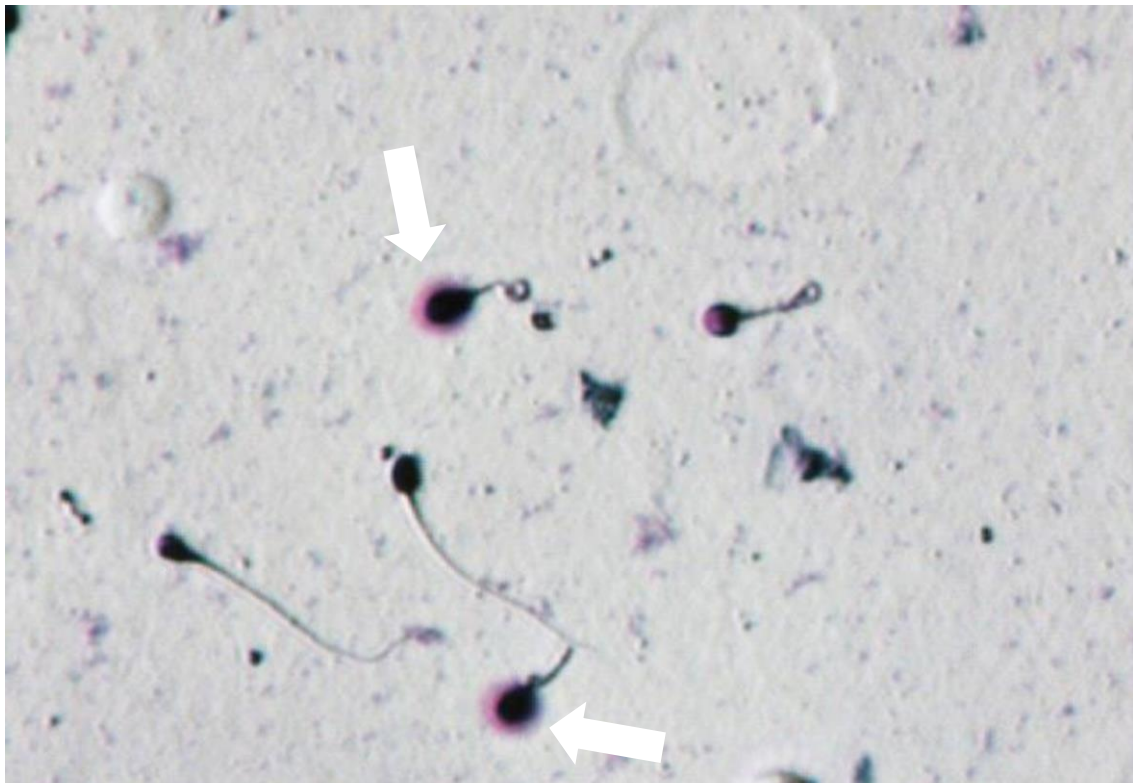


Figura 5: Espermatozoides após o teste de fragmentação de DNA Halosperm. As setas demonstram os espermatozoides com halo, ou seja, com DNA intacto. Os demais sem halo possuem DNA fragmentado.

3.8- Descongelamento

As palhetas do grupo controle foram descongeladas a uma temperatura de 37°C em banho-maria por 10 minutos. O conteúdo das palhetas foi vertido em um tubo de ensaio onde foram adicionados 0,5 mL de meio de cultivo mHTF. As amostras foram então centrifugadas a 200 G, por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o pellet

foi ressuspendido em 0,3 mL de HTF. Uma alíquota de 10 μ l foi retirada e colocada na câmara de Makler para contagem de espermatozoides e análise da motilidade.

RESULTADOS

Foram doadas para o estudo 21 amostras seminais excedentes dos tratamentos de Reprodução Assistida. A média de dias de abstinência sexual dos pacientes foi de 3,7 dias, variando de 3 a 10 dias. O volume médio dos sêmens foi de 2,6 mL, variando de 1,5 a 4,6 mL. O valor médio do pH seminal foi de 8,02, variando de 7,5 a 8,5. A idade média dos pacientes foi de 38,7 anos e variou de 32 a 56 anos. As causas de infertilidade foram: endometriose (n=3), esterilidade sem causa aparente (ESCA) (n=5), falha de coito programado (n=1), falha de inseminação intra-uterina (IIU) (n=1), masculina (n=1), ovariana (n=7), causas múltiplas (n=3).

Tabela 2: Análise da morfologia e status da cromatina no sêmen fresco pré-liofilização

Paciente	Morfologia normal	Cromatina normal
1	7	90
2	10	88
3	8	94
4	5	78
5	9	91
6	6	87
7	5	91
8	10	93
9	4	88
10	18	97
11	11	92
12	10	88
13	--	--
14	--	--
15	4	70
16	8	91
17	4	98
18	9	96
19	4	98
20	9	96
21	10	90

A concentração média observada dos sêmens foi de $83,66 \times 10^6$ e variou de 20×10^6 ao máximo de 200×10^6 . A média da motilidade progressiva foi de 60,62%, variando de 28% a 89%; a média da motilidade não progressiva foi de 7,19%, variando

de 0 a 20%; a média dos imóveis foi de 31,52%, variando de 7% a 57%. A média de espermatozoides morfolologicamente normais foi de 7,95%, variando de 4% a 18%. A média para o status normal da cromatina foi 90,3%, variando de 70% a 98%. Em duas amostras não foi possível a confecção de lâminas para análise da morfologia e status da cromatina (TABELA 2 e 3). A média da fragmentação do DNA do sêmen fresco foi de 13%.

Tabela 3: Variação nos parâmetros concentração e motilidade entre sêmen fresco e congelado com crioprotetor

Paciente	Concentração fresco (x10 ⁶ /mL)	Motilidade progressiva fresco (%)	Motilidade não progressiva fresco (%)	Concentração congelado (x10 ⁶ /mL)	Motilidade progressiva congelado (%)	Motilidade não progressiva congelado (%)	Crioprotetor
1	118	49	0	140	16	13	TYB
2	79	53	12	51	31	17	TYB
3	57	52	11	28,8	26	10	TYB
4	88	36	10	80	37	14	TYB
5	20	46	16	8,5	13	16	TYB
6	89,5	42	9	66	22	8	TYB
7	63	70	1	38,3	21	13	TYB
10	176	89	0	6,4	23	10	TYB
11	106	71	12	5,6	23	9	TYB
11*	106	71	12	2,8	0	0	EDTA
12	103	80	5	82	58	20	TYB
13	24	34	20	18,8	1	2	Vitrolife
14	33	77	3	13	8	12	Vitrolife
15	40	77	2	16	4	5	Vitrolife
16	65	53	4	41,3	31	13	Vitrolife
16*	65	53	4	8,3	0	0	mHTF
17	119	78	2	60	43	3	Vitrolife
19	56	28	15	50	31	10	Vitrolife
20	51	68	3	55	13	6	Vitrolife
21	89,5	33	16	--	--	--	Controle fixação

* amostras congeladas e liofilizadas em mais de um meio

Em três amostras doadas o volume não foi suficiente para congelamento (controle) em palhetas. Uma amostra foi utilizada fresca como controle da fixação para microscopia eletrônica. Dez amostras foram congeladas utilizando-se o crioprotetor *Freeze Medium* (Irvine Scientific) (TYB); sete amostras foram congeladas utilizando-se o crioprotetor *Sperm Freeze Medium* (Vitrolife); uma amostra foi congelada utilizando-se meio tamponado com EDTA e uma amostra foi congelada utilizando-se meio *Human Tubal Fluid* modificado (mHTF).

A concentração média das amostras seminais após congelamento foi de $40,6 \times 10^6$ e variou de $2,8 \times 10^6$ a 140×10^6 . A média da motilidade progressiva foi de 21,1%, variando de 0 a 58%. Excluindo-se os dois casos em que não foram utilizados crioprotetores a média da motilidade progressiva foi de 23,6%. A média da motilidade não progressiva foi de 9,53%, variando de 0 a 20%. Excluindo-se os dois casos em que não foram utilizados crioprotetores a média da motilidade não progressiva foi de 10,65% (TABELA 3).

Nas duas amostras congeladas sem crioprotetor, com meio tamponado com EDTA e meio de cultivo mHTF, todos os espermatozoides encontravam-se imóveis.

Houve uma queda na média das concentrações das amostras que foram congeladas ($83,66 \times 10^6$ X $40,6 \times 10^6$) e da motilidade progressiva (60,62% X 21,1%). A motilidade não progressiva sofreu um aumento em relação à amostra fresca (10,65% X 7,19%). A fragmentação do DNA espermático manteve-se dentro da normalidade 23,5% (valor de referência < 30%, segundo Evenson & Wixon, 2006) (FIGURA 6).

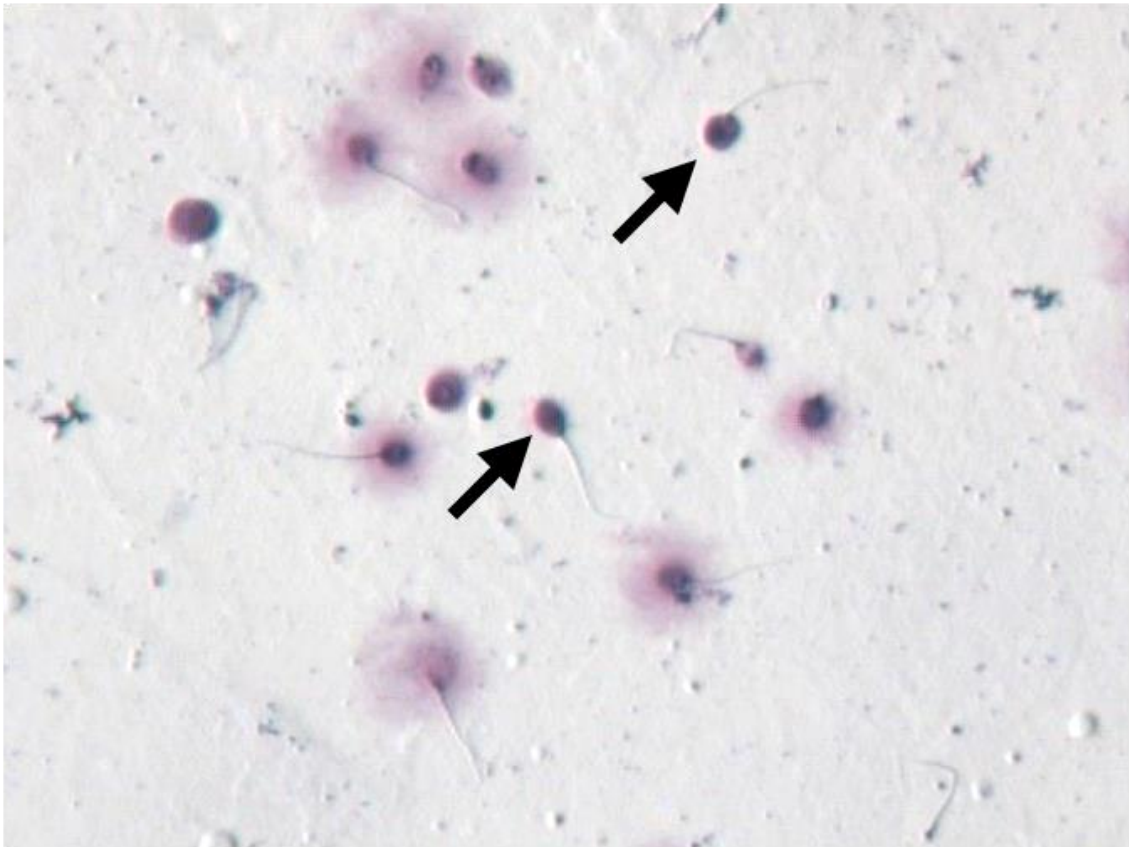


Figura 6: Teste de fragmentação do DNA no sêmen descongelado. A presença do halo ao redor da cabeça do espermatozóide indica que o DNA está intacto. Ausência de halo indica uma fragmentação do DNA (setas).

A amostra número 21, não foi liofilizada, foi utilizada como controle fresco de fixação para microscopia eletrônica.

Trinta e três alíquotas foram previamente congeladas em vapor de nitrogênio líquido e posteriormente submersas em nitrogênio líquido até a sua liofilização. O volume final variou de 0,5 mL a 1mL. Três alíquotas com volume final de 0,5 mL, duas congeladas com Vitrolife e uma com EDTA, foram perdidas no processo de liofilização. Trinta amostras foram analisadas após liofilização (TABELA 4).

Oito alíquotas foram previamente congeladas no freezer e mantidas -80°C até o processo de liofilização. As alíquotas previamente congeladas no freezer não resistiram ao processo de liofilização e extravasaram do frasco durante o processo, indicando que o ponto de fusão não foi mantido adequadamente (FIGURA 7 e 8) (TABELA 5).



Figura 7: Amostras de sêmen no liofilizador. A amostra da direita foi perdida devido ao seu extravasamento do frasco.

