

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Faculdade de Medicina

Marcelo Araújo Cabral

**AVALIAÇÃO ULTRAESTRUTURAL E FUNCIONAL
DO ESPERMATOZOIDE HUMANO SUBMETIDO
AO PROCESSO DE LIOFILIZAÇÃO.**

Belo Horizonte

2017

MARCELO ARAÚJO CABRAL

**AVALIAÇÃO ULTRAESTRUTURAL E FUNCIONAL
DO ESPERMATOZOIDE HUMANO SUBMETIDO
AO PROCESSO DE 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
Doutor.

Área de concentração:
Reprodução Humana e Patologia
Ginecológica.

Orientador: Dr.Selmo Geber

Belo Horizonte
Faculdade de Medicina – UFMG
2017

Agradecimentos

Ao meu orientador Professor Titular de Ginecologia Selmo Geber, pelo apoio e por abrir os caminhos do conhecimento da Reprodução Humana;

Aos professores do Departamento de Ginecologia e Obstetria da UFMG, em especial Henrique Vitor Leite, Alamanda Kfoury Pereira, Zilma Reis Nogueira e saudoso Andre Luiz Barbosa Roquette pela Iniciação Científica que me deu fundamentos na ciência que sempre me acompanharão;

Ao Doutor Marcos Sampaio pelos ensinamentos cotidianos na Clínica Origem;

Aos mestres do curso de Biomedicina da Universidade FUMEC que me fizeram despertar para o interesse acadêmico, em especial, Professora Doutora Maria Leticia Firpe Pena;

Aos amigos e colegas de estudo de toda vida acadêmica, com os quais o aprendizado se tornou mais fácil;

Aos Professores e colegas da faculdade de farmácia da UFMG em especial Dra. Mônica Oliveira e Dra. Sália Caldeira pela participação construtiva em todo trabalho;

Aos funcionários do Centro de Microscopia da UFMG, Janine, Kinulpe, Altair, Ney e Breno;

Aos parceiros do Laboratório de Reprodução Humana da Clínica Origem, pelo companheirismo e auxílio sempre; Maristela, Patrícia e Renata

Ao meu irmão Guilherme pela assessoria prestada na confecção do trabalho;

“Eu quase que nada sei. Mas desconfio de muita coisa.”
Guimarães Rosa

RESUMO

Introdução – Nos últimos anos a conservação de sêmen tornou-se caro e difícil. Os bancos de espermatozoides são fundamentais para promover em situações especiais a possibilidade de reprodução de casais com dificuldade reprodutiva. O custo é determinado pela necessidade do uso do nitrogênio líquido, área física e permanente vigilância do processo por pessoal especializado. A alternativa que se procura a esta situação é uma maneira mais prática e de baixo custo. A liofilização é processo que se baseia na retirada de líquido de qualquer estrutura biológica ou não. É muito utilizada na indústria de medicamentos e alimentícia. A possibilidade de conservação de espermatozoide humano após liofilização é uma das formas que se pretende com objetivo de redução de custos no armazenamento desta célula reprodutiva.

Objetivo – Analisar o impacto da liofilização na estrutura morfológica e funcional (integridade de DNA) de espermatozoide humano submetido a criopreservação e posterior liofilização.

Material e Métodos – Para realizar a pesquisa foram utilizados 26 amostras de sêmen fornecidas por homens voluntários e saudáveis. As amostras foram avaliadas por espermograma que revelaram parâmetros normais (OMS). As amostras foram submetidas a criopreservação e posterior liofilização em diferentes meios de cultivo (*FreezingMedium*, *SpermFreezeSolution*, mHTF, Gamete e solução EDTA). Após o processo reavaliou-se os espermatozoides liofilizados e reidratados através da microscopia eletrônica de varredura (avaliação morfológica) e através de testes funcionais de integridade do DNA (Halosperm e teste da eosina Negrosina).

Resultados – Todas as amostras analisadas, independente do meio de cultivo utilizado, mostraram lesões morfológicas em sua ultraestrutura (cabeça, membrana celular, cauda). Os testes funcionais revelaram importantes lesões de DNA das células germinativas analisadas. Todos os espermatozoides ficaram inertes e com diagnóstico funcional de morte celular.

Discussão – O estudo revelou que as técnicas utilizadas para criopreservação e liofilização utilizadas são geradoras de perda das características ultra estruturais e funcionais dos espermatozoides analisados. Algumas variações técnicas de liofilização deverão ser testadas para se tentar obter resultados mais favoráveis que os alcançados no presente estudo.

Conclusões – Os espermatozoides humanos após serem submetidos a liofilização apresentaram alterações ultra estruturais evidentes, assim como comprometimento da sua capacidade funcional de manter íntegro o DNA nuclear. As alterações ultra estruturais e funcionais observadas apresentaram pequenas variações conforme o meio de cultivo nos quais foram submetidos a liofilização, indicando a necessidade de novos estudos relacionados a técnicas diferentes daquelas que estudamos, na esperança de encontrar-se melhor maneira de proteção para os espermatozoides durante o processo de liofilização.

Palavras Chave – Espermatozoide Humano, Liofilização.

ABSTRACT

Introduction - In recent years the conservation of semen has become expensive and difficult. Sperm banks are fundamental to promote in special situations the possibility of reproduction of couples with reproductive difficulties. The cost is determined by the need for the use of liquid nitrogen, physical area and permanent surveillance of the process by specialized personnel. The alternative that is sought in this situation is a more practical and low cost. Freeze Dried is a process which is based on the withdrawal of liquid from any biological or not structure. It is widely used in the drug and food industry. The possibility of preservation of human sperm after Freeze Dried is one of the ways that aims to reduce costs in the storage of this reproductive cell.

Purpose - To analyse the impact of Freeze Dried on the morphological and functional structure (DNA integrity) of human spermatozoa subjected to cryopreservation and subsequent FreezeDried.

Material and Methods - 26 samples of semen supplied by healthy volunteers were used to perform the research. Samples were evaluated by spermogram that revealed normal parameters (WHO). The samples were submitted to cryopreservation and subsequent Freeze Dried in different culture media (FreezingMedium, SpermFreezeSolution, mHTF, Gamete and EDTA solution). After lyophilized and rehydrated spermatozoa were analyzed through scanning electron microscopy (morphological evaluation) and through functional DNA integrity tests (Halosperm and Negrosin eosin test).

Results - All the samples analysed, regardless of the culture medium used, showed morphological lesions in their ultrastructure (head, cell membrane, tail). Functional tests revealed significant DNA lesions of the germ cells analyzed. All spermatozoa were inert and with a functional diagnosis of cell death.

Discussion - The study revealed that the techniques used for cryopreservation and Freeze Dried used is generating loss of the ultra-structural and functional characteristics of the analyzed spermatozoa. Some technical variations of Freeze Dried should be tested to try to obtain more favorable results than those reached in the present study.

Conclusions - Human spermatozoa after being submitted to Freeze Dried showed evident ultra - structural alterations, as well as impairment of their functional capacity to maintain intact nuclear DNA. The observed ultrastructural and functional alterations showed small variations according to the culture medium in which they were subjected to Freeze Dried, indicating the need for new studies related to techniques different from those studied, in the hope of finding a better way of protection for the spermatozoa during the Freeze Dried process.

Key Words – Human Sperm, FreezeDried.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

COEP- Comitê de Ética em Pesquisa

EDTA- ácido etilenodiamino tetra-acético

EGTA- ácido tetra-acético etileno-glicol

ES- elétrons secundarios

ISCA- infertilidade sem causa aparente

FISH- hibridização fluorescente in situ

HSA- albumina sérica humana

ICSI- injeção intracitoplasmática de espermatozoide

IUI- inseminação intrauterina

MEV- microscopia eletrônica de varredura

mHTF- HumanTubalFluid modificado

OMS- Organização Mundial da Saúde

ROS- espécies reativas de oxigênio

SCD- teste de 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: Meios utilizados durante a liofilização dos espermatozoides.....	24
Figura 2: Liofilizador Thermo Fisher Scientific.....	25
Figura 3: Amostras durante o processo de desidratação	26
Figura 4: Amostras após liofilização nos diferentes meios.....	26
Figura 5: Microscópio Eletrônico de Varredura.....	29
Figura 6: Teste de vitalidade espermática, espermatozóides vivos.....	30
Figura 7: Teste de vitalidade espermática, espermatozóides mortos.....	30
Figura 8: Teste do Halosperm - fragmentação do DNA.....	32
Figura 9: Escala do Halosperm - diferentes graus de fragmentação espermática.....	32
Figura 10: Fluxograma do destino das amostras do estudo.....	33
Figura 11: Amostras de espermatozoides frescos	35
Figura 12: Amostras congeladas com diversos meios.....	36
Figura 13: Liófilo de espermatozoides antes da reidratação	37
Figura 14: Identificação da cauda de espermatozoides pela técnica de varredura.....	38
Figura 15: Identificação das cabeças dos espermatozoides pela técnica de varredura.....	39
Figura 16: Identificação das peças médias dos espermatozoides pela técnica de varredura.....	40
Figura 17: Identificação das estruturas dos espermatozoides pela técnica de varredura	41
Figura 18: Teste de vitalidade espermática com eosina-nigrosina após reidratação.....	42
Figura 19: Teste de fragmentação de DNA (Halosperm) Após reidratação da amostra, ausência de halo em todos os espermatozoides.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros de normalidade seminal segundo OMS.	21
Tabela 2: Número de alíquotas liofilizadas de acordo com meio/crioprotetor e volume final.....	33