Tabela 4: Número de amostras liofilizadas de acordo com meio/crioprotetor e volume final, previamente congeladas no vapor de nitrogênio e submersas em nitrogênio líquido

Meio/Crioprotetor	Volume final 1mL	Volume final 0,5 mL
TYB	5	5
HTF	5	7
EDTA	--	3
Vitrolife	--	8

Tabela 5: Número de amostras liofilizadas de acordo com meio/crioprotetor e volume final, previamente congeladas no freezer

Meio/Crioprotetor	Volume final 1mL	Volume final 0,5 mL
TYB	2	2
HTF	2	1
EDTA	--	1

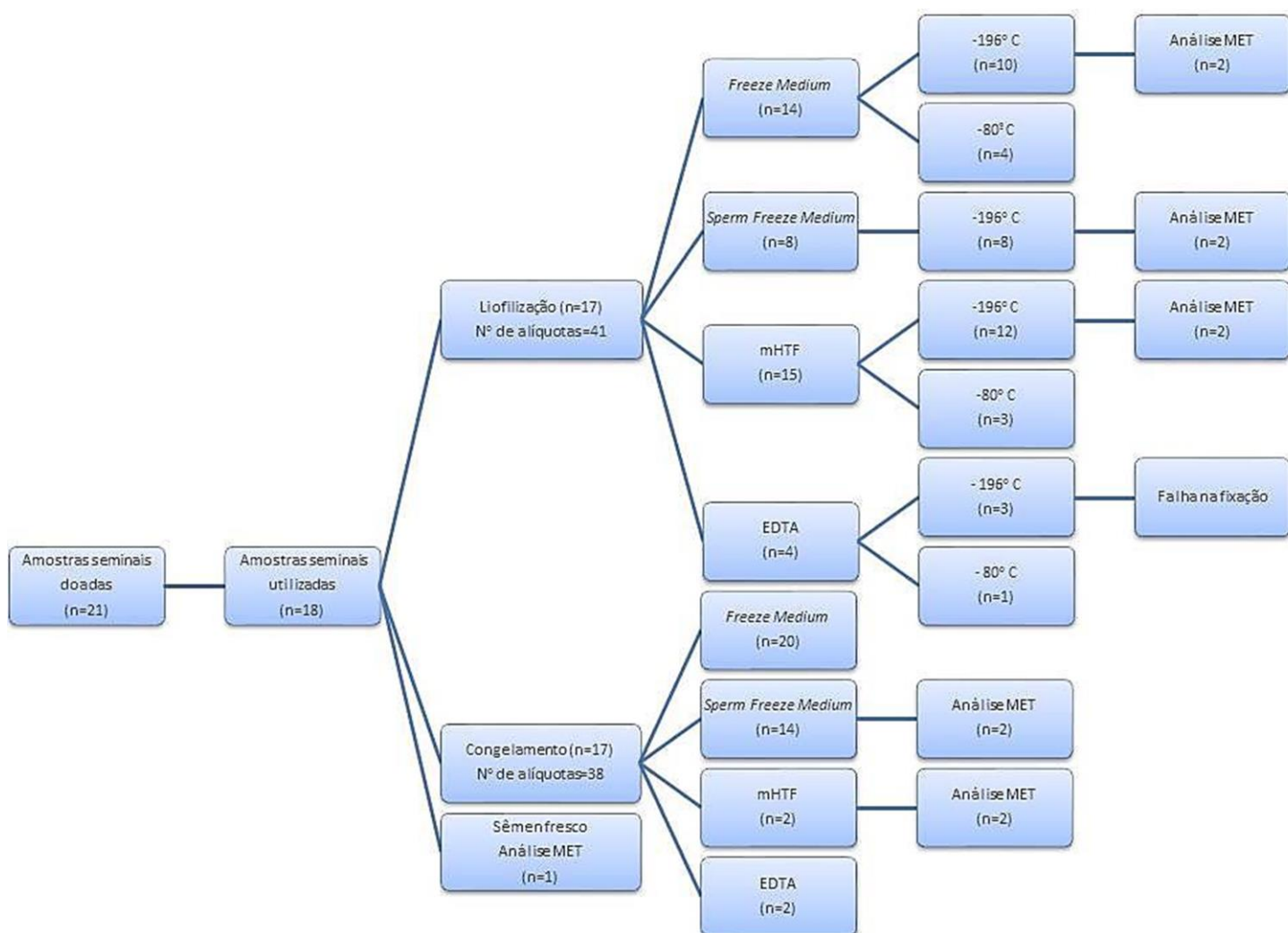


Figura 8: Fluxograma do destino das amostras do estudo

Para reidratação das 30 amostras foi utilizada água para transferência embrionária (Sigma Aldrich, EUA, W1503) de acordo com volume inicial da amostra.

Após a reidratação 12 amostras foram fixadas para análise em microscopia eletrônica de transmissão. As amostras também foram analisadas quanto à motilidade, vitalidade e fragmentação do DNA.

Na análise das 30 amostras foi observada que a morfologia espermática encontrava-se intacta, no aumento de 400 vezes, porém sem sinais de motilidade. Após a realização do teste de vitalidade com Eosina-Nigrosina observou-se 100% de espermatozoides mortos (FIGURA 9). Para verificar as condições de fragmentação do DNA foi realizado o teste Halosperm, no qual, as amostras se encontravam com DNA 100% fragmentado (FIGURA 10).

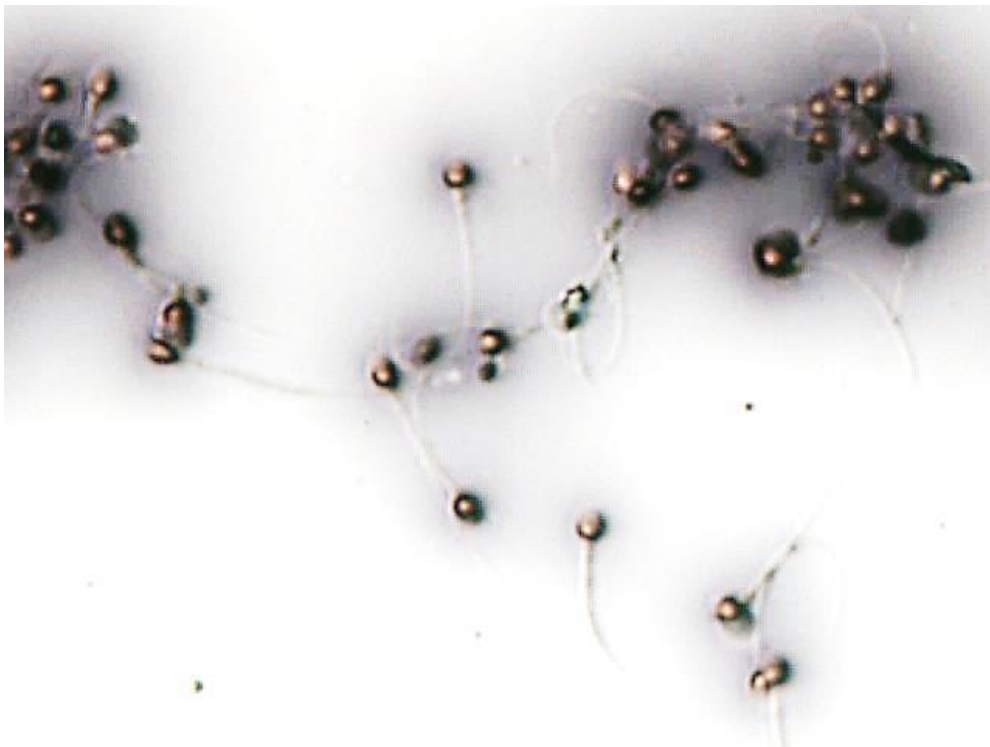


Figura 9: Teste de vitalidade espermática com eosina-nigrosina após reidratação

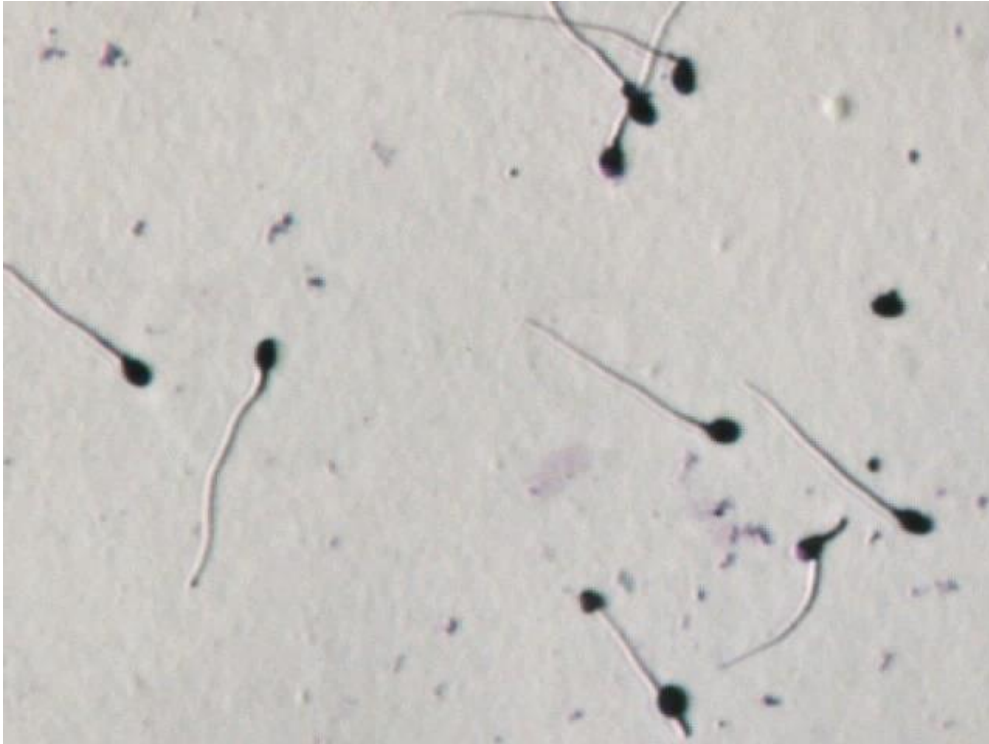


Figura 10: Teste de fragmentação de DNA. Após reidratação da amostra, ausência de halo em todos os espermatozoides.

Todas as amostras liofilizadas tiveram seus espermatozoides considerados fisiologicamente mortos após o processo, observado pelo teste de vitalidade. O DNA das amostras também foi analisado, pelo teste de dispersão da cromatina, e estava fragmentado.

Na análise por microscopia eletrônica de transmissão o sêmen fresco apresentava espermatozoides com cabeça e membrana plasmática intactas, presença de núcleo com cromatina compacta e homogênea, alguns vacúolos fisiológicos, acrossoma com membranas interna, externa e espaço subacrossômico normais. Na peça média, presença das mitocôndrias e fibras densas externas. Foi possível a observação das fibras semicirculares e duas colunas longitudinais de fibras densas, juntamente com a membrana plasmática formando a peça principal do flagelo. Cortes transversais de axonemas da região da peça média permitiram a visualização da membrana plasmática, bainha de mitocôndrias envolvendo as fibras densas externas, 9 pares de microtúbulos periféricos mais 2 pares de microtúbulos centrais. Cortes transversais de axonemas da

região do flagelo permitiram a visualização da membrana plasmática envolvendo a bainha de fibras densas, 9 pares de microtúbulos periféricos mais 2 pares de microtúbulos centrais. (FIGURAS 12, 13, 14, 15, 16, 18 e 19)

Na análise do sêmen congelado com crioprotetor foram observadas algumas lesões na peça média de espermatozoides, com degeneração de algumas mitocôndrias e membrana plasmática rompida em alguns pontos. Nas cabeças, da maioria dos espermatozoides, presença de membrana plasmática, núcleo e acrossoma intactos. No flagelo estrutura de peça principal com membrana plasmática, colunas longitudinais de fibras densas e fibras semicirculares conservadas. (FIGURAS 11, 13, 16, 17 e 18)

Na amostra congelada somente com meio de cultivo mHTF foram observadas diversas cabeças de espermatozoides com a membrana plasmática enrugada e rompida em alguns pontos, porém núcleo com cromatina compacta e homogênea. Foram observados alguns vacúolos grandes. Na peça média foram observadas mitocôndrias intactas. (FIGURAS 11 e 17)

Nas amostras liofilizadas com crioprotetores *Freeze Medium* e *Sperm Freeze Medium* houve um grande comprometimento da estrutura espermática. Na maioria dos espermatozoides as cabeças estavam com membranas plasmáticas rompidas, ausência de acrossoma, núcleo com cromatina heterogênea e descompactada. As peças médias estavam com as mitocôndrias degeneradas. Colunas longitudinais de fibras densas ausentes na peça principal do flagelo. Nos axonemas, em cortes transversais, podem-se observar as estruturas degeneradas ou desorganizadas. (FIGURAS 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 e 19)

Nas amostras liofilizadas em meio mHTF foi possível observar lesões nas membranas plasmáticas, porém maioria dos núcleos mantiveram a cromatina densa e compactada. O acrossoma pode ser observado em alguns espermatozoides. Foi possível

observar algumas cabeças com cromatina heterogênea e descompactada. Na peça média algumas mitocôndrias degeneradas. Nos axonemas foram observadas as estruturas de membrana plasmática, fibras densas externas, microtúbulos conservados, em sua maioria. (FIGURAS 12, 13, 16, 17, 18 e 19)

Em geral, as amostras liofilizadas com crioprotetores tiveram maiores danos às organelas quando comparadas as amostras congeladas e liofilizadas sem crioprotetor, somente com meio mHTF (TABELA 6).