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	11
1.1- Preservação das células germinativas.....	12
1.2- Estrutura do espermatozóide humano.....	13
1.3- Microscopia Eletrônica pela técnica de varredura	14
1.4- A técnica de liofilização	16
1.5- Fertilizações com espermatozóide liofilizado em reprodução animal	17
1.6- Liofilização do espermatozoide humano	22
OBJETIVO	25
MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1- Descrição do estudo	28
3.2- Amostra do estudo.....	28
3.3- Espermograma	29
3.4 - Congelamento das amostras	32
3.4.1 - Congelamento em meio crioprotetor.....	32
3.4.2 – Congelamento em meio de cultura.....	33
3.5- Liofilização	35
3.6- Meios de liofilização	35
3.7- Reidratação das amostras.....	37
3.8-Microscopia eletrônica (avaliação ultraestrutural).....	38
3.9- Teste de vitalidade Eosina-Nigrosina	40
3.10- Fragmentação do DNA espermático.....	41
RESULTADOS	44
4.1- Resultados morfológicos.....	46
4.1.1- Grupo controle fresco e congelado.....	46
4.1.2 – Grupo de estudo liofilizado.....	48
4.2 - Resultados genéticos e funcionais.....	54
DISCUSSÃO	55
CONCLUSÃO	64
ANEXOS.....	66
REFERÊNCIAS	72

INTRODUÇÃO

1.1 – Preservação de células germinativas

O primeiro relato sobre a conservação de uma célula germinativa foi no estudo de Luyet em 1938 (LUYET & HODAPP, 1938).

A técnica de criopreservação nos moldes que se conhece atualmente, no entanto, data da metade do século passado quando Polge & Smith (1949) utilizaram a temperatura sub zero com a finalidade de preservar o espermatozoide humano.

O primeiro banco de conservação de tecidos tem sua data de implantação em 1964 por Klen (KLEN,1982). O desenvolvimento da criomedicina, especialidade que utiliza a baixa temperatura como instrumento de conservação ou terapia do tecido humano teve rápido crescimento a partir dos estudos de Rowe e cols em 1962, no armazenamento de componentes do sangue para tratamento e transfusão (ROWE & RINFRET,1962).

Neste momento, a tecnologia de utilização do nitrogênio líquido proporcionando temperaturas extremamente baixas deu um elevado impulso nas técnicas de crio preservação de tecidos humanos, inclusive das células germinativas.

Desde os relatos iniciais de conservação de células humanas esteve presente a idéia de conseguir este objetivo com as técnicas da liofilização. A primeira descrição desta possibilidade, em células germinativas, foi feita por Sherman em 1954. As dificuldades no uso da liofilização na conservação de espermatozoide se impuseram pela observação da perda da motilidade das células liofilizadas, enquanto as técnicas que utilizavam o nitrogênio líquido não comprometiam esta característica, fundamental à época para as técnicas disponíveis de reprodução assistida (SHERMAN, 1973).

A criomedicina desenvolveu-se de maneira intensa a partir dos anos setenta quando se iniciaram os transplantes de órgãos e tecidos. Também contribuiu para este enorme desenvolvimento o uso da criocirurgia, relacionada com os mesmos conhecimentos desenvolvidos à ocasião (SUMIDA, 2006).

A partir dos anos 80, a utilização dos espermatozoides nas técnicas de fertilização in vitro fez tornar pouco importante o retorno da motilidade após o descongelamento, em particular após reidratação do sêmen masculino liofilizado. Este fato tornou-se mais evidente, principalmente, após o desenvolvimento da injeção intracitoplasmática do espermatozoide no citoplasma do ovulo (ICSI).

Imediatamente a reprodução assistida em animais de experimentação retornou o interesse da conservação dos espermatozoides na forma liofilizada para uso em reprodução assistida (LIU *et al*, 2004).

A necessidade de coletar e armazenar células germinativas femininas e masculinas tem aumentado nos últimos anos. No caso do gameta masculino indica-se o procedimento em situações específicas. Atualmente se reconhece como indicação médica o armazenamento de espermatozoides de homens com necessidade de submeter-se a quimioterapia e com risco de lesão em gônada, doença viral de risco gonadal, trauma físico sobre testículo. Outra situação não médica, também pode configurar indicação para o procedimento, tal como necessidade reprodutiva futura em idade desfavorável (GADDA *et al*, 2012).

1.2 - Estrutura do Espermatozoide Humano

O espermatozoide é proveniente do amadurecimento de células-tronco da linhagem germinativa que estão presentes na lâmina basal do testículo. Na espécie humana este processo leva cerca de 72 dias e como resultado, a célula assume um formato atípico e desenvolve habilidade de locomoção em ambiente favorável, fato que a torna naturalmente capaz de realizar a fecundação (HOLT & VAN LOOK, 2004).

O espermatozoide consiste de duas partes morfológicas e funcionalmente diferentes contidas em uma única membrana plasmática: a cabeça, que contém o núcleo altamente condensado e o acrossoma, e a cauda, que impulsiona o espermatozóide em direção ao ovócito e auxilia na sua passagem através do revestimento do gameta feminino. A cauda se subdivide em quatro segmentos: próximo à inserção com a cabeça é o colo, e em sequência temos a peça intermediária, a peça principal e porção terminal da cauda.

A cabeça do espermatozoide é formada por três componentes: a membrana plasmática, o acrossoma e o núcleo condensado.

A membrana plasmática contém receptores de espermatozoide, com afinidade de ligação pela zona pelúcida, e a fertilina α/β , um heterodímero da família de proteínas ADAMs, formadas por vários domínios incluindo um domínio metaloproteinase e um domínio desintegrina (FLESCH & GADELLA, 2000).

O acrossoma é formado por três partes: a membrana acrossômica externa, a membrana acrossômica interna e as enzimas hidrolíticas, principalmente a hialuronidase e a acrosina. O segmento equatorial é a porção delgada do acrossoma que se estende em direção à cauda.

O núcleo haplóide (23, x ou 23, y) condensado consiste em DNA genômico recoberto por protaminas básicas. Os nucleossomas não estão presentes porque as histonas

somáticas foram substituídas pelas protaminas. Seu DNA está extremamente condensado para minimizar o seu volume para o transporte e a transcrição está desativada.

A cauda móvel do espermatozoide é formada por um flagelo longo, cujo axonema central deriva de um corpo basal situado exatamente atrás do núcleo. O axonema consiste em dois microtúbulos centrais simples circundados por nove pares de microtúbulos dispostos simetricamente.

O flagelo do espermatozoide de mamíferos difere dos demais porque o padrão 9+2 microtúbulos está circundado por fibras densas externas, que são rígidas e não contráteis, acreditando-se que restrinjam a flexibilidade do flagelo, e protejam-no de forças de torção.

O dobramento ativo do flagelo é causado pelo deslizamento dos pares de microtúbulos adjacentes entre si, controlado por proteínas motoras chamadas dineínas, as quais utilizam a energia da hidrólise do ATP gerado pelas mitocôndrias da bainha mitocondrial da peça intermediária da cauda para o deslizamento dos microtúbulos (CANOVA, 2008).

1.3– Microscopia Eletrônica pela técnica de Varredura

A ideia inicial do microscópio eletrônico, foi desenvolvida por Knoll em 1935. Ele conseguiu a focalização do feixe eletrônico sobre a superfície de uma amostra e a gravação da corrente emitida em função da posição. Três anos mais tarde, Ardenne construiu o primeiro microscópio eletrônico por varredura (MEV) que possuía duas lentes magnéticas que focalizavam o feixe eletrônico. Dois conjuntos de bobinas foram usados para defletir o feixe sobre a amostra. A amostra deveria ter uma espessura fina e a corrente produzida, era usada para obter micrografias. O filme de gravação era colocado numa base giratória logo abaixo da amostra. O movimento de rotação era acoplado ao movimento do feixe. A ampliação do instrumento era dado pelo movimento do filme, dividido pelo movimento do feixe. Estas medidas apresentavam muitos erros, os tempos de medida eram longos, e a corrente transmitida era baixa. O MEV possui três partes principais: uma coluna eletro-óptica que gera e colima o feixe eletrônico. Um sistema de vácuo incluindo a câmara onde fica a amostra. E a parte de detecção do sinal e o sistema de geração de imagem. Uma amostra submetida a um feixe de elétrons apresenta diversos tipos de sinais, propiciando a cada um deles um modo particular de

operação. No caso particular de um MEV, o princípio de operação baseia-se fundamentalmente na quantificação dos elétrons secundários emitidos por uma amostra como resposta a uma excitação eletrônica incidente. Esta medida de elétrons secundários (ES) permite uma definição qualitativa da morfologia e topografia da amostra. O feixe de elétrons se origina em um cátodo geralmente de tungstênio aquecido por uma corrente elétrica (I_f). Os elétrons emitidos são acelerados desde o cátodo através de uma grade e um ânodo aterrado (V_{gn}). Este sistema de eletrodos é chamado de canhão de elétrons. Posteriormente um sistema de lentes reduz o diâmetro do feixe de elétrons a aproximadamente 100 Å. A redução é realizada usando duas ou mais lentes magnéticas em série, cada uma capaz de reduzir o diâmetro do feixe de elétrons de um fator de 20 a 100 vezes. Uma corrente ajustável (I_{cd}), é aplicada a uma bobina de deflexão para mover o feixe de elétrons através da amostra. A razão desta corrente com a corrente I_{cd} na bobina de deflexão do tubo de raios catódicos, determina a ampliação do microscópio. Quando os elétrons primários alcançam a amostra, a interação destes com os átomos do material, dá origem a elétrons secundários (ALBERTS *et al*, 2008; GRIFFITHS, 2006; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2000).

O número de elétrons secundários emitidos, varia de acordo com a geometria e outras propriedades da amostra. Os elétrons secundários são coletados por um detector, produzindo imagem. Os elétrons "backscattered" (retroespalhados) e fótons emitidos pela amostra pela ação do feixe de elétrons podem também ser usados para produzir imagens (THORNTON, 1968; REIMER, 1985; CHAVEZ, 1991).

O microscópio eletrônico de varredura é um equipamento capaz de produzir imagens de alta ampliação (até 300.000 X). As imagens fornecidas pelo MEV possuem um caráter virtual, pois o que é visto no monitor do aparelho é a transcodificação da energia emitida pelos elétrons, ao contrário da radiação de luz natural. Os elétrons secundários fornecem imagem de topografia da superfície da amostra e são os responsáveis pela obtenção das imagens de alta resolução, já os retro espalhados fornecem imagem característica de variação de composição.

O Microscópio Eletrônico se tornou um instrumento imprescindível nas mais diversas áreas: eletrônica, geologia, ciência e engenharia dos materiais, ciências da vida, etc. (CHAVEZ, 1991; MALISKA, 2001).

1.4 – A Técnica de Liofilização -

O conceito básico da liofilização é a desidratação e se aplica a fármacos e tecidos biológicos. As técnicas de criosecação ou liofilização, são uma alternativa para preservar moléculas bioativas (DNA, organelas e enzimas), produtos farmacêuticos (antibióticos) e até mesmo células e materiais mais delicados (KESKINTEPE *et al*, 2002; KUSAKABE *et al*, 2001; KAMIGUCHI, 2004).

Em Reprodução Animal a liofilização visa à preservação celular através da retirada da água dos sistemas biológicos por sublimação do gelo. Recentemente, a liofilização tem sido aplicada para preservar espermatozoides de mamíferos (MARTINS *et al*, 2006).

No ano de 2013 comemorou-se o cinquentenário da Sociedade de Criobiologia e 75 anos desde a primeira vitrificação de esperma feito por Luyet em 1938. Desde então, muitas técnicas foram desenvolvidas e a preservação de células, tecidos e até mesmo órgãos tem sido possível. Armazenamento de amostras criopreservadas, em nitrogênio líquido, demanda manutenção, espaço de armazenamento, equipamento de armazenamento e custos. Uma alternativa que iria minimizar os custos de armazenamento e manutenção vem ganhando no campo da preservação de células, nos últimos anos, é o armazenamento a seco. A Secagem de células pode ser conseguida por qualquer uma das técnicas de secagem química ou liofilização. A Liofilização é obtida por sublimação do gelo após congelamento da amostra a temperaturas abaixo de zero. O processo é prejudicial para a membrana celular e algum grau de dano cromossômico também pode ocorrer devido a nucleases endógenas.

O desenvolvimento embrionário após a injeção intracitoplasmática do óvulo (ICSI) com cabeças de espermatozoides liofilizados tem sido relatada em seres humanos, hamster, gado, porcos, gatos, equinos e em macacos da espécie rhesus, e descendentes vivos foram relatados em murganhos, coelhos, ratos e peixes. Foi demonstrado recentemente por ARAV *et al* (2013), a utilização de células somáticas liofilizadas de ovinos, para transferência de núcleos. Utilizou-se a tecnologia de congelamento direcional para liofilizar células somáticas, que foram mantidos à temperatura ambiente durante 3 anos. Essas células foram reidratadas e, em seguida, usadas para direcionar o desenvolvimento embrionário após a transferência nuclear em in vitro de oócitos enucleados e amadurecidos. Em outro braço do estudo, as células-tronco hematopoiéticas humanas foram liofilizadas e re-hidratadas com água e mostraram-se viáveis e mantiveram a sua capacidade clonal mostrando que foram capazes de se

desenvolver em todas as linhagens de sangue. Este foi o primeiro estudo a demonstrar células que sofreram liofilização completa seguida de reidratação têm mantido não só a sua viabilidade, mas também a sua funcionalidade.

1.5 – Fertilizações com espermatozoide liofilizado em reprodução animal –

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 meio de tampão a base de Tris-HCl com 50 mM 20 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.

Outro importante experimento com utilização de espermatozoide de rato liofilizado foi feito para verificar a possibilidade de aplicação prática na preservação e transporte de recursos genéticos. No entanto, ainda existem muitos aspectos que precisam ser estudados. Em particular, é essencial assegurar a preservação em longo prazo. Recentemente, foi aplicada a teoria da cinética de degradação acelerada ao espermatozoide de rato liofilizado e verificou-se que a preservação em longo prazo por métodos convencionais requer temperaturas inferiores a -80°C . Quando a relação entre a pressão na secagem primária e o potencial de preservação do liofilizado, uma pressão de 0,37 mbar na secagem primária melhorou significativamente a taxa de desenvolvimento para o estágio de blastocisto. Além disso, demonstrou-se que espermatozoide liofilizado armazenado a -80°C com e sem transporte pode manter sua

capacidade de gerar descendência viável após o armazenamento por até 2 anos. (KAWASE & SUZUKI, 2011).

Em estudo muito importante realizado em camundongos, Ward e cols (2003) relatam os resultados da injeção intracitoplasmática de espermatozóides (ICSI) com espermatozóides liofilizados ou congelados sem crioprotetor após o armazenamento por períodos de até 1,5 anos. As amostras congeladas sem crioproteção foram mantidas a -196 graus C. Após armazenamento, os espermatozóides foram injetados nos oócitos por ICSI. Os cromossomos zigóticos e o desenvolvimento fetal no dia 15 da gestação foram examinados após 0, 1, 3, 6, 9 e 12 meses de armazenamento de espermatozóides. Quando se utilizaram espermatozóides frescos para ICSI, 96% dos zigotos resultantes continham cromossomos normais e 58% dos embriões de duas células transferidos se desenvolveram para fetos viáveis normais. Resultados semelhantes foram obtidos quando os espermatozóides foram congelados sem crioproteção e depois utilizados para ICSI (87% e 45%, respectivamente, $P > 0,05$) e após 12 meses de armazenamento de espermatozóides (média de seis pontos avaliados: 87% e 52%, respectivamente; $P @ 0,05$).

A liofilização diminuiu a proporção de zigotos com cariótipos normais (75% versus 96%, $P < 0,001$) e a proporção de embriões que se desenvolveram em fetos (35% vs. 58%, $P < 0,001$), mas semelhante ao congelamento, Não houve deterioração adicional durante os 12 meses de armazenamento (média de seis parâmetros examinados: 68% e 34%, respectivamente, $P > 0,05$).