Tabela 6: Danos às estruturas espermáticas de acordo com os meios utilizados

Estrutura	Sêmen Fresco	Sêmen congelado crioprotetor	Sêmen congelado mHTF	Sêmen liofilizado mHTF	Sêmen liofilizado Freeze Medium	Sêmen liofilizado Sperm Freeze Medium
Membrana Plasmática	Intacta	Algumas rompidas	Enrugadas e rompidas	Enrugadas e rompidas	Enrugadas e rompidas	Enrugadas e rompidas
Núcleo	Intacto	Intacto	Intacto	Majoria intacta	Heterogêneo	Heterogêneo
Acrossoma	Intacto	Intacto	Intacto	Presente, lesado	Ausente	Ausente
Peça média	Intacto	Algumas mitocôndrias lesadas	Algumas mitocôndrias lesadas	Algumas mitocôndrias lesadas	Mitocôndrias degeneradas	Mitocôndrias degeneradas
Flagelo	Intacto	Intacto	Intacto	Membrana comprometida	Membrana rompida, estrutura desorganizada	Membrana rompida, estrutura desorganizada
Axonema	Intacto	Intacto	N.A	Majoria conservada	Desorganizado e degenerado	Desorganizado e degenerado

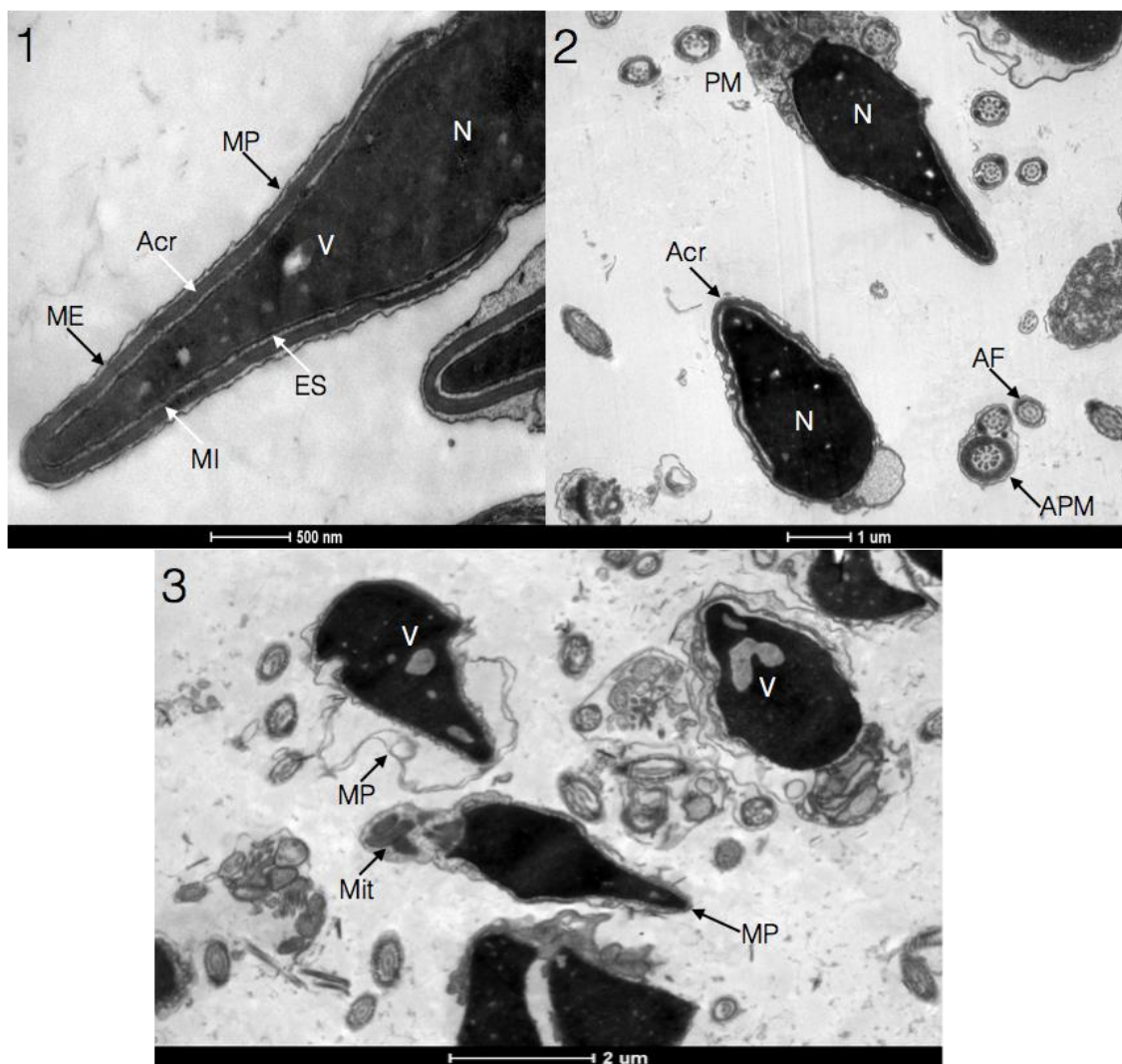


Figura 11: Comparação entre as amostras de sêmen fresca, congelada com crioprotetor e congelada com meio mHTF. 1 Espermatozoide fresco fixado: cabeça com membrana plasmática (MP), acrossoma (Acr), membranas externa (ME) e interna (MI), espaço sub-acrossômico (ES), núcleo (N) e vacúolos fisiológicos (V). 2 Espermatozoides congelados com crioprotetor: acrossoma (Acr), núcleo (N), axonema da peça média (APM) e axonema do flagelo (AF) intactos, peça média (PM) com mitocôndrias bem conservadas. 3 Espermatozoides congelados com meio de cultivo mHTF. Membranas plasmáticas (MP) enrugadas e rompidas, núcleos com grandes vacúolos (V), peça média com mitocôndrias (Mit) preservadas.

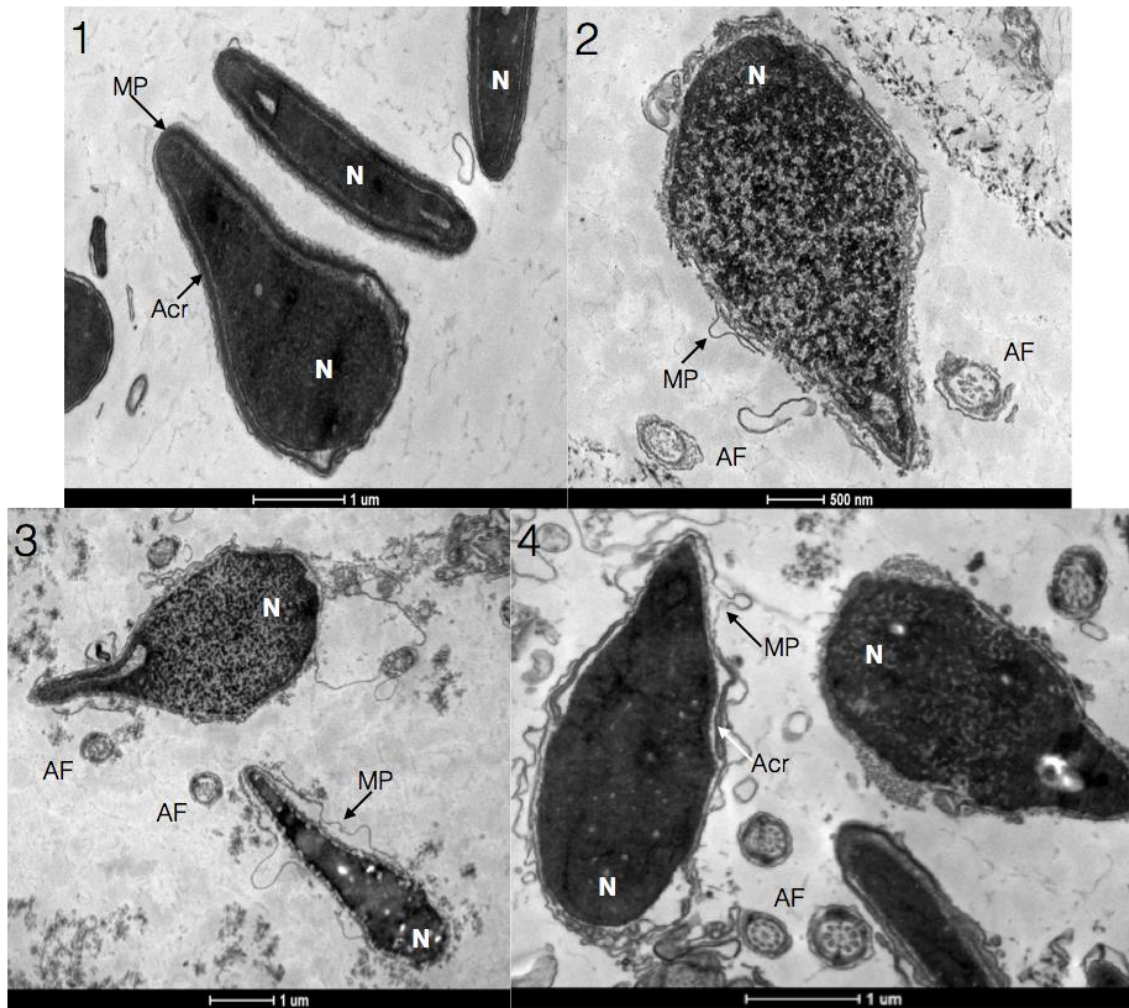


Figura 12: Comparação entre as cabeças dos espermatozoides frescos, liofilizados com *Sperm Freeze Medium*, liofilizados com *Freeze Medium* e liofilizados com mHTF. 1 Espermatozoides frescos: membrana plasmática (MP), núcleo (N) e acrossoma (Acr) intactos. 2 Espermatozoides liofilizados com *Sperm Freeze Mediu*: Membrana plasmática rompida, acrossoma ausente e a cromatina do núcleo heterogênea e dispersa. Os axonemas do flagelo (AF) estão com suas estruturas comprometidas. 3 Espermatozoides liofilizados com *Freeze Medium*: núcleos, membranas plasmáticas e axonemas comprometidos. 4 Espermatozoides liofilizados em meio mHTF: membrana plasmática enrugada e rompida em alguns pontos. Acrossoma presente. Cromatina homogênea e compacta no núcleo. Os axonemas da região do flagelo com a estrutura preservada.

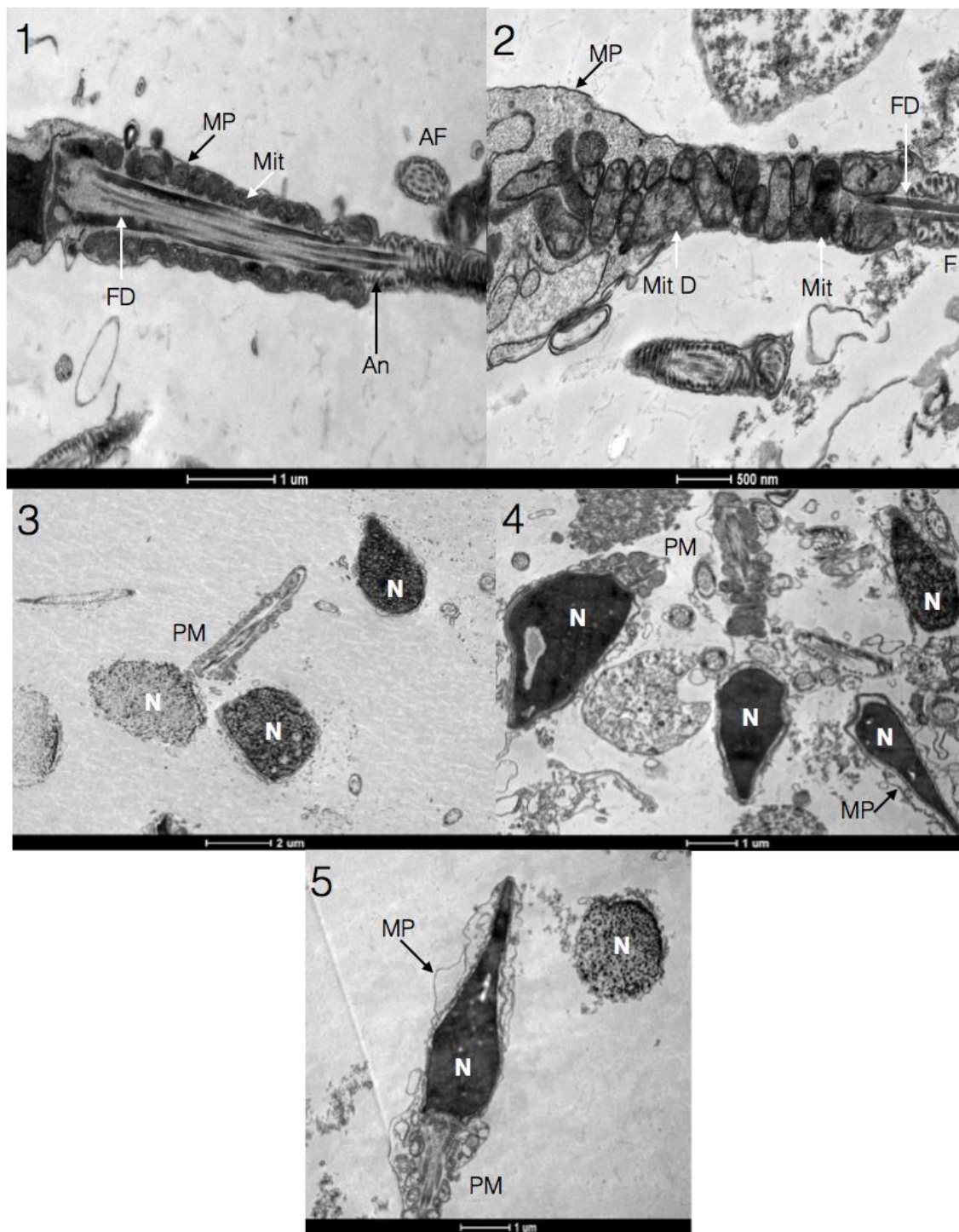


Figura 13: Comparação entre as peças médias dos espermatozoides fresco, congelado com crioprotetor, liofilizados em *Sperm Freeze Medium*, liofilizado em *Freeze Medium*, liofilizados em meio mHTF. 1 Espermatozoide fresco: peça média com a membrana plasmática (MP), mitocôndrias (Mit) e fibras densas externas (FD) intactas. A região do annulus (An) bem delimitada. Um corte de axonema do flagelo (AF) pode ser observado. 2 Espermatozoide congelado com crioprotetor: membrana plasmática rompida em alguns pontos e peça média com algumas mitocôndrias comprometidas (Mit D). O flagelo (F) e as fibras densas externas em perfeitas condições após o congelamento. 3 Espermatozoides liofilizados em *Sperm Freeze Medium*: a membrana plasmática e acrossoma ausentes. O núcleo encontra-se com a cromatina heterogênea.

As mitocôndrias da peça média (PM) estão com a membrana rompida. 4 Espermatozoides liofilizados em meio mHTF: algumas membranas plasmáticas com regiões rompidas e enrugadas, mas com presença de acrossoma. As mitocôndrias da peça média preservadas. 5 Espermatozoides liofilizados no *Freeze Medium*: núcleo, acima a direita, com cromatina heterogênea e membrana plasmática ausente. No espermatozoide central, membrana plasmática rompida e enrugada. Cromatina homogênea. Mitocôndrias da peça média foram degradadas.

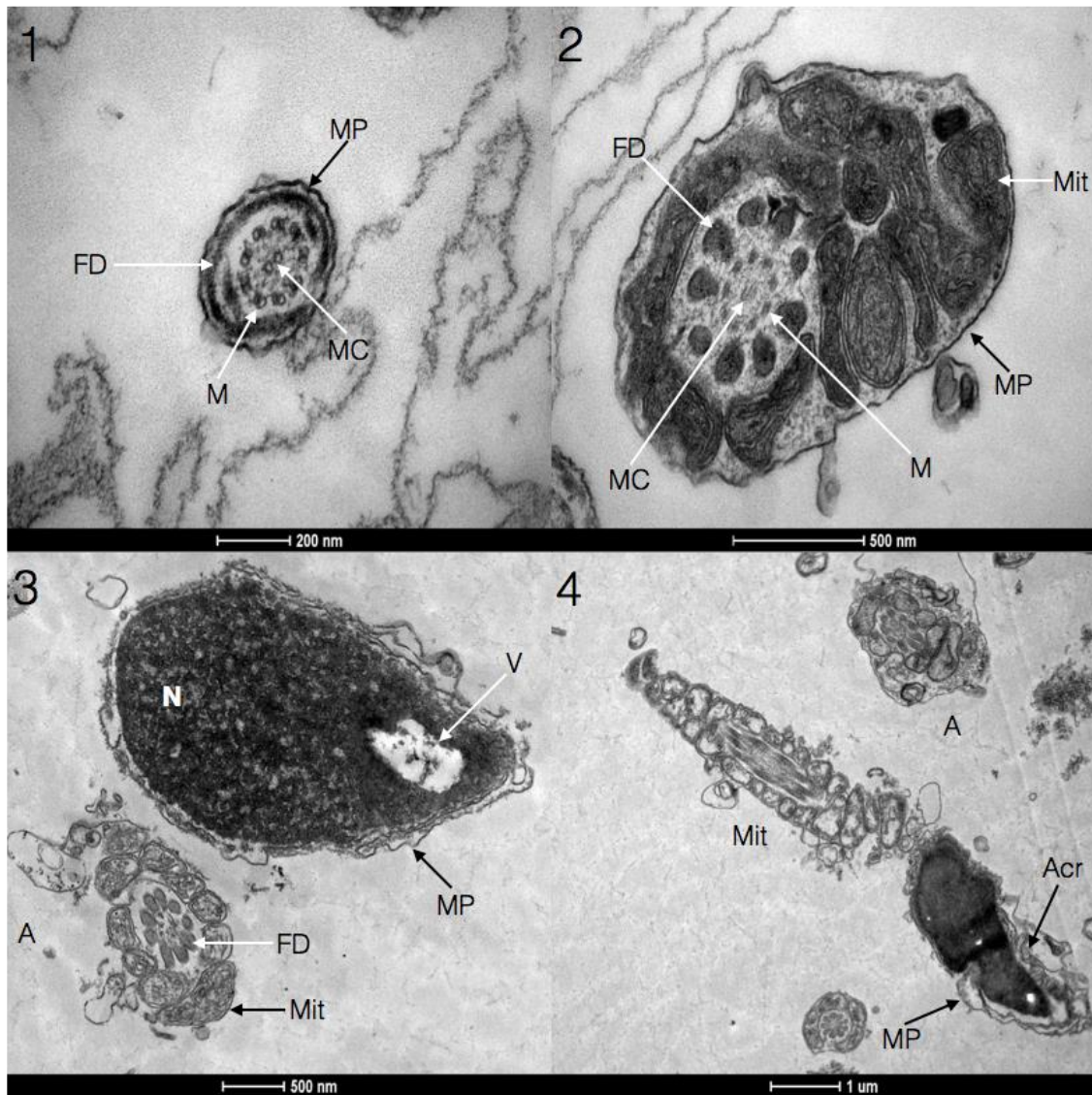


Figura 14: Comparação entre as estruturas dos axonemas em espermatozoides frescos, liofilizados em *Sperm Freeze Medium* e liofilizados em *Freeze Medium*. 1 Espermatozoide fresco: axonema da região do flagelo com os nove pares microtúbulos periféricos (M) e dois microtúbulos centrais (MC), fibras densas externas (FD) e membrana plasmática (MP). 2 Espermatozoide fresco: axonema da região da peça média com membrana plasmática (MP), bainha de mitocôndrias (Mit), fibras densas externas (FD) e arranjo de microtúbulos 9+2. 3 Espermatozoide liofilizado em *Freeze Medium*: membrana plasmática rompida. Núcleo fragmentado e com um grande vacúolo (V). O axonema (A) da região da peça média com as mitocôndrias degradadas, presença de fibras densas e microtúbulos desorganizados. 4 Espermatozide liofilizado em *Sperm Freeze Medium*: membrana plasmática enrugada e rompida. Acrossoma (Acr) degenerado. Mitocôndrias danificadas na região da peça média e no corte do axonema.

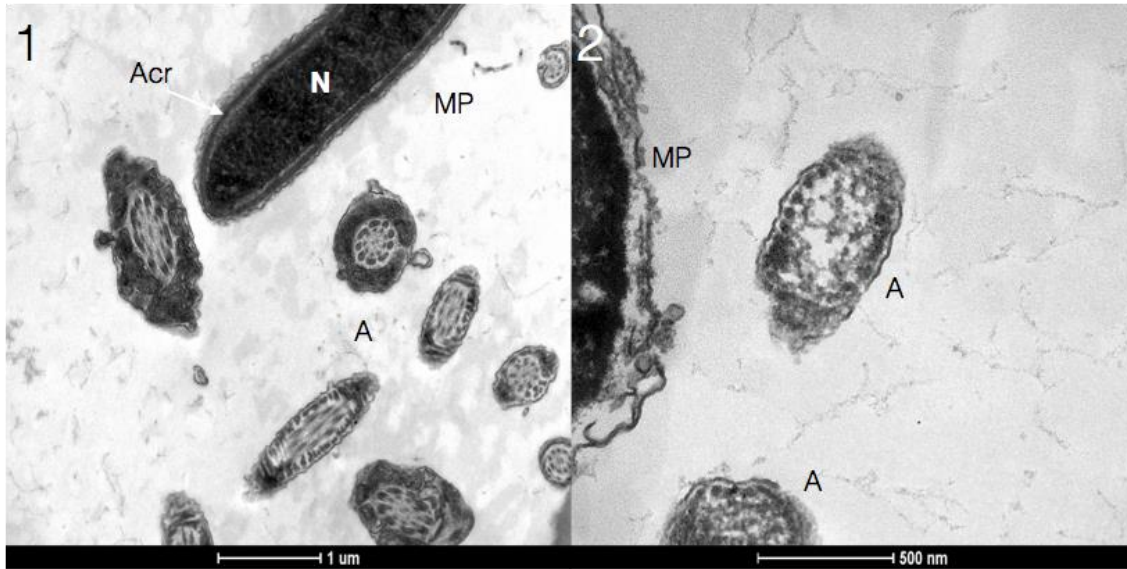


Figura 15: Comparação entre os axonemas de espermatozoides frescos e liofilizados em *Sperm Freeze Medium*. 1 Espermatozoides frescos: núcleo (N), acrossoma (Acr) e membrana plasmática, axonemas intactos. 2 Espermatozoides liofilizados: membrana plasmática rompida e acrossoma ausente. Axonemas com membranas plasmáticas rompidas, organização de fibras densas e microtúbulos desfeitas.

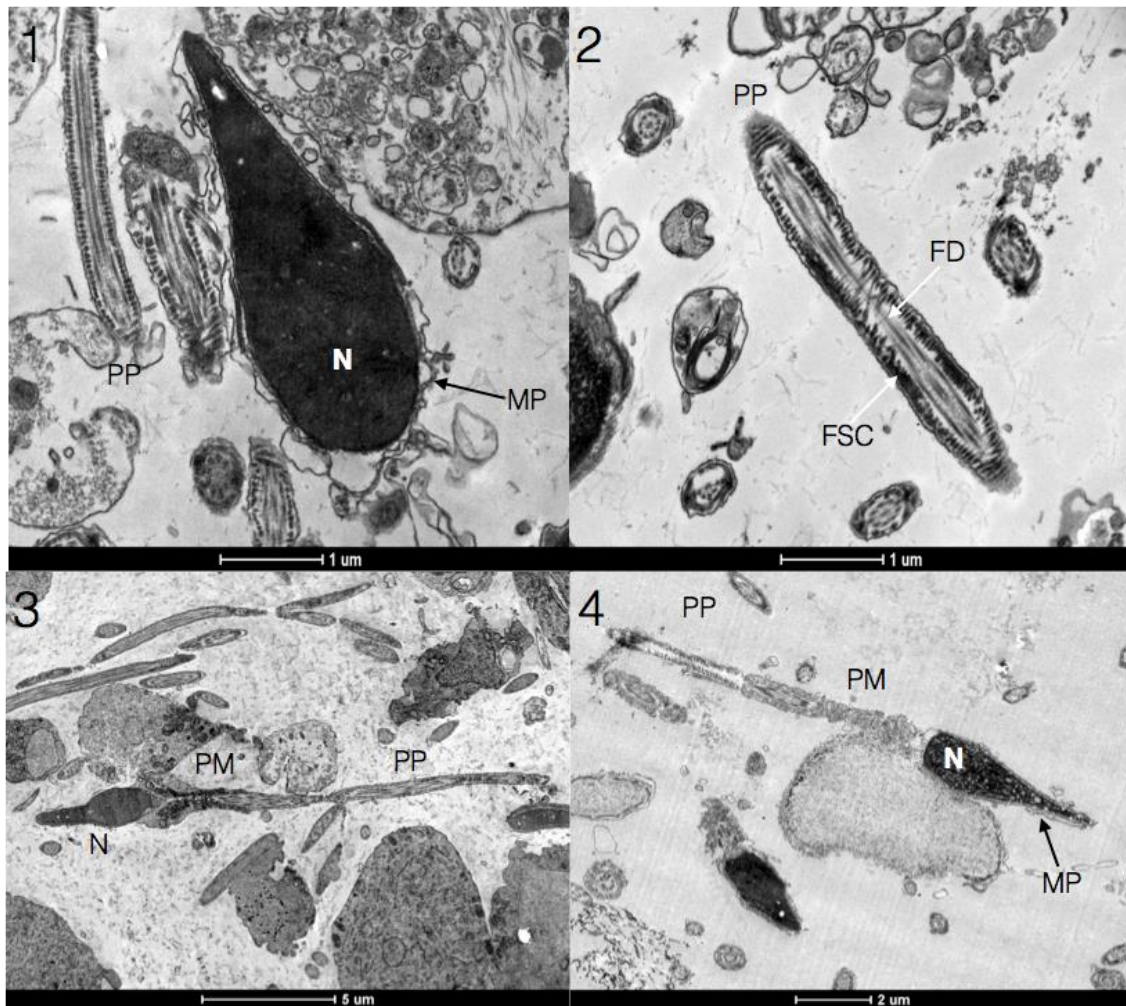


Figura 16: Comparação entre as estruturas dos espermatozoides liofilizados em meio mHTF, congelados com crioprotetor, fresco e liofilizado em *Freeze Medium*. 1 Espermatozoides liofilizados em meio mHTF: peça principal (PP) do flagelo com as fibras densas e fibras semi circulares intactas. Na região da cabeça, membrana plasmática (MP) enrugada e rompida em alguns pontos. Cromatina no núcleo (N) homogênea e compacta. 2 Espermatozoides congelados com crioprotetor: peça principal, com fibras densas (FD) e fibras semi circulares (FSC). 3 Espermatozoides frescos: cabeça, com núcleo (N), peça média (PM) e peça principal do flagelo (PP) intactos. 4 Espermatozoides liofilizado sem *Freeze Medium*: membrana plasmática rompida, núcleo com cromatina heterogênea, peça média com mitocôndrias lesadas e peça principal do flagelo sem as colunas longitudinais de fibras densas.