Os descendentes vivos foram obtidos a partir de espermatozóides liofilizados e congelados após armazenamento durante 1,5 anos. Os resultados indicam que 1) o processo de liofilização propriamente dito provoca algumas anormalidades nos espermatozóides, mas o congelamento sem crioproteção não e 2) o armazenamento a longo prazo de espermatozóides congelados e liofilizados não é prejudicial para a sua integridade genética. O congelamento sem crioproteção é altamente bem sucedido, simples e eficiente, mas, como todos os métodos de armazenamento de esperma de rotina, requer nitrogênio líquido. O nitrogênio líquido também é necessário para a liofilização, mas os espermatozóides podem ser armazenados a 4 graus C e enviados à temperatura ambiente. Ambos os métodos de preservação são bem sucedidos, mas o congelamento rápido sem crioproteção é o método preferido para a preservação de espermatozóides a partir de estirpes de camundongos com genes e mutações únicas

Posteriormente, outros estudos demonstraram sucesso na liofilização de espermatozoides, com nascimento de prole viável, após a reidratação do sêmen de espécies como coelhos (LIU *et al*, 2004), ratos (HIRABAYASHI *et al*, 2005; HOCHI *et al*, 2008) hamster (MUNETO & HORIUCHI, 2011), porcos (Kwan e cols, 2011) e 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.

Muitas linhagens de ratos geneticamente modificados foram gerados em todo o mundo e preservação de espermatozoides é um método valioso para o armazenamento destas estirpes como recursos genéticos. Liofilização é um método de preservação útil porque não exige nem nitrogênio líquido nem gelo seco para preservação e transporte. Já foi relatado a preservação a longo prazo em 4°C de espermatozoides de rato usando uma solução tampão simples (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) para o congelamento. Descendência com fertilidade foram obtidos a partir de oócitos fertilizados com espermatozoides secos por liofilização a partir de camundongos C57BL / 6 e estirpes de murganhos B6D2F1 armazenadas a 4°C, durante 3 anos. Este método de liofilização é uma ferramenta segura e econômica para o biobanking de cepas valiosas do camundongo (KANEKO *et al*, 2012).

O trabalho com espermatozoide liofilizado ajuda a delinear os fatores necessários para o sucesso da fertilização. Em outro estudo investigou-se o uso do esperma liofilizado na produção de embriões em eqüinos. No Experimento 1, índice de fragmentação de DNA não foi afetada pela três ciclos de congelamento / descongelamento ou liofilização. No Experimento 2, os oócitos injetados com espermatozoide liofilizado ou com o espermatozoides de um tratamento no qual o espermatozoide liofilizado foi suspenso em extrato citoplasmático de espermatozoides (SE), apresentou taxas de desenvolvimento de blastocisto entre 0 e 28%, respectivamente (P<0,05). No Experimento 3, a taxa de desenvolvimento embrionário era 6-11% após injeção de espermatozoide liofilizado a partir de sêmen fresco ou congelados e descongelados,

suspensos em SE. Estes dados indicam que o espermatozoide liofilizado pode participar na até a fase de blastocisto nos equinos. O tratamento de ativação com extrato de esperma no espermatozoide liofilizado era necessário para o desenvolvimento de blastocisto (CHOI *et al*, 2006).

Armazenar sêmen congelado em nitrogênio líquido é o método mais comum para a preservação em longo prazo do esperma, mas requer recipientes de armazenamento volumosos e monitoramento constante dos níveis de nitrogênio. Outros métodos de preservação de espermatozoides têm sido investigados, incluindo o tratamento de espermatozoides com o álcool, microondas ou liofilização.

Linhagens foram produzidas através de espermatozoides liofilizados para a fertilização por injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) em várias espécies, incluindo o rato, camundongo e coelho. (CHOI *et al*, 2006).

A capacidade para detectar danos nucleares é uma ferramenta importante para o desenvolvimento de métodos de preservação de espermatozoides. Foi utilizado o teste laranja de acridina (AOT) e o ensaio de (TUNEL) para avaliar o estado DNA de espermatozoides preservados com diferentes meios de liofilização. A AOT não detectou diferenças entre os diferentes meios de liofilização. No entanto, foram observadas diferenças na integridade do DNA entre os tratamentos com o ensaio de TUNEL, o que sugere que TUNEL é um método mais sensível para a avaliação do DNA do esperma. O uso de TCM 199 e 10% de FCS como meio de liofilização resultou em 14% das células com fragmentação de DNA em ensaio de TUNEL. A AOT indicou apenas 4% das células com danos de cromatina, com este mesmo tratamento, sem diferenças significativas quando comparado aos outros tratamentos. O grau de fragmentação do DNA foi negativamente relacionado com o potencial de fertilização, assim como danos no DNA espermático foi inversamente correlacionado com a formação de pró-núcleo no embrião. O ensaio de TUNEL foi encontrado para ser um método eficaz para detectar danos no DNA de espermatozoides, e pode ser usado como uma ferramenta para prever a fertilidade masculina (MARTINS *et al*, 2007).

Foi analisado também a fertilização de oócitos de suínos após a injeção intracitoplasmática de espermatozoides liofilizados. Ativação e formação pronuclear masculino (MPN) foram melhores em oócitos injectados com cabeças de espermatozoides liofilizados isoladas do que com espermatozoides liofilizados inteiros, mas os embriões clivados foram geralmente difíceis de desenvolver ao estágio de

mórula ou blastocisto. Quando espermatozoides foram liofilizados durante 24 h, a ativação do oócito e formação MPN após a injeção da cabeça do espermatozoide foram inibidas. O desenvolvimento embrionário para o estágio de blastocisto só foi obtido após injeção de cabeças de espermatozoides isoladas a partir de espermatozoides liofilizados durante 4 h e armazenado a 48C. A percentagem de embriões que se desenvolveram para a fase de blastocisto não foi aumentada pelo tratamento de oócitos injetados com ionóforo de Ca (5-10 mM).

O aumento do tempo de armazenamento de espermatozoide não afetou a ativação do oócito ou formação de MPN, mas o desenvolvimento de blastocistos foi observado somente após 1 mês de armazenamento. Estes resultados demonstram que os oócitos da espécie suína podem ser fertilizados com espermatozoides devidamente liofilizados e que os oócitos fertilizados podem desenvolver ao estágio de blastocisto (KWON *et al*, 2011).

Armazenamento de amostras criopreservadas em nitrogênio líquido é, no entanto, cada vez mais indesejável devido a problemas de segurança, risco de contaminação por agentes patogênicos, e de custo de armazenamento e de transporte elevados. Estas questões enfatizam a necessidade de sistemas de armazenamento seguros e de baixo custo como alternativas para espécimes biológicos. A geração de filhotes de camundongos normais a partir de oócitos fertilizados com espermatozoide liofilizado destacou o potencial da utilização de secagem como um método de preservação de células vivas. Estes achados foram expandidos para bovino, equino, porco, coelho e rato. No entanto, o desenvolvimento a termo foi relatado somente nos dois últimos casos, e observaram-se alguns casos de natimortos nos animais obtidos pela técnica. No entanto, este procedimento nunca foi relatado em primatas. Embora, em algumas espécies, nascidos vivos ocorressem após a reidratação do espermatozoide, a fertilização bem sucedida foi obtida apenas após a injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI), porque o processo submete as células a vários níveis de danos, e após a reidratação os espermatozoides são imóveis. As taxas de gravidez variam, mas o sucesso do processo, especialmente em roedores, pode estar relacionado com o fato de que estas espécies não requerem a contribuição paterna do centróssoma do espermatozoide para fertilização natural e o desenvolvimento embrionário. Assim, em ratinhos, a fertilização pode ser conseguida após a ICSI de espermatozoides bastante danificados, ou mesmo de apenas as cabeças do espermatozoide. O desenvolvimento de

técnicas para armazenar espermatozoides no estado seco a partir de espécies em que é necessária a contribuição do centrossoma paterno para o desenvolvimento embrionário, tais como primatas, em conjunto com técnicas de reprodução assistida, como a ICSI, poderia oferecer segurança e menos dispendio ao banco de espermatozóide (HOCHI *et al*, 2011).

1.6 – Liofilização do espermatozoide humano –

Um estudo de revisão de dados sobre liofilização de células / gameta foi recentemente publicado. Mostra que a maioria dos estudos têm utilizado os mesmos protocolos estabelecidos para criopreservação (armazenamento em nitrogênio líquido) como para liofilização celular (desidratação das amostras congeladas por sublimação de água). Apesar das inúmeras técnicas de subtração de água nos gametas, os cientistas têm contado quase que exclusivamente com a liofilização. Há, portanto, espaço para melhorias em realizar a subtração de água como estratégia para armazenamento de células / gameta a seco. Acreditam os autores que o desenvolvimento de protocolos de processamento a seco para uso em biobancos de células / gametas, a custo reduzido e com o mínimo de danos celulares, estará brevemente ao alcance (LOI *et al*, 2013).