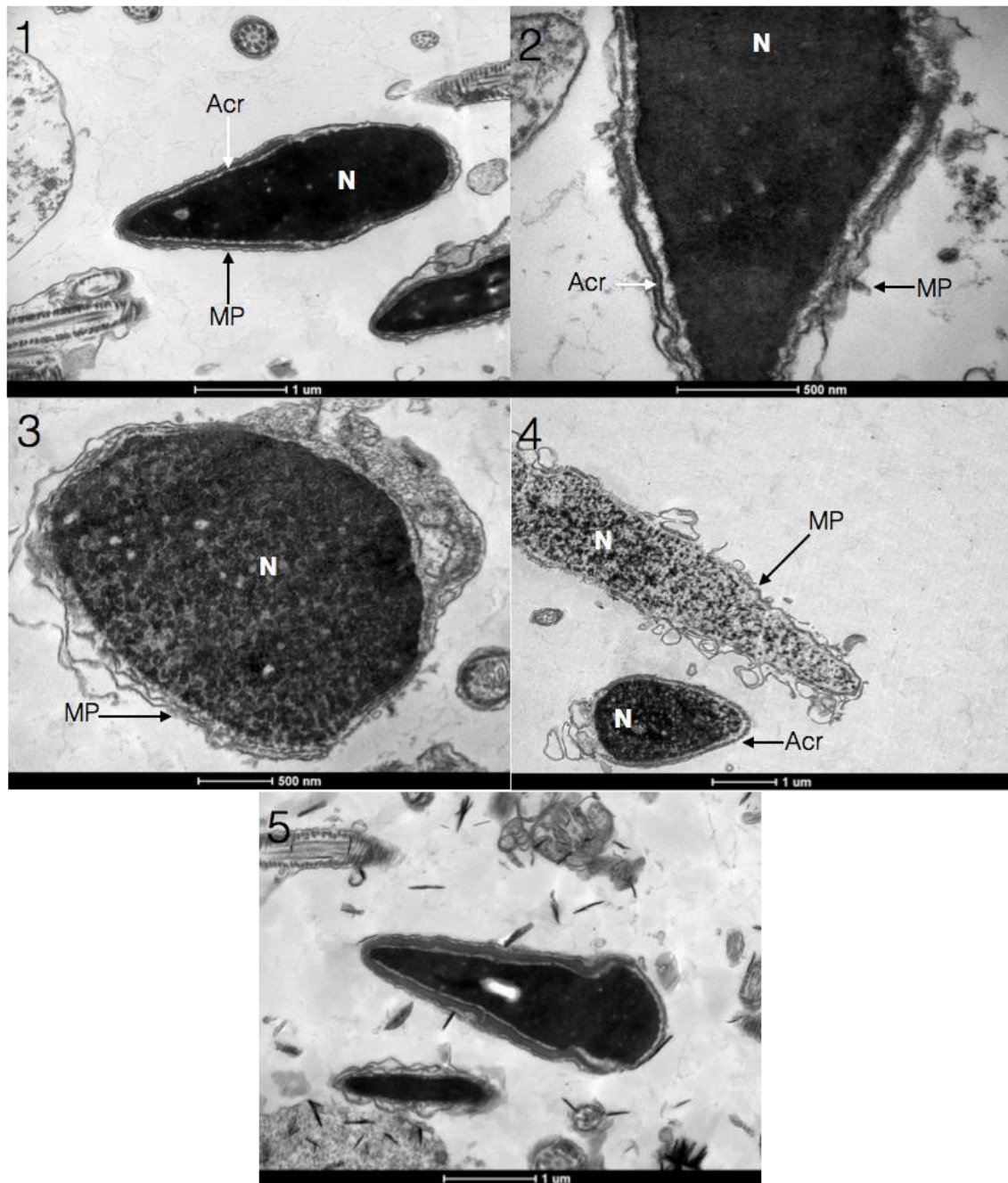


Figura 17: Comparação entre as cabeças de espermatozoides congelados com crioprotetor, liofilizados em mHTF, liofilizados em *Freeze Medium*, liofilizados em *Sperm Freeze Medium* e congelados em mHTF. 1 Espermatozoides frescos: membrana plasmática (MP), acrossoma (Acr) e núcleo (N). 2 Espermatozoides liofilizados em mHTF: membrana plasmática rompida e acrossoma comprometido. Núcleo com a cromatina homogênea e compacta. 3 Espermatozoides liofilizados em *Freeze Medium*: membranas plasmáticas rompidas, núcleos com cromatina comprometida. 4 Espermatozoides liofilizados em *Sperm Freeze Medium*: uma cabeça com núcleo degradado. Abaixo, estrutura de cabeça com cromatina heterogênea e acrossoma. 5 Espermatozoides congelados em mHTF: membrana plasmática, acrossoma e núcleo conservados.

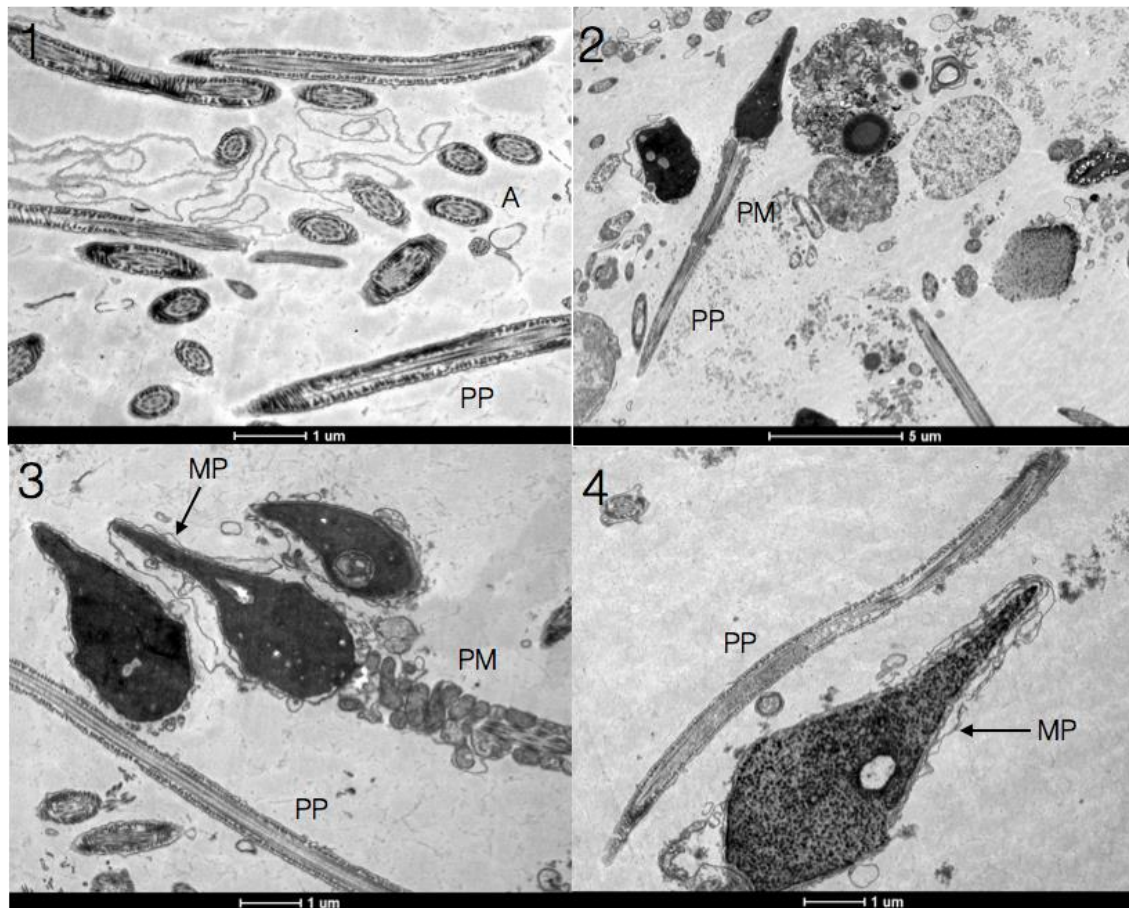


Figura 18: Comparação entre flagelos dos espermatozoides frescos, congelados com crioprotetor, liofilizados com mHTF, liofilizados com *Freeze Medium*. 1 Espermatozoides frescos: peças principais do flagelo (PP) com as fibras semi circulares e fibras densas. Vários cortes de axonemas (A). 2 Espermatozoides congelados com crioprotetor: cabeça, peça média (PM) e flagelo (F) intactos apesar da membrana plasmática rompida em alguns pontos. 3 Espermatozoides liofilizados em mHTF: membranas plasmáticas rompidas, inclusive na peça média e peça principal do flagelo. Na peça principal do flagelo as estruturas das fibras podem ser visualizadas. Peça média com algumas mitocôndrias comprometidas. Cromatina compacta e homogênea. 4 Espermatozoides liofilizados em *Freeze Medium*: membrana plasmática rompida, cromatina heterogênea, peça principal do flagelo sem fibras semi circulares e colunas longitudinais de fibras densas.

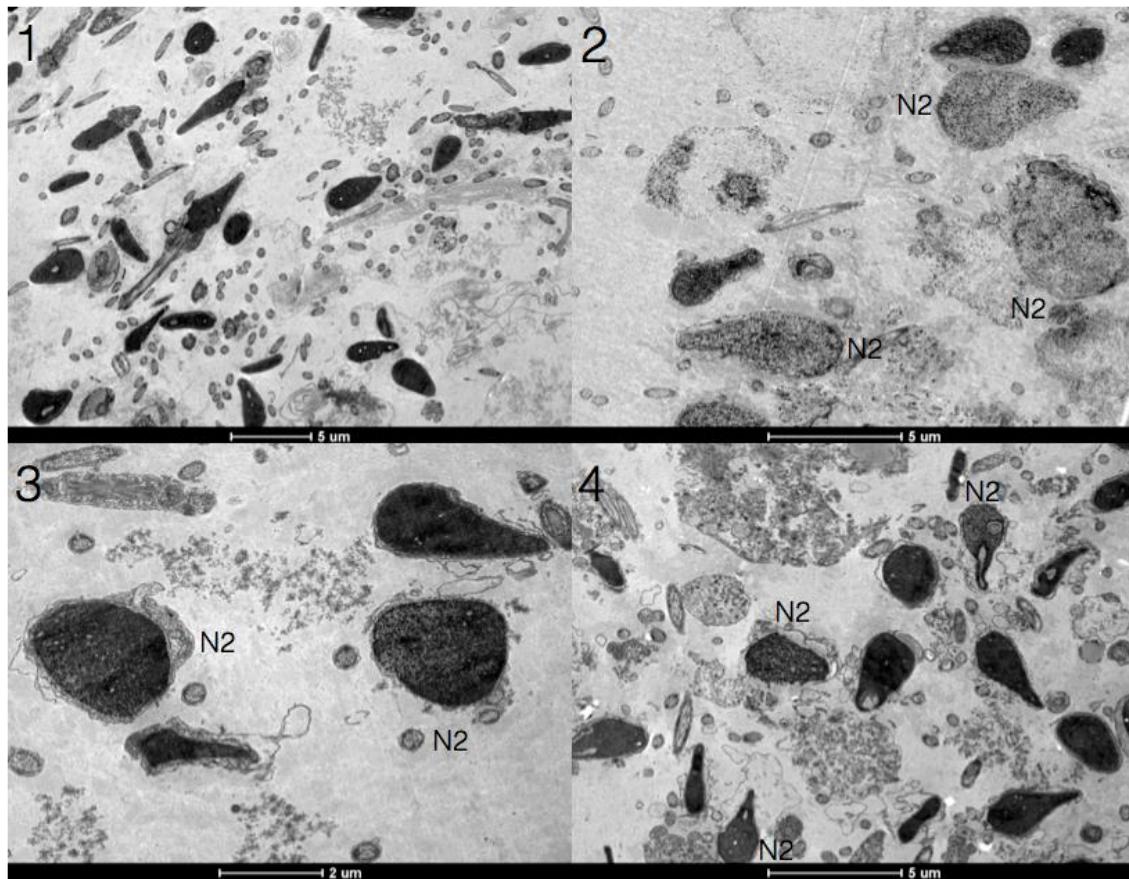


Figura 19: Comparação entre as cabeças dos espermatozoides frescos, liofilizados em *Sperm Freeze Medium*, liofilizados em *Freeze Medium*, liofilizados em mHTF. 1 Espermatozoides frescos: todos os espermatozoides com cabeças intactas. 2 Espermatozoides liofilizados em *Sperm Freeze Medium*: cromatina heterogênea e descompactada (N2), núcleos degenerados, na grande maioria dos espermatozoides. 3 Espermatozoides liofilizados em *Freeze Medium*: cromatina heterogênea e descompactada. 4 Espermatozoides liofilizados em mHTF: algumas cabeças apresentaram descompactação da da cromatina, maioria com cromatina intacta.

DISCUSSÃO

Nosso estudo demonstrou, provavelmente pela primeira vez, a ultraestrutura espermática por microscopia eletrônica de transmissão, após liofilização de sêmen humano em diferentes meios contendo ou não crioprotetores. Identificamos que a viabilidade e motilidade espermática pós-liofilização do sêmen humano, no presente estudo, foi nula. Foi observada a integridade da membrana plasmática, mitocôndrias e acrossoma; a estrutura da peça média; disposição do axonema; estrutura do núcleo e sua cromatina; forma do flagelo e suas regiões, nos diferentes meios utilizados para liofilização das amostras.

A mesma amostra seminal doada foi dividida para liofilização e congelamento convencional. O grupo controle de congelamento foi composto por amostras seminais que foram criopreservadas pelo método tradicional e utilizando-se crioprotetores de eficácia comprovada, *Freeze Medium* ou *Sperm Freeze Medium*, (HALLAK *et al*, 2000; TEKCAN *et al*, 2011) ou meio tamponado com EDTA ou meio de cultivo mHTF. Esses mesmos quatro meios também foram utilizados no processo de liofilização das amostras. As amostras do grupo controle congeladas com meios contendo glicerol, *Freeze Medium* ou *Sperm Freeze Medium*, como agente crioprotetor, quando comparadas com sêmen fresco, tiveram uma queda na porcentagem de espermatozoides móveis e uma queda na concentração espermática. A diminuição da motilidade ocorreu dentro do esperado, uma vez que a criopreservação pode levar a uma diminuição da fosforilação oxidativa (HALLAK *et al*, 2000; WANG *et al*, 2003). A diminuição da concentração provavelmente foi causada pela alíquotagem das amostras. Houve também um aumento da fragmentação do DNA espermático, mas mantendo-se dentro da normalidade. Quanto à análise morfológica por microscopia eletrônica de transmissão, foi observado que os espermatozoides congelados com crioprotetor mantiveram a integridade da membrana plasmática, núcleo, peça média e flagelo. Já as amostras

congeladas com mHTF e EDTA tiveram piores resultados, com ausência total de motilidade. Os meios mHTF e EDTA não foram capazes de manter a motilidade espermática. Na análise por microscopia eletrônica, os espermatozoides congelados com mHTF mantiveram a cromatina intacta, apesar da membrana plasmática rompida em alguns pontos. A única amostra de sêmen criopreservada com EDTA não foi analisada, por falha na fixação da amostra.