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).

Um importante artigo faz revisão da situação atual da liofilização de espermatozoides em diversas espécies animais, resalta que a criopreservação tem sido rotineiramente utilizada para preservar o espermatozoide de diferentes espécies animais e mesmo humano. No entanto, o armazenamento de esperma congelado por um longo tempo traz muitos inconvenientes devido ao nitrogênio líquido. Muitas tentativas foram feitas para

superar as desvantagens do método de criopreservação atual. A liofilização tem sido proposta como método alternativo para a preservação do esperma para conseguir a capacidade de armazenar doses de espermatozoides indefinidamente à temperatura ambiente ou em freezers comuns.

Atualmente, tem sido relatado com sucesso a liofilização de espermatozoides em muitas espécies animais, incluindo caninos e felinos. É bem conhecido que durante o processo de liofilização, o DNA do esperma pode ser danificado, mas se for proporcionada uma proteção adequada, o núcleo do esperma poderia preservar a capacidade de activar o oócito e os embriões poderiam ser gerados por injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). Muitos fatores influenciam a eficácia da liofilização, portanto pesquisas atuais têm sido conduzidas para encontrar estratégias para controlar esses fatores para manter a integridade do DNA do espermatozoide. Esta revisão descreve o método mais recente de liofilização de espermatozoides para aplicação prática na preservação e transporte de recursos genéticos. Além disso, foram estudadas as abordagens para melhorar a eficiência da técnica. Demonstrou-se que a integridade do DNA do espermatozoide liofilizado de cão é afetada pela composição da solução de liofilização bem como pela temperatura e período de armazenamento. Estudos adicionais são necessários para refinar o protocolo de liofilização, a fim de proteger o DNA e manter a funcionalidade do esperma e obter prole de espermatozoide liofilizado (OLACIREGUI & GIL 2017).

Um estudo muito impactante foi realizado por GIANAROLI et al (2012), quando comparou as lesões em DNA de espermatozoides humanos observadas após congelamento e após liofilização. Em amostras de esperma de 30 doadores dividiram-se em duas alíquotas, uma para ser liofilizada e outra para ser criopreservada em nitrogênio. A análise constou de contagem, motilidade, morfologia, viabilidade, integridade do DNA, estado cromossômico e propriedades de birrefringência de espermatozoides humanos liofilizados e criopreservados comparados com os mesmos parâmetros na amostra fresca. Embora a viabilidade e a motilidade do esperma estivessem totalmente comprometidas após a liofilização, a estrutura da cromatina de esperma não foi alterada em comparação com amostras frescas, o que demonstrou que o procedimento não afeta a integridade do DNA. As estruturas protoplasmáticas internas de esperma-cabeça também foram preservadas, o que foi estimado pela avaliação das correspondentes características de birrefringência. Após a criopreservação com

nitrogênio líquido, a motilidade, viabilidade e integridade do DNA dos espermatozóides foram estatisticamente reduzidas significativamente em comparação com as amostras frescas; A proporção de espermatozóides com birrefringência anormal da cabeça aumentou significativamente.

O processo de liofilização danifica profundamente as membranas celulares; Contudo, ao contrário da preservação em nitrogênio líquido, não afeta a integridade do DNA.

Este estudo foi motivo de inúmeras discussões e debates, sendo motivo de um editorial de importante periódico de urologia, escrito por NIEDERBERGER (2012), que aborda a questão ressaltando que “criopreservação dos espermatozóides é uma técnica altamente útil, mas geralmente requer nitrogênio líquido. Recentemente pesquisadores têm desenvolvido formas de liofilização de espermatozoides, que podem preservar o gameta por longos períodos em uma fração do custo dos métodos atuais. Estes investigadores demonstram que a liofilização mantém a estrutura da cromatina do esperma. Eles também relatam que suas técnicas de preservação de nitrogênio líquido alteraram a estrutura da cromatina de espermatozoides, uma observação não compartilhada por muitos pesquisadores. Uma vez que está bem estabelecido que as técnicas de preparação antes da criopreservação alteram a estrutura da cromatina do esperma, a mensagem aqui não é que a liofilização é melhor, mas que pode ser feita.

Em nosso meio a única publicação relacionando a ultraestrutura do espermatozoide humano submetido a liofilização é uma tese de doutorado realizado em nosso grupo de pesquisa, em material compartilhado ao nosso, que avaliou a microscopia eletrônica pela técnica de transmissão (BOSSI, 2016). 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.

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 (BOSSI, 2016).

OBJETIVOS

Analisar a ultraestrutura do espermatozoide humano submetido ao processo de liofilização, utilizando a microscopia eletrônica pela técnica de varredura.

Verificar os aspectos funcionais do espermatozoide submetido a liofilização, através da avaliação da integridade do DNA e da sua vitalidade.

MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Descrição do Estudo –

Trata-se de estudo prospectivo e descritivo, em amostras de espermatozoides humanos, coletados de pacientes sadios e voluntários, com consentimento informado, exclusivamente para a pesquisa. 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 julho de 2017. 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).

3.2 – Amostras do Estudo –

Foram doadas para o estudo 26 amostras seminais excedentes dos tratamentos de Reprodução Assistida. A média de dias de abstinência sexual dos pacientes foi de 3,1 dias, variando de 2 a 10 dias. O volume médio dos sêmens foi de 2,4 mL, variando de 1,5 a 4,6 mL. O valor médio do pH seminal foi de 7,84 variando de 7,5 a 8,5. A idade média dos pacientes foi de 34,6 anos e variou de 19 a 56 anos. As causas de infertilidade foram: endometriose (n=8), infertilidade sem causa aparente (ISCA) (n=5), falha de coito programado (n=1), falha de inseminação intra-uterina (IIU) (n=1), ovariana (n=8), causas múltiplas (n=3).

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, *FreezeMedium* (Irvine Scientific, EUA) ou *SpermFreezeSolution* (Vitrolife, Suécia). Foram utilizados para comparação três diferentes meios de cultivo, solução tamponada com 10 mM Tris-HCl e 1mM de EDTA (GIANAROLI *et al*, 2012), meio de cultivo *HumanTubalFluid* modificado (mHTF) (Irvine Scientific, EUA) ou *Sydney IVF Gamete Buffer* (Gamete) (Cook Medical, Australia). As amostras do estudo foram acondicionadas em frascos de liofilização, no volume final de 0,5 mL ou 1mL e foram congeladas e armazenadas em nitrogênio líquido até liofilização ou em freezer -80o C.

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

3.3- 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). Este exame teve como objetivo confirmar a qualidade dos espermatozoides utilizados na pesquisa, sem interferência de nenhum método de preparo (criopreservação e liofilização).

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.

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

A concentração média observada dos sêmens utilizada no estudo foi de $57,84 \times 10^6$ e variou de 20×10^6 ao máximo de 200×10^6 . A média da motilidade progressiva foi de 61,44%, variando de 28% a 89%; a média da motilidade não progressiva foi de 9,24%, variando de 0 a 20%; a média dos imóveis foi de 29,52%, variando de 7% a 57%. A média de espermatozoides morfologicamente normais foi de 9,45%, variando de 4% a 18%. A média para o status normal da cromatina foi 88,4%, variando de 69% a 98%. Em duas amostras não foi possível a confecção de lâminas para análise da morfologia e status da cromatina. A média da fragmentação do DNA do sêmen fresco foi de 13%.

3.4- Congelamento das amostras

As amostras iniciais foram separadas em alíquotas de menor volume edistribuídas de acordo com a disponibilidade nos diferentes meios utilizados na pesquisa. Os protocolos realizados no congelamento são descritos a seguir.

3.4.1 – Congelamento em meio crioprotetor

As amostras foram congeladas, tanto para o grupo controle, quanto para o grupo liofilizado, em dois diferentes meios crioprotetores próprios para congelamento de amostras seminais: *FreezingMedium* e *SpermFreezeSolution*

O *FreezeMedium* 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 colocados no vapor de nitrogênio por mais 30 minutos e então imersas no nitrogênio líquido.

O *SpermFreezeMedium* 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. Algumas alíquotas foram congeladas em freezer (-80°C) após o congelamento no vapor de nitrogênio seguindo os passos anteriormente descritos. Os resultados demonstraram que não houve diferenças entre amostras congeladas em nitrogênio líquido (-196°C) ou em freezer (-80°C) depois de submetidas a liofilização.

3.4.2- Congelamento em meios de cultivo

As amostras seminais também foram congeladas nos meios tamponados mHTF, Gamete e solução EDTA.

Após separação dos espermatozoides do líquido seminal pela técnica de gradiente de densidade Sydney IVF SpermGradient (Cook Medical, Australia), as amostras foram diluídas nos distintos meios e acondicionadas em palhetas com 0,5 ml para grupo controle e frascos de vidro próprios para liofilização, com volume final de 0,5 ml ou 1 ml. O congelamento foi realizado em freezer – 30°C por 30 minutos, vapor de nitrogênio por mais 30 minutos até serem completamente submersas em nitrogênio líquido a -196 °C.

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 Gamete também possui EDTA, além de soro albumina humano (HSA), tampão HEPES e Gentamicina. Foi desenvolvido especificamente para gametas (espermatozoides e oócitos) e mantém um ambiente adequado para manipulação e preparação destas células.

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 de congelamento no processo de liofilização faria diferença nos resultados, oito alíquotas foram congeladas em freezer e mantidas -80° C até o momento da liofilização.



Figura 1: Meios utilizados durante a liofilização dos espermatozoides.

3.5- 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 2). As amostras liofilizadas foram armazenadas em refrigerador 4°C até sua reidratação.

3.6 - Meios de liofilização.

Os meios utilizados para o processo de liofilização foram os dois crioprotetores, *FreezeMedium* ou *SpermFreezeSolution*, a solução tamponada de EDTA e meios de cultivo mHTF e Gamete.

Todas as soluções foram acondicionadas na concentração 1:1 em frascos próprios de liofilização (FIGURA 3 e 4). O volume final variou de 0,5 mL a 1mL, 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 membranas e demais estruturas do espermatozoide durante os processos de congelamento e desidratação.

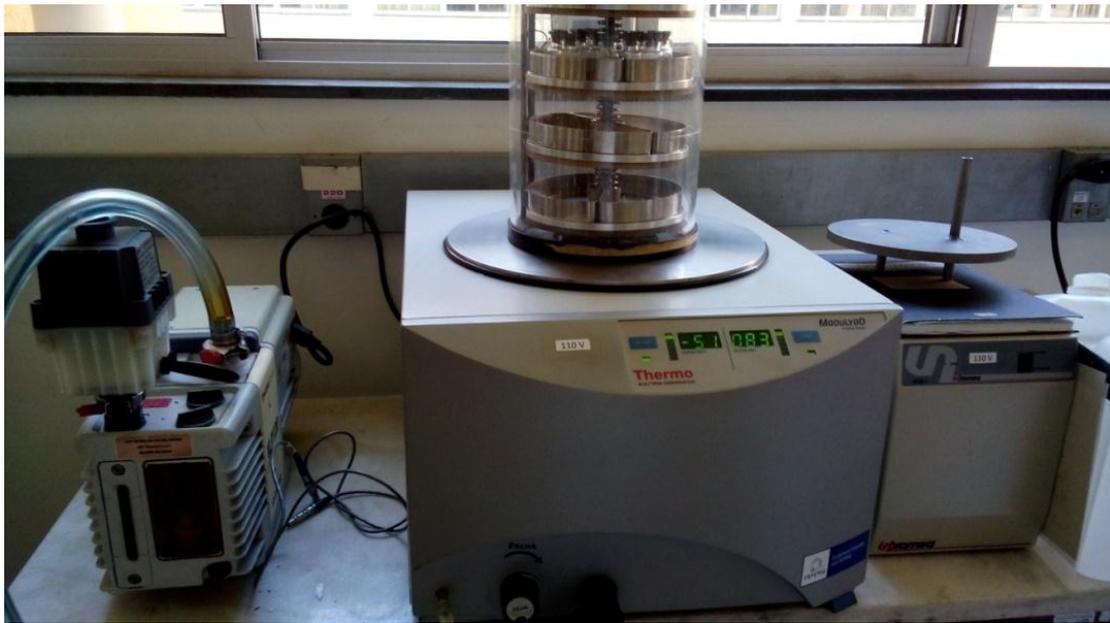


Figura 2: Liofilizador Thermo Fisher Scientific. Laboratório de Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica da UFMG.



Figura 3: Amostras durante o processo de desidratação. Abertura nos frascos permite sublimação da água presente no material.



Figura 4: Amostras após liofilização nos diferentes meios: *FreezeMedium*, mHTF, *SpermFreezeSolution*, Gamete e EDTA

3.7- 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 1mL 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 varredura.

3.8-Microscopia eletrônica (avaliação Ultraestrutural) –

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As amostras preparadas para microscopia eletrônica de varredura 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 4mL de tampão fosfato 0,1 M. As amostras foram acondicionadas em geladeira até sua entrega ao Centro de Microscopia da Universidade Federal de Minas Gerais para realização da fixação secundária.

Já no Centro de Microscopia, 100 µL do pellet foram pipetados sobre uma lamínula de vidro circular, com 13 mm de diâmetro, recoberta com poli-L-lisina. O material foi homogeneizado, deixado em repouso por 15 minutos e em seguida lavado com tampão fosfato. O tampão foi removido e as lamínulas foram imersas no fixador secundário (tetróxido de ósmio 1% em tampão 0,1M) por 1 hora à temperatura ambiente, dentro da capela de exaustão de gases. Após esse tempo as amostras foram lavadas 3x (10 minutos cada) com tampão 0,1M. O tampão foi retirado e as amostras foram imersas em ácido tânico 1% em tampão 0,1M, por 20 minutos à temperatura ambiente. Novamente as amostras foram lavadas 3x (10 minutos cada) com tampão 0,1M. O tampão foi removido e novamente as amostras foram imersas em fixador secundário (tetróxido de ósmio 1% em tampão 0,1M) por 1 hora à temperatura ambiente.

Em seguida o fixador secundário foi removido, lavando-se 3x (10 minutos cada) com água destilada. Posteriormente as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool (35% -100%)

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

Após a desidratação foi realizado a secagem em ponto crítico de CO₂ (protocolo separado); Realizou-se montagem do *stub* (*Tapered end pin slotted head 1/2" diameter (12,7 mm), pin 1/8" diameter (3,1 mm)*, Marca EMS, cat#. 75200) utilizando fita de carbono (*Double sided carbono tape, 8mm x 20*, Marca EMS, cat#. 77816) e cola de prata (*Silver conductive adhesive 476SS*, Marca EMS). A etapa subsequente e final foi realizar metalização com 5nm de ouro (protocolo separado).

Procedimento de secagem em ponto crítico de CO₂

(Equipamento Leica EM CPD030)

O processo de secagem em ponto crítico baseia-se na substituição do solvente utilizado na desidratação das amostras biológicas por dióxido de carbono (CO₂). Utiliza-se CO₂ liquefeito (sob-refrigeração de +- 8°C) e são realizadas vários ciclos de retirada de álcool e adição de CO₂, até que não existam mais resíduos do solvente. Em seguida, as amostras imersas em CO₂ líquido são aquecidas até 32°C, temperatura em que o CO₂ passa da forma líquida para gasosa, sendo por este motivo denominada ponto crítico do CO₂. Todo o procedimento é realizado utilizando-se o equipamento Leica EM CPD0303, disponível no CM-UFGM, e o preparo do material e operação do equipamento estão detalhados a seguir:

Preparo das amostras:

Transferir as amostras com a ajuda de uma pinça para uma Placa de Petri, contendo álcool absoluto. Em seguida, acondicionar as amostras nas cestinhas próprias ou no suporte, lembrando sempre de mantê-las mergulhadas no álcool absoluto;

Encher a câmara do equipamento até a metade de seu nível com álcool e em seguida transferir rapidamente as cestinhas ou suporte para dentro dela; Fechar a câmara.

Procedimento de metalização de amostras biológicas com ouro

(Equipamento: Metalizadora BALTEC MED020 Coating System)

A metalização com ouro é realizada em equipamento específico em que as amostras montadas em stubs são encaixada em um porta amostra dentro de uma câmara mantida sob pressão controlada (5×10^{-2} mBar) na presença de gás argônio. Quando se aplica uma corrente elétrica (25 mA), o argônio ioniza-se e seus íons atacam o alvo (placa) de ouro posicionado acima das amostras. O ouro então se pulveriza sobre as amostras, numa taxa controlada, de modo que se forma uma camada homogênea de espessura conhecida do metal sobre as mesmas. A quantidade de ouro depositada é

definida com ajustes específicos das configurações do equipamento (corrente, pressão, altura do portaamostras, entre outros).