O efeito mais marcante da liofilização do sêmen humano foi a perda total de motilidade e viabilidade após reidratação das amostras, assim como observado por Kusakabe *et al* (2008) e Gianaroli *et al* (2012). Kaneko *et al* (2003) observaram após teste de vitalidade que todos os espermatozoides murinos, pós-liofilização, estavam altamente corados, indicando danos à membrana plasmática. Cabeças separadas das caudas e caudas quebradas foram observadas com frequência, por meio de microscopia óptica, pelos pesquisadores. Essas estruturas podem ter se tornado quebradiças e com a mínima agitação terem rompido. Esses espermatozoides foram considerados fisiologicamente mortos, pois apresentavam ausência de motilidade e ausência de vitalidade. O DNA das amostras também foi analisado em nosso estudo, pelo teste de dispersão da cromatina (Halosperm), e estava 100% fragmentado. Diferentemente do obtido por Kusakabe *et al* (2008) e Gianaroli *et al* (2012) que observaram que apesar de os espermatozoides estarem fisiologicamente mortos ainda possuíam DNA íntegro. Kusakabe *et al* (2008) injetaram os espermatozoides humanos, pós-liofilização e reidratados, em 478 oócitos de camundongos enucleados para estudar o comportamento cromossômico. Eles observaram que 404 oócitos realizaram a primeira divisão mitótica e 358 possuíam cromossomos normais. Dentre as alterações que eles observaram, a mais frequente foi a quebra cromossômica. Dessa forma, os pesquisadores conseguiram demonstrar quem, apesar da ausência de motilidade o conteúdo cromossômico se

mantinha intacto e era capaz de suportar o desenvolvimento embrionário. Já Gianaroli *et al* (2012) demonstraram a viabilidade dos cromossomos espermáticos através do teste de fragmentação do DNA, Halosperm. Após a análise de 30.013 espermatozoides eles observaram que 80,6% estavam com DNA intacto pós-liofilização e 77,8% estavam com DNA intacto no sêmen fresco, não havendo diferença significativa entre os grupos. Esses autores confirmaram o observado por Kusakabe *et al* (2008), mesmo em espermatozoides considerados fisiologicamente mortos o DNA poderia estar intacto.

As amostras liofilizadas com crioprotetores, *Sperm Freeze Medium* ou *Freeze Medium*, tiveram um alto grau de comprometimento das estruturas espermáticas. Os espermatozoides tiveram sua membrana plasmática rompida e acrossoma danificados ou muitas vezes ausentes. Em diversos espermatozoides a cromatina encontrava-se heterogênea e dispersa. Na peça média as mitocôndrias sofreram lesões em suas membranas. Alguns axonemas apresentaram aberrações nos arranjos de microtúbulos e fibras densas. Na peça principal do flagelo alterações nas colunas longitudinais foram observadas. A presença de vacúolos no núcleo pode ser intrínseca do espermatozoide ou pode ter sido causada pela liofilização, já que houve uma alta incidência desses nos espermatozoides liofilizados. Segundo Alcay *et al* (2015) meios contendo glicerol não podem ser liofilizados com sucesso, o que provavelmente levou a danos às organelas. O meio de congelamento seminal *Freeze Medium* utilizado em nosso estudo é rico em lipoproteína de baixa densidade (LDL), cuja função é proteger os fosfolípidos da membrana plasmática contra os danos do congelamento e descongelamento. Os sêmens liofilizados utilizando-se esse meio não formaram um bom líófilo, provavelmente devido a presença de glicerol. Apesar da presença das lipoproteínas de baixa densidade as membranas dos espermatozoides após liofilização estavam rompidas.

As alterações nas amostras liofilizadas com crioprotetores provavelmente foram ocasionadas durante o processo de desidratação, uma vez que no grupo controle de sêmen congelado com crioprotetores, as estruturas e organelas permaneceram intactas.

As amostras liofilizadas com meio mHTF apresentaram menos aberrações estruturais, possivelmente pela ação protetora da albumina presente no meio. A maioria dos espermatozoides estava com cromatina compacta e homogênea, apesar de a membrana plasmática estar rompida. Esse achado está de acordo com o observado por Wakayama & Yanagimachi (1998) que também utilizaram meios de cultivo comuns CZB e DMEM como solução de liofilização. Os meios continham albumina, o que provavelmente conferiu ação protetora ao DNA espermático durante o processo de liofilização, permitiu desenvolvimento embrionário e nascimento de prole viva no estudo dos pesquisadores.

Várias soluções para liofilização têm sido utilizadas para tentar manter a integridade espermática, como albumina (WAKAYAMA & YANAGIMACHI, 1998; WAKAYAMA *et al*, 1998) EGTA (KANEKO *et al*, 2003; KUSAKABE *et al*, 2001), EDTA (KANEKO & NAKAGATA, 2006; HOCHI *et al*, 2008), trealose (MCGINNIS *et al*, 2005), combinações de dissacarídeos como lactose, trealose e sacarose (GARCIA *et al*, 2014). Kusakabe *et al* (2001) utilizaram EGTA como solução de liofilização e observaram melhores resultados na manutenção da integridade cromossômica. Kusakabe *et al* (2008) observaram que a incubação com tampão de EGTA, de 1 a 6 dias antes do processo de liofilização, poderia aumentar a resistência cromossômica em espermatozoides de camundongos. Provavelmente porque sua ação quelante de cálcio inibe as topoisomerasas que clivam o DNA no núcleo. Utilizando-se uma solução de 1 mM de EDTA Kaneko & Nakagata (2006) e Hochi *et al* (2008) conseguiram manter a estabilidade cromossômica de espermatozoides de camundongos e ratos após um ano de

liofilização. Os tampões de EGTA e EDTA são supressores da atividade das nucleases endógenas presentes nos espermatozoides, mas podem não reduzir os efeitos das nucleases exógenas durante o processo de liofilização (KANeko & NAKAGATA, 2005). A atividade das nucleases depende das condições da solução tampão: pH e temperatura. A maioria das endonucleases requerem íons de cálcio ou magnésio e podem ser inibidas por um agente divalente quelante de cátions. Kusakabe *et al* (2001) e Kaneko *et al* (2003) observaram que meios sem cálcio e magnésio mantem melhor a integridade dos cromossomos de espermatozoides liofilizados que outros meios. EGTA é um quelante de cálcio que pode prevenir ou reduzir a atividade das endonucleases dependentes de cálcio, ao limitar a disponibilidade do cálcio circulante (MARTINS *et al*, 2007). Em nosso estudo houve a liofilização de amostras em EDTA, porém em nenhuma delas foi possível a visualização na microscopia eletrônica de transmissão para verificar os efeitos do processo nos espermatozoides.

Kaneko *et al* (2003) observaram que quando o liofilização era realizada em uma solução levemente alcalina (pH 8.0) a integridade dos cromossomos era mantida durante o processo e a capacidade de desenvolvimento embrionária era melhor. O pH das soluções utilizadas em nosso estudo foi neutro. A solução de EDTA utilizada tinha o pH de 7.4; o pH do meio de cultivo mHTF era de 7,35; o pH do meio de congelamento *Freeze Medium* era 7,4; o pH do meio de congelamento da *Sperm Freeze Solution* era 7,45. O uso de soluções mais alcalinas talvez tivesse conservado melhor a estrutura cromossômica dos espermatozoides.

Os testes de fragmentação espermática foram criados para melhorar o prognóstico dos tratamentos de infertilidade (EVENSON & WIXON, 2005; EVENSON & WIXON, 2006; TANDARA *et al*, 2014). Esses testes identificam quebras simples ou duplas no DNA espermático; modificações nas bases do DNA, como oxidação, ligações

inter e intra fitas de DNA; ligações entre proteínas e DNA. Vários testes surgiram, como o TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*) (GORCZYCA *et al*, 1993), Cometa (HUGHES *et al*, 1996), Teste de Dispersão da Cromatina (SCD) (FERNADEZ *et al*, 2003), Ensaio da Estrutura da Cromatina Espermática (SCSA) (EVENSON *et al*, 1990; EVENSON & WIXON, 2005), detecção de quebras por hibridização fluorescente *in situ* (FERNANDEZ *et al*, 2005), para detecção desses danos. Alguns destes testes medem diretamente os danos ao DNA espermático como TUNEL e Cometa, em pH neutro. Outros medem os danos ao DNA após desnaturação da amostra em pH ácido ou alcalino, como Teste de Dispersão da Cromatina, Ensaio da Estrutura da Cromatina Espermática e Cometa (FRANKEN & OEHNINGER, 2012). O Teste de Dispersão da Cromatina (Halosperm) teve sua eficácia comparada ao TUNEL através de testes realizados em paralelo (CHOHAN *et al*, 2006; ZHANG *et al*, 2010). Além disso, o Halosperm demonstrou ser um teste mais prático e rápido para verificação da cromatina espermática. Em nosso estudo o Halosperm foi teste de escolha para verificar a fragmentação espermática.

Os resultados de fragmentação espermática obtidos, para sêmen fresco e sêmen congelado, foram comparáveis aos obtidos na literatura (EVENSON & WIXON, 2006; TANDARA *et al*, 2014). Evenson & Wixon (2006) observaram que uma fragmentação do DNA espermático < 30% aumentava as chances em 7,3 vezes de gravidez e parto em pacientes submetidas em inseminação intrauterina, 2 vezes para pacientes de fertilização *in vitro* e havia uma tendência de 1,6 vezes mais chances de gravidez e parto para pacientes de ICSI. Tandara *et al* (2014) também observaram um bom prognóstico para gravidez, em pacientes de FIV, quando possuíam < 28% de fragmentação de DNA espermático. Gosálvez *et al* (2011) observaram um aumento da fragmentação do DNA espermático após congelamento e descongelamento de amostras quando comparadas ao

sêmen fresco. As amostras frescas, de pacientes com fertilidade comprovada, possuíam taxa de fragmentação de DNA de 14.3% sendo menores do que as taxas de fragmentação em amostras congeladas e descongeladas 19.4%, porém sem significância estatística. Amostras incubadas por um período de 6 horas, tanto frescas quanto descongeladas, após processamento por gradiente de densidade, apresentaram aumento na fragmentação do DNA com diferença estatística (24,2% x 45,3% $p=0,005$). Porém, esse estudo foi realizado em pacientes férteis, diferentemente dos sêmens utilizados em nosso estudo que eram excedentes de tratamentos de infertilidade. Para sêmen fresco obtivemos uma taxa de fragmentação de DNA de 13%. Em nosso estudo obtivemos uma taxa de fragmentação dentro da normalidade para sêmen congelado 23,5%, porém inferiores às obtidas por Gosálvez *et al* (2011) provavelmente devido a população de estudo do autor ter sido composta por pacientes com fertilidade comprovada.

Nas amostras liofilizadas 100% dos espermatozoides estavam com DNA fragmentado após realização do teste de dispersão da cromatina. Provavelmente esses danos foram amplificados com a desidratação das amostras, uma vez que ao congelar as amostras já se observava um aumento da fragmentação do DNA. A liofilização é uma técnica na qual amostra é previamente congelada para ser sublimada, sendo de suma importância a proteção contra crio-injúrias e contra a desidratação intensa. O processo de congelamento seminal convencionalmente utiliza crioprotetores penetrantes e não penetrantes que auxiliam na perda celular de água ao aumentar a osmolaridade extracelular. A desidratação intensa, choque osmótico, formação de gelo intracelular, estresse oxidativo podem destruir a estrutura funcional do espermatozoide. A interação dos fatores tempo, temperatura e pressão regulam a cinética e o grau de desidratação das amostras. Durante a liofilização, devido à limitação do equipamento utilizado em nosso

estudo, não foi possível controlar a pressão e temperatura do processo, o que pode ter ocasionado a fragmentação intensa do DNA espermático.

Observamos que ao serem colocadas no equipamento de liofilização as amostras tinham sua superfície levemente descongeladas até que houvesse estabilização da pressão e temperatura de -50°C na câmara de liofilização. Essa temperatura não necessariamente era a temperatura da amostra. Devido a isso, novos testes devem ser feitos para que se saiba a temperatura das amostras durante a desidratação. Sabe-se que a temperatura durante o processo pode alterar o resultado final da liofilização. Segundo Hara *et al* (2014) a velocidade da desidratação decresce se a pressão da câmara é maior que a pressão do vapor do gelo na amostra, por outro lado, uma pressão na câmara excessivamente baixa leva a uma baixa temperatura na amostra, diminuindo a velocidade de desidratação. É recomendado que a pressão da câmara seja ajustada para um quarto ou para metade da pressão de vapor do gelo na amostra (NAIL *et al*, 2002). Hara *et al* (2014) compararam ao liofilizar sêmen bovino, as temperaturas de 0, -15°C e -30°C para realização do processo de desidratação durante 6 horas. A pressão foi definida como um terço da pressão de vapor do gelo da amostra, em cada temperatura: 1,98, 0,57 e 0,12 hPA, para as temperaturas de 0, -15°C e -30°C , respectivamente. As amostras foram inicialmente congeladas por 30 minutos até atingirem a temperatura inicial de -25°C . Os melhores resultados foram conseguidos com as amostras -30°C , tanto para quantidade residual água como para desenvolvimento de blastocistos. A temperatura externa do ambiente também influencia na temperatura conseguida pela câmara na hora da desidratação. Os pesquisadores mostraram que seria possível manter as amostras -40°C , se a temperatura ambiente fosse mantida 4°C , porém um ciclo de apenas 6 horas não foi suficiente para liofilizar as amostras com sucesso.

Uma pressão constante de 0.05 mbar durante todo processo de liofilização também pode ter levado a danos no DNA espermático em nosso estudo. Kawase *et al*, (2007) recomendam uma pressão primária de 0.37 mbar ao invés de 1.03 ou 0.04 mbar para liofilização de espermatozoides de camundongos. Eles sugeriram esse valor baseado na observação da integridade do DNA espermático e no desenvolvimento embrionário *in vivo* e *in vitro*. Kusakabe *et al* (2008) utilizaram a pressão de 22 a 42 x 10⁻³ mbar durante 4 horas para liofilizar amostras de sêmen humano. Gianaroli *et al*, (2012) utilizaram uma pressão similar (22 x 10⁻³ mbar), *overnight*, para liofilizar sêmen humano.

Devido à limitação do equipamento utilizado em nosso estudo, não foi possível controlar a temperatura durante o processo e nem variar a pressão durante a desidratação. Hochi *et al* (2008) demonstraram que uma pressão inicial de 0.37 hPa por 14 horas e uma pressão secundária de 0,001 hPa por 3 horas leva a uma desidratação eficiente da amostra de espermatozoides de ratos.

O tempo de liofilização das nossas amostras foi de 24 horas. Esse tempo pode ter levado a uma desidratação excessiva da amostra, levando a danos no DNA espermático. Kwon *et al* (2004) observaram que o prolongamento do processo de liofilização, 4 a 24 horas, de espermatozoides de suínos reduzia gradualmente a capacidade dos espermatozoides em participar do desenvolvimento embrionário. Porém, Gianaroli *et al* (2012) liofilizou sêmen humano *overnight* e obteve resultados satisfatórios de fragmentação de DNA: 80,6% de DNA intacto.

A temperatura de armazenamento das amostras liofilizadas em nosso estudo foi entre 4° a 8° C. Wakayama & Yanagimachi (1998) demonstraram que amostras de espermatozoides de camundongos liofilizadas e mantidas em refrigerador eram capazes de gerar prole saudável após a realização de ICSI. Conforme observado por Kaneko &

Nakagata (2005), temperaturas de 4 ° C são capazes de manter a estrutura do DNA espermático murino sem fragmentação. Os pesquisadores observaram que após um mês de armazenamento das amostras liofilizadas, em temperaturas acima de 24 graus, a integridade do DNA não era mantida. Eles ainda demonstraram que após cinco meses armazenando as amostras liofilizadas a -70 °, -20 ° ou 4° C e realizando-se ICSI, foi possível nascimento de camundongos normais. Gianaroli *et al*, (2012) estocaram as amostras de sêmen humano, após liofilização, a 4° C e não observaram comprometimento no DNA espermático. Os danos ao DNA espermático em nosso estudo podem ter sido causados também pelo transporte das amostras da UFMG até a clínica Origen, no qual as amostras podem ter sofrido variações de temperaturas antes de serem armazenadas a 4° C. Já foi demonstrado que temperaturas acima de 4° C podem prejudicar a estrutura do DNA. Além disso, a temperatura ambiente não é eficiente em manter a estabilidade cromossômica por longos períodos (HOCHI *et al*, 2008). Kawase *et al* (2005) sugere ainda que, apesar do nascimento de prole de camundongos, ratos e coelhos oriunda de espermatozoides liofilizados armazenados em refrigerador, as amostras estocadas por mais tempo deveriam ser armazenadas a temperaturas mais baixas. Como o tempo de estocagem em nosso estudo não foi superior a seis meses, não achamos necessário estocar as amostras liofilizadas em freezer.

O presente estudo foi o primeiro a verificar a estrutura do espermatozoide humano após liofilização utilizando microscopia eletrônica de transmissão, ao realizá-la em meios com crioprotetores. Utilizando-se esses meios para liofilização foram observados maiores danos às estruturas. As membranas interna e externa do acrossoma estavam rompidas, cromatina estava dispersa e não compactada no núcleo, o axonema desorganizado. As membranas plasmáticas encontravam-se ausentes ou rompidas, peça

principal do flagelo degenerada, assim como as mitocôndrias na peça média. Nos espermatozoides liofilizados no meio de cultivo mHTF, os danos foram menos extensos.

Liu *et al* (2004) estudaram o comportamento de sêmens de coelhos liofilizados, em meio tamponado com EGTA, NaCl e Tris-HCl, utilizando a microscopia eletrônica de varredura. Eles observaram que muitos espermatozoides tinham caudas quebradas ou estas estavam ausentes. A membrana plasmática estava rompida expondo o axonema na região da cauda e peça média. As lesões na membrana plasmática também ficaram evidenciadas em nosso estudo utilizando-se microscopia eletrônica de transmissão. Wakayama & Yanagimachi (1998) observaram em sêmen de camundongos liofilizados em meios de cultivo CZB e DMEM, através da microscopia eletrônica de varredura, alterações na cabeça do espermatozoide: ausência do segmento principal do acrossoma, membrana plasmática, membranas interna e externa do acrossoma rompidas ou mesmo ausentes. O núcleo manteve-se intacto e prole viva foi obtida realizando-se ICSI com espermatozoides reidratados.

Martins *et al* (2007) utilizaram três soluções diferentes para liofilizar sêmen de bovinos. A primeira solução era composta de meio de cultivo TCM199 suplementado com 10% soro fetal bovino, a segunda solução mesmo meio de cultivo suplementado com 10% soro fetal bovino acrescido de 0,2 M de trealose, a terceira solução era à base de EGTA. Eles observaram os danos às estruturas espermáticas utilizando a microscopia eletrônica de transmissão. A membrana plasmática dos espermatozoides foi lesada no processo de liofilização independente do meio utilizado. As estruturas de acrossoma e mitocôndrias permaneceram intactas nos três meios utilizados. Já a estrutura de microtúbulos só permaneceu intacta quando se utilizou meio de cultivo TCM 199

acrescido de 10% de soro fetal bovino, nas demais soluções a estrutura estava comprometida.

Diferentemente do obtido no estudo de Martins *et al* (2007) no presente estudo a membrana plasmática foi menos lesada quando espermatozoides foram liofilizados em meio de cultivo mHTF. A estrutura do núcleo se manteve intacta na maioria dos espermatozoides, com a cromatina homogênea e compacta. A estrutura da peça principal do flagelo foi preservada, porém foram observados alguns axonemas com organização anômala. Em nosso estudo as mitocôndrias na peça média, diferentemente do obtido por Martins *et al* (2007), estavam com sua estrutura comprometida.

A membrana plasmática é muito suscetível a danos ocasionados pela perda de água durante o processo de liofilização. A perda de água dos fosfolípides nas membranas celulares leva a uma separação lateral de fases, o que causa o extravasamento do conteúdo intracelular (MARTINS *et al*, 2007). Durante o congelamento da amostra ocorre o inchaço e encolhimento das estruturas celulares causados pelo fluxo de água e mudanças de osmolaridade. Essas mudanças podem ser prejudiciais às organelas, membrana plasmática, estrutura lipídica, canais de proteínas e água na membrana. Com a limitação do equipamento de liofilização, em nosso estudo, esses danos podem ter sido amplificados. Hara *et al* (2014) também observaram, por microscopia eletrônica de transmissão, lesões na membrana plasmática ao liofilizarem espermatozoides de bovinos.

Após liofilização do sêmen humano, em meio de cultivo mHTF, observamos um menor nível de comprometimento da ultraestrutura espermática baseado na análise morfológica por microscopia eletrônica de transmissão. As amostras liofilizadas com crioprotetores tiveram danos extensos a sua estrutura. Apesar disso todas as amostras

tiveram seu DNA fragmentado, indicando que os meios não foram capazes de proteger o núcleo de forma apropriada durante o processo.

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 (MARTINS *et al*, 2007). Unger *et al* (2009) observaram ainda, que em produtos liofilizados derivados do soro, havia uma inativação de vírus envelopados e não envelopados. Mais estudos são necessários para que haja a implementação da liofilização como técnica rotineira nas clínicas de reprodução assistida. Parâmetros como temperatura, pressão, tempo e meio de liofilização devem ser otimizados para que se consiga amostras liofilizadas com DNA íntegro. Após definição dos melhores parâmetros, testes de viabilidade cromossômica devem ser realizados. Além dos testes de fragmentação do DNA, é necessário injetar os espermatozoides reidratados em oócitos para observação do desenvolvimento embrionário, primeiramente em modelos animais. Posteriormente aos testes realizados em modelos animais, num futuro, embriões humanos poderão ser criados injetando-se espermatozoides liofilizados reidratados em oócitos. Esses embriões podem ser transferidos para útero e gerar uma prole saudável.

CONCLUSÃO

A análise da ultraestrutura espermática, após liofilização de sêmen humano, evidenciou alterações nas estruturas de cabeça, peça média e flagelo, ocasionadas pela técnica, variando de acordo com meio utilizado.

ANEXOS

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 SI 2005
Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901
UF: MG Município: BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4592 E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 743.984

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 espermatozóides

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 SI 2005
 Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901
 UF: MG Município: BELO HORIZONTE
 Telefone: (31)3409-4592 E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



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.

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

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 743.984

BELO HORIZONTE, 08 de Agosto de 2014

Assinado por:
Telma Campos Medeiros Lorentz
(Coordenador)

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

DATA: ____/____/____

BELO HORIZONTE – MG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA MULHER

UFMG

ATA DA DEFESA DE TESE DA ALUNA RENATA DE LIMA BOSSI

Realizou-se, no dia 19 de agosto de 2016, às 14:00 horas, Sala 062, andar térreo da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de tese, intitulada **ANÁLISE DA ULTRAESTRUTURA DO ESPERMATOZOIDE HUMANO APÓS LIOFILIZAÇÃO**, apresentada por **RENATA DE LIMA BOSSI**, número de registro 2012650460, graduada no curso de CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em SAÚDE DA MULHER, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Selmo Geber - Orientador (UFMG), Prof(a). Rubens Lene Carvalho Tavares (UFMG), Prof(a). Ana Luiza Lunardi Rocha Baroni (UFMG), Prof(a). Paulo Franco Taitson (PUC-MG), Prof(a). Kinulpe Honorato-Sampaio (UFVJM).

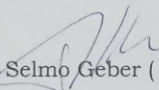
Finalizados os trabalhos, a ata foi lida lavrada e aprovada e vai assinada pelos membros da comissão.

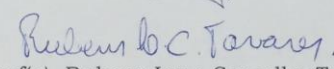
Belo Horizonte, 19 de agosto de 2016.


A Comissão considerou a tese:

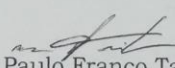
Aprovada

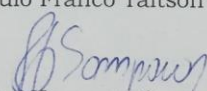
Reprovada


Prof(a). Selmo Geber (Doutor)


Prof(a). Rubens Lene Carvalho Tavares (Doutor)


Prof(a). Ana Luiza Lunardi Rocha Baroni (Doutora)


Prof(a). Paulo Franco Taitson (Doutor)


Prof(a). Kinulpe Honorato-Sampaio (Doutor)

VIA DO ALUNO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA MULHER

UFMG

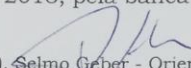
FOLHA DE APROVAÇÃO

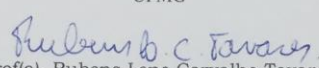
ANÁLISE DA ULTRAESTRUTURA DO ESPERMATOZOIDE HUMANO APÓS LIOFILIZAÇÃO.

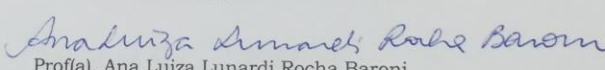
RENATA DE LIMA BOSSI

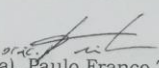
Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em SAÚDE DA MULHER, como requisito para obtenção do grau de Doutor em SAÚDE DA MULHER, área de concentração PATOLOGIA GINECOLÓGICA E REPRODUÇÃO.

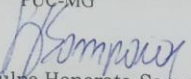
Aprovada em 19 de agosto de 2016, pela banca constituída pelos membros:


Prof(a). Selmo Geber - Orientador
UFMG


Prof(a). Rubens Lene Carvalho Tavares
UFMG


Prof(a). Ana Luiza Lunardi Rocha Baroni
UFMG


Prof(a). Paulo Franco Taitson
PUC-MG


Prof(a). Kinulpe Honorato-Sampaio
UFVJM

Belo Horizonte, 19 de agosto de 2016.

REFERÊNCIAS

- ABDELHAFEZ F. *et al.* Techniques for cryopreservation of individual or small numbers of human spermatozoa: a systematic review. **Hum Reprod Update**. v.15, n.1, p. 153-64, 2009
- ALBERTS, B. *et al.* **Molecular Biology of the Cell**. 5^a ed , New York , Garland Science: 2008.
- ALCAY S. *et al.* Successful ram semen cryopreservation with lyophilized egg yolk-based extender. **Cryobiology**. v. 71, n.2, p. 329-33, 2015.
- ANGER J.T., GILBERT B.R, GOLDSTEIN M. Cryopreservation of sperm: indications, methods and results. **J Urol**. v.170, n. 1, p. 1079-84, 2003.
- BEHRMAN S.J, SAWADA Y. Heterologous and homologous inseminations with human semen frozen and stored in a liquid-nitrogen refrigerator. **Fertil Steril**. v.17, n.4, p.457-66, 1966.
- BIELANSKI A. *et al.* Microbial contamination of embryos and semen during long term banking in liquid nitrogen. **Cryobiology**. v.46, n. 2, p.146-52, 2003.
- BOZZOLA, J.J. & RUSSELL, L.D. **Electron Microscopy: Principles and Techniques for Biologists**. 2^a ed, Burlington, Jones & Bartlett Learning: 1999.
- BRANCO C.S. *et al.* Resveratrol and ascorbic acid prevent DNA damage induced by cryopreservation in human semen. **Cryobiology**. v. 60, n.2, p.235-7, 2010.
- BUNGE R.G., KEETTEL W.C., SHERMAN J.K. Clinical use of frozen semen: report of four cases. **Fertil Steril**. v.5, n.6, p.520-9,1954.
- CHOHAN K.R. *et al.* Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. **J Androl**. v.27, n.1, p.53-9, 2006.
- CHOI Y.H. *et al.* Production of live foals via intracytoplasmic injection of lyophilized sperm and sperm extract in the horse. **Reproduction**. v.142, p. 529–538, 2011.
- CLARKE G.N. Sperm cryopreservation: is there a significant risk of cross-contamination? **Hum Reprod**. v.14, n. 12, p.2941-3, 1999.
- COHEN J. *et al.* Cryopreservation of single human spermatozoa. **Hum Reprod** v.12, p.994– 1001,1997.
- DURU N.K. *et al.* Cryopreservation-Thawing of fractionated human spermatozoa is associated with membrane phosphatidylserine externalization and not DNA fragmentation. **J Androl**. v. 22, n. 4, p. 646-51, 2001.
- EDGAR D.H., GOOK D.A. A critical appraisal of cryopreservation (slow cooling versus vitrification) of human oocytes and embryos. **Hum Reprod Update**. v. 18, n.5, p. 536-54, 2012.
- EVENSON D, DARZYNKIEWICZ Z. Acridine orange-induced precipitation of mouse testicular sperm cell DNA reveals new patterns of chromatin structure. **Exp Cell Res**. v.187, n.2, p.328-34, 1990.
- EVENSON D, WIXON R. Meta-analysis of sperm DNA fragmentation using the sperm chromatin structure assay. **Reprod Biomed Online**. v.12, n. 4, p.466-72, 2006.