Figura 5: Microscópio Eletrônico de Varredura FEG - Quanta 200 FEI do Centro de Microscopia da UFMG

3.9-Teste de vitalidade Eosina-Nigrosina (avaliação funcional)

O teste de vitalidade Eosina-Nigrosina foi utilizado para quantificar a sobrevivência espermática no sêmen liofilizado. Uma amostra de 10 μl de sêmen foi pipetada em um tubo de ensaio, onde foram adicionados 10 μl de corante vital Eosina amarela 1%. A solução foi homogeneizada por 1 minuto, quando foram adicionados 20 μl 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 6 e 7).

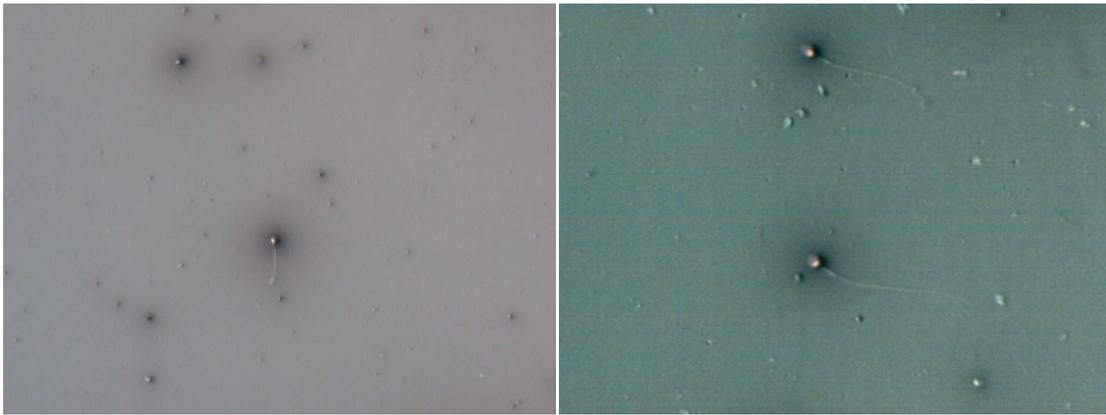


Figura 6: Teste de vitalidade espermática. Os espermatozoides vivos possuem cabeças transparentes apenas com a membrana corada pela Nigrosina.

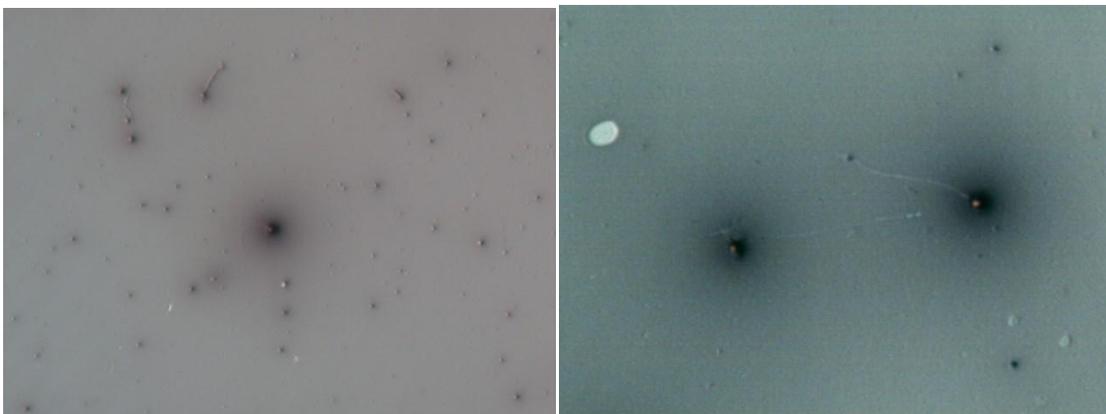


Figura 7: Teste de vitalidade espermática. Os espermatozoides mortos são totalmente corados, demonstrando perda de função da membrana.

3.10- Fragmentações 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 *eppendorf*. O *eppendorf* 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 *eppendorf* com agarose e homogeneizado.

Uma amostra de 8µl 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 9). Um valor abaixo de 30% de fragmentação de DNA espermático foi considerado normal.

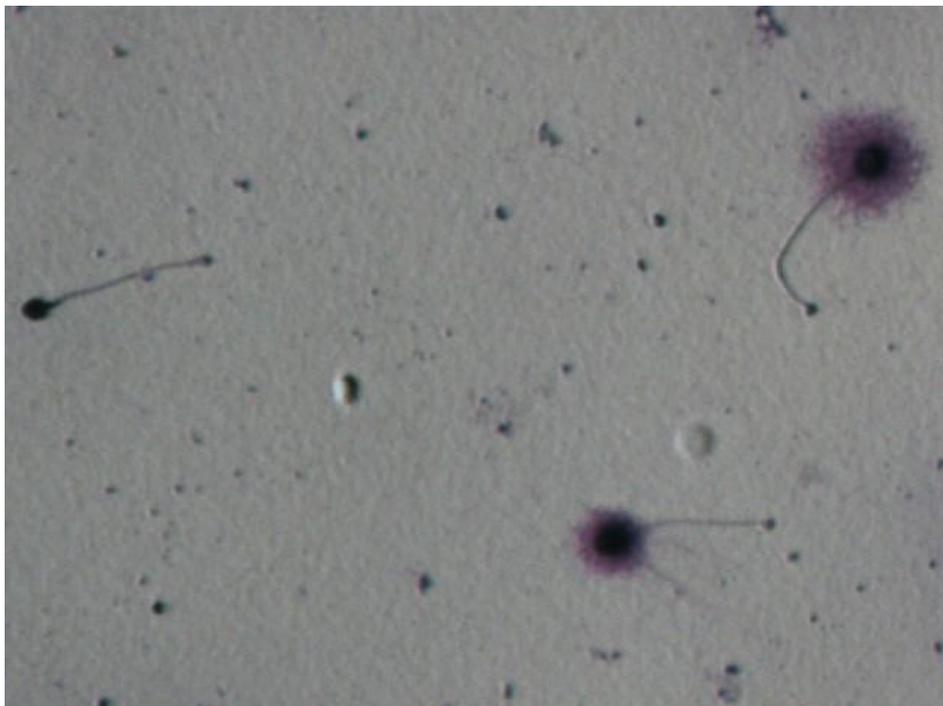


Figura 8 – Teste do Halosperm – a fragmentação do DNA promove a perda do halo rosáceo em torno da cabeça do espermatozoide.

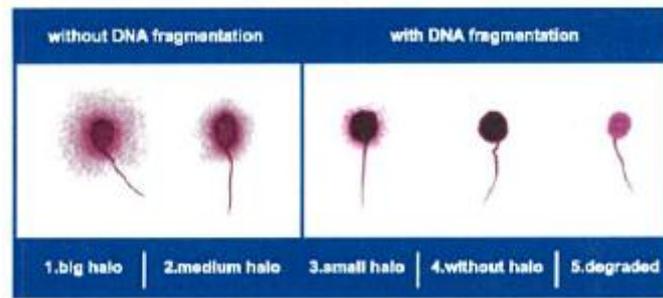


Figura 9 – Escala do Halosperm - diferentes graus de fragmentação espermática.

RESULTADOS

Do total de 26 amostras doadas, realizamos 94 alíquotas, baseado em volume proporcional dentro da quantidade disponível, resultando em 27 para o grupo controle e 67 para o grupo de estudo (liofilização). Foram perdidas 6 alíquotas durante a realização dos procedimentos. As falhas foram devido à perda de material durante a liofilização e falta de material para análise em microscopia. O volume final das amostras com quantidade de 1,0 ml apresentou melhor formação do líófilo e maior disponibilidade de material para análise pós reidratação.



Figura 10: Fluxograma do destino das amostras do estudo

TABELA 2- Número de alíquotas liofilizadas de acordo com meio/crioprotetor e volume final.

Meio\crioprotetor	Volume final 1,0 ml	Volume final 0,5 ml
TYB	7	7
Vitrolife	--	8
HTF	7	8
Gamete	10	--
EDTA	10	4

4.1.1 – Avaliação Ultra estrutural pela microscopia eletrônica de varredura – Amostra controle e após congelamento padrão nos diferentes meios.

Na análise por microscopia eletrônica, o sêmen fresco apresentava espermatozoides com cabeça e membrana plasmática intacta. As estruturas estão bem visíveis e sem sinais de rompimento na superfície celular, demonstrando boa aplicação das técnicas de microscopia eletrônica e que os danos causados no preparo não afetou a qualidade das amostras (FIGURA 11).

No sêmen submetido ao congelamento, a morfologia Ultraestrutural já apresentou algumas alterações características e conhecidas da ação deste processo na morfologia espermática. Apresentamos aqui imagens do grupo controle submetidos somente ao congelamento, nos respectivos meios em que viriam a ser liofilizados. Na peça média de espermatozoides membrana plasmática rompida em alguns pontos. Nas cabeças da maioria dos espermatozoides, presença de membrana plasmática intacta. No flagelo, estrutura de peça principal com membrana plasmática em bom estado de conservação. As amostras congeladas em EDTA apresentaram mais alterações na superfície celular. (FIGURA 12).

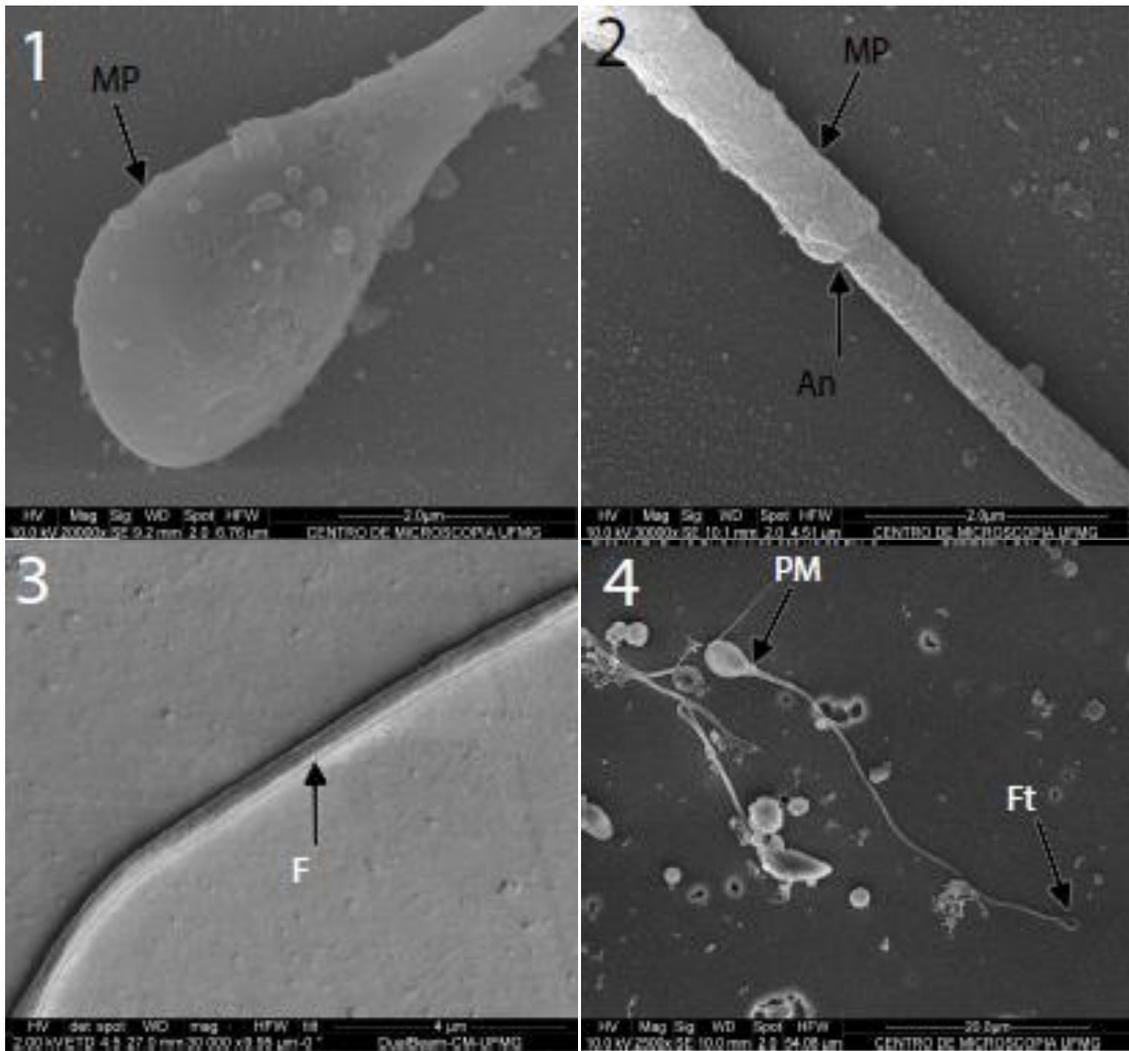


Figura 11 - Amostra de espermatozoide fresco. 1: cabeça (membrana plasmática com contorno bem delimitado.) 2: peça média e cauda (divisão bem delimitada entre peça média e cauda).3: flagelo íntegro. 4:cabeça, peça média e flagelo: estruturas bem preservadas. Porção terminal da cauda bem visível.

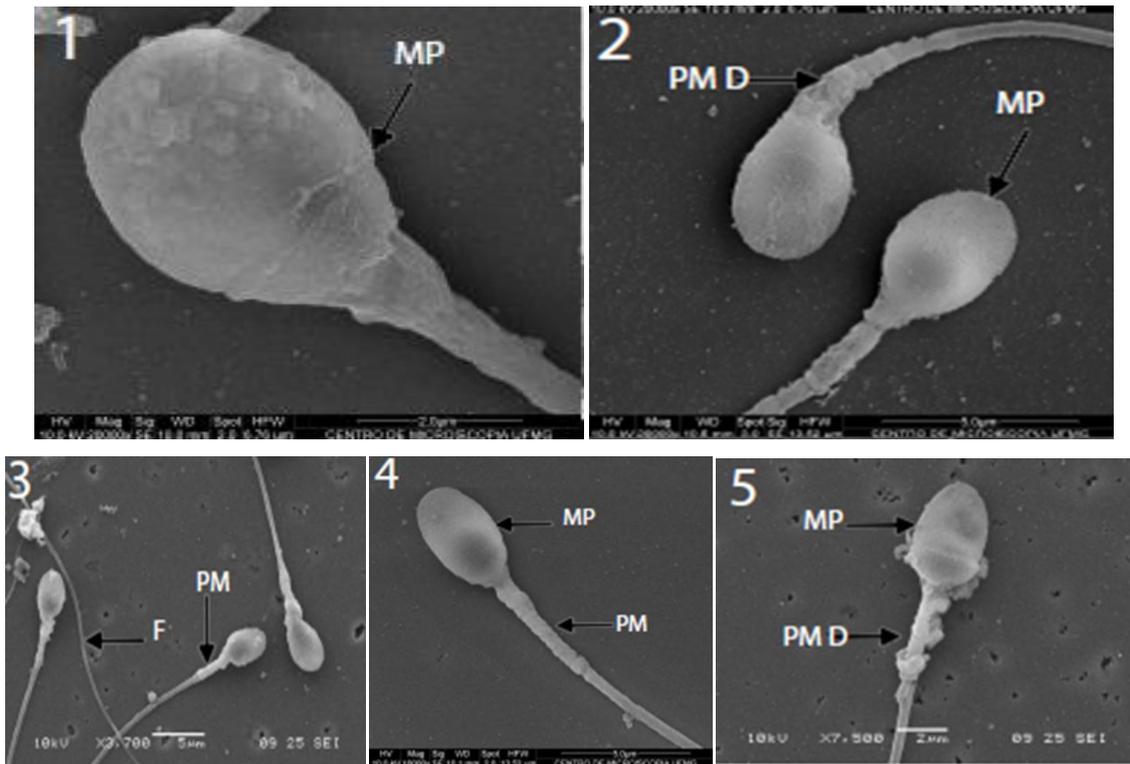


Figura 12 - Amostras congeladas com diversos meios já apresentam pequenas alterações estruturais. 1 - Congelada em FreezeMedium: pequenas alterações na membrana. Segmento equatorial da cabeça bem definido. 2- Congelados em SpermFreezeMedium: membrana plasmática bem definida em torno da cabeça. peça média rompida em alguns pontos. 3 - Congeladas em mHTF: estruturas em boas condições. 4- Congeladas em Gamete: membrana plasmática e peça media bem delimitadas. 5: Congeladas em EDTA: Membrana plasmática rompida em alguns pontos.

4.1.2 – Avaliação Ultraestrutural pela microscopia eletrônica de varredura de acordo com o meio de cultivo utilizado para liofilização.

O líófilo contendo espermatozoides foi analisado antes de sua reidratação. Observamos uma massa amorfa sem possibilidade de individualização das estruturas