- EVENSON D.P., WIXON R. Comparison of the Halosperm test kit with the sperm chromatin structure assay (SCSA) infertility test in relation to patient diagnosis and prognosis. **Fertil Steril**. v.84, n.4, p.846-9, 2005.
- FABBRI, R., P. CIOTTI AND B. DI TOMMASO. Tecniche di crioconservazione riproduttiva. **Rivista Italiana di Ostetricia e Ginecologia**. v.3, p. 33–41, 2004.
- FRANKEN D.R, OEHNINGER S. Semen analysis and sperm function testing. **Asian J Androl**. v.14, n.1, p.6-13, 2012.
- GARCIA A. *et al.* Effect of different disaccharides on the integrity and fertilising ability of freeze-dried boar spermatozoa: a preliminary study. **Cryo Letters**. v.35, n.4, p.277-85, 2014.
- GIANAROLI L. *et al.* DNA integrity is maintained after freeze-drying of human spermatozoa. **Fertil Steril**. v.97, n.5, p.1067-1073, 2012.
- GORCZYCA W. *et al.* Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. **Exp Cell Res**. v. 207, n.1, p.202-5, 1993.
- GOSÁLVEZ J. *et al.* Dynamics of sperm DNA damage in fresh versus frozen-thawed and gradient processed ejaculates in human donors. **Andrologia**. v. 43, n.6, p. 373-7, 2011.
- GOTO K. *et al.* Fertilisation of bovine oocytes by the injection of immobilised, killed spermatozoa. **Vet Rec**. v. 24, n. 127, p. 517-20, 1990.
- GRIFFITHS, G. **The use of electron microscopy in cell biology**. Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine, p.1-68, 2006.
- HALLAK J. *et al.* Cryopreservation of human spermatozoa: comparison of TEST-yolk buffer and glycerol. **Int J Fertil Womens Med**. v.45, n.1, p.38-42, 2000.
- HARA H. *et al.* Adverse effect of cake collapse on the functional integrity of freeze-dried bull spermatozoa. **Cryobiology**. v. 68, n.3, p.354-60, 2014.
- HAWKINS A.E. Hepatitis B nucleotide sequence analysis: linking an outbreak of acute hepatitis B to contamination of a cryopreservation tank. **J Virol Methods**. v.60, n.1, p.81-8, 1996.
- HIRABAYASHI M. *et al.* Viable rat offspring derived from oocytes intracytoplasmically injected with freeze-dried sperm heads. **Zygote**. v.13, n. 1, p.79-85, 2005.
- HOCHI S. *et al.* Challenging endeavour for preservation of freeze-dried mammalian spermatozoa. **J Reprod Dev**. v.57, n.5, p.557-63, 2011.
- HOCHI S. *et al.* Live rats resulting from injection of oocytes with spermatozoa freeze-dried and stored for one year. **Mol Reprod Dev**. v.75, n.5, p.890-4, 2008.
- HOSHI K. *et al.* Pronuclear formation and cleavage of mammalian eggs after microsurgical injection of freeze-dried sperm nuclei. **Zygote**. v.2, n.3, p. 237-42, 1994.

HUGHES C. M. *et al.* A comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile and infertile men, using a modified comet assay. **Mol Hum Reprod.** v.2, n.8, p.613-9, 1996.

ISACHENKO E. *et al.* Vitrification of mammalian spermatozoa in the absence of cryoprotectants: from past practical difficulties to present success. **Reprod Biomed Online.** v.6, n. 2, p.191-200, 2003.

ISACHENKO V. *et al.* Vitrification of human ICSI/IVF spermatozoa without cryoprotectants: new capillary technology. E. **J Androl.** v. 33, n.3, p.462-8, 2012.

JEYENDRAN R.S., HUNTER A.G, GRAHAM E.F. Alteration of seminal proteins during freeze-drying of bovine semen. **J DairySci.** v.66, n.4, p.887-91, 1983.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular.** São Paulo, Guanabara Koogan , 2^a ed. 2000.

KANEKO T. *et al.* Sperm preservation by freeze-drying for the conservation of wild animals. **PLoS One.** v.9, n.11, 2014.

KANEKO T., NAKAGATA N. Improvement in the long-term stability of freeze-dried mouse spermatozoa by adding of a chelating agent. **Cryobiology.** v.53, n.2, p.279-82, 2006.

KANEKO T., NAKAGATA N. Relation between storage temperature and fertilizing ability of freeze-dried mouse spermatozoa. **Comp Med.** v.55, n.2, p.140-4, 2005.

KANEKO T., SERIKAWA T (a). Long-term preservation of freeze-dried mouse spermatozoa. **Cryobiology.** v.64, n. 3, p.211-4, 2012.

KANEKO T., SERIKAWA T (b). Successful long-term preservation of rat sperm by freeze-drying. **PLoS One.** v. 7, n.4, e35043, 2012.

KANEKO T., WHITTINGHAM D.G, YANAGIMACHI R. Effect of pH value of freeze-drying solution on the chromosome integrity and developmental ability of mouse spermatozoa. **Biol Reprod.** v. 68, n.1, p.136-9, 2003.

KANEKO T. *et al.* Tolerance of the mouse sperm nuclei to freeze-drying depends on their disulfide status. **Biol Reprod.** v.69, n.6, p.1859-62, 2003.

KATAYOSE H., MATSUDA J., YANAGIMACHI R. The ability of dehydrated hamster and human sperm nuclei to develop into pronuclei. **Biol Reprod.** v.47, n.2, p.277-84, 1992.

KAWASE Y. *et al.* Effect of pressure at primary drying of freeze-drying mouse sperm reproduction ability and preservation potential. **Reproduction.** v.133, n.4, p.841-6, 2007.

KAWASE Y. SUZUKI H.A study on freeze-drying as a method of preserving mouse sperm. **J Reprod Dev.** v.57, n.2, p.176-82, 2011.

KAWASE Y. *et al.* Possibility of long-term preservation of freeze-dried mouse spermatozoa. **Biol Reprod.** v.72, n.3, p.568-73, 2005.

- KUSAKABE H. *et al.* Maintenance of genetic integrity in frozen and freeze-dried mouse spermatozoa. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 98, n. 24, p. 13501–13506, 2001.
- KUSAKABE H. KAMIGUCHI Y. Ability to activate oocytes and chromosome integrity of mouse spermatozoa preserved in EGTA Tris-HCl buffered solution supplemented with antioxidants. **Theriogenology.** v. 62, n.5, p.897-905, 2004.
- KUSAKABE H. YANAGIMACHI R, KAMIGUCHI Y. Mouse and human spermatozoa can be freeze-dried without damaging their chromosomes. **Hum Reprod.** v. 23, n.2, p.233-9, 2008.
- KUWAYAMA M. *et al.* Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. **Reprod Biomed Online.** v.11, p.300–308, 2005.
- KWON I.K, PARK K.E, NIWA K. Activation, pronuclear formation, and development in vitro of pig oocytes following intracytoplasmic injection of freeze-dried spermatozoa. **Biol Reprod.** v.71, n. 5, p.1430-6, 2004.
- LI M.W. *et al.* Assessment of three generations of mice derived by ICSI using freeze-dried sperm. **Zygote.** v. 17, n.3, p.239-51, 2009.
- LI Z. *et al.* Protective effects of ascorbate and catalase on human spermatozoa during cryopreservation. **J Androl.** v. 31, n.5, p.437-44, 2010.
- LIU J.L. *et al.* Freeze-dried sperm fertilization leads to full-term development in rabbits. **Biol Reprod.** v. 70, n.6, p.1776-81, 2004.
- LIU Q.C. *et al.* Mammalian freeze-dried sperm can maintain their calcium oscillation-inducing ability when microinjected into mouse eggs. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 328, n.4, p.824-30, 2005.
- MARTINS C.F. *et al.* Effects of freeze-drying on cytology, ultrastructure, DNA fragmentation, and fertilizing ability of bovine sperm. **Theriogenology.** v.67, p.1307–15, 2007.
- MCGINNIS L.K. *et al.* Mouse sperm desiccated and stored in trehalose medium without freezing. **Biol Reprod.** v. 73, n. 4, p.627-33, 2005.
- MEN N.T. *et al.* Effect of trehalose on DNA integrity of freeze-dried boar sperm, fertilization, and embryo development after intracytoplasmic sperm injection. **Theriogenology.** v.80, n.9, p.1033-44, 2013.
- MORRIS G.J. The origin, ultrastructure, and microbiology of the sediment accumulating in liquid nitrogen storage vessels. **Cryobiology.** v. 50, n.3, p. 231-8, 2005.
- MUNETO T., HORIUCHI T. Full-term development of hamster embryos produced by injecting freeze-dried spermatozoa into oocytes. **J. Mamm. Ova. Res.** v.28, p.32–39. 2011.
- NAIL S.L. *et al.* Fundamentals of freeze-drying. **Pharm Biotechnol.** v.14, p.281-360, 2002.

NAKAI M. *et al.* Effects of chelating agents during freeze-drying of boar spermatozoa on DNA fragmentation and on developmental ability in vitro and in vivo after intracytoplasmic sperm head injection. **Zygote**. v. 15, n.1, p.15-24, 2007.

NAWROTH F. *et al.* Vitrification of human spermatozoa without cryoprotectants. **Cryo Letters**. v.23, n.2, p.93-102, 2002.

OEHNINGER S. *et al.* Assessment of sperm cryodamage and strategies to improve outcome. **Mol Cell Endocrinol**. v. 169, n. 1-2, p.3-10, 2000.

OLACIREGUI M. *et al.* Freeze-dried dog sperm: Dynamics of DNA integrity. **Cryobiology**. v.71, n.2, p.286-90, 2015.

PAASCH U. *et al.* Cryopreservation and thawing is associated with varying extent of activation of apoptotic machinery in subsets of ejaculated human spermatozoa. **Biol Reprod**. v.71, n.6, p.1828-37, 2004.

PAOLI D. *et al.* Sperm cryopreservation: effects on chromatin structure. **AdvExp Med Biol**. v.791, p.137-50, 2014.

PAPATHEODOROU A. *et al.* Open versus closed oocyte vitrification system: a prospective randomized sibling-oocyte study. **Reprod Biomed Online**. v.26, n.6, p.595-602, 2013.

PARMEGIANI L. *et al.* A reliable procedure for decontamination before thawing of human specimens cryostored in liquid nitrogen: three washes with sterile liquid nitrogen (SLN2). **Fertil Steril**. v.98, n.4, p.870-5, 2012.

PARMEGIANI L. *et al.* Sterilization of liquid nitrogen with ultraviolet irradiation for safe vitrification of human oocytes or embryos. **Fertil Steril**. v. 94, n.4, p.1525-8, 2010.

PEGG D.E. The history and principles of cryopreservation. **Semin Reprod Med**. v.20, n.1, p.5-13, 2002.

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

SAKKAS D., ALVAREZ J.G. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome and analysis. **Fertil Steril**. v.93, n.4, p.1027-36, 2010.

SHERMAN J.K. Freezing and freeze-drying of human spermatozoa. **Fertil Steril**. v. 5, n.4, p.357-71, 1954.

SHERMAN J.K. Improved methods of preservation of human spermatozoa by freezing and freeze-drying. **Fertil Steril**. v.14, p.49-64, 1963.

SHERMAN, J. K. Cryopreservation of human semen. **CRC Handbook of the Laboratory Diagnosis and Treatment of Infertility**. CRC Press, Boca Raton, p. 229-259, 1990.

SOUSA, A. P. M. *et al.* Dual use of Diff-Quik-like stains for the simultaneous evaluation of human sperm morphology and chromatin status. **Human Reproduction**, v. 24, n. 1, p. 28-36, 2009.

TANDARA M. *et al.* Sperm DNA integrity testing: big halo is a good predictor of embryo quality and pregnancy after conventional IVF. **Andrology**. v.2, n.5, p.678-86, 2014.

TAYLOR K. *et al.* Effect of antioxidant supplementation of cryopreservation medium on post-thaw integrity of human spermatozoa. **Reprod Biomed Online**. v.18, n.2, p.184-9, 2009.

TEKCAN M. *et al.* A new cryomedia without animal components for fertility preservation in men: motility and various attributes affecting paternal contribution of sperm. **ASRM** 2011, P-337. 2.

THOMSON L.K. *et al.* Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. **Hum Reprod**. v.24, n.9, p.2061-70, 2009.

THOMSON, L. K. *et al.* The effect of repeated freezing and thawing on human sperm DNA fragmentation. **Fertil Steril**, v. 8, p. 8, Jan. 2009.

UEHARA T., YANAGIMACHI R. Microsurgical injection of spermatozoa into hamster eggs with subsequent transformation of sperm nuclei into male pronuclei. **Biol Reprod**. v.15, n.4, p.467-70, 1976.

UNGER U. *et al.* Virus inactivation during the freeze-drying processes as used for the manufacture of plasma-derived medicinal products. **Transfusion**. v.49, n.9, p.1924-30, 2009.

VAJTA G., NAGY Z.P. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. **Reprod Biomed Online**. v.12, n.6, p.779-96, 2006.

VUTYAVANICH, T.; PIROMLERTAMORN, W.; NUNTA, S. Rapid freezing versus slow programmable freezing of human spermatozoa. **Fertil Steril**, v. 23, p. 23, 2009.

WALTERS, E. M. *et al.* The history of sperm cryopreservation. **Sperm banking: theory and practice**. Cambridge University Press, Cambridge, UK, p. 1-17, 2009.

WAKAYAMA T., YANAGIMACHI R. Development of normal mice from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. **Nat Biotechnol**. v.16, n. 7, p.639-41, 1998.

WANG X. *et al.* Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility. **Fertil Steril**. v.80, n.3, p.531-5, 2003.

WARD M.A. *et al.* Long-term preservation of mouse spermatozoa after freeze-drying and freezing without cryoprotection. **Biol Reprod**. v.69, n.6, p.2100-8, 2003.

ZHANG L.H. *et al.* Measurement of sperm DNA fragmentation using bright-field microscopy: comparison between sperm chromatin dispersion test and terminal uridine nick-end labeling assay. **Fertil Steril**. v.94, n.3, p.1027-32, 2010.

ZRIBI N. *et al.* Effects of cryopreservation on human sperm deoxyribonucleic acid integrity. **Fertil Steril**. v.97, n.5, p.1067-1073, 2012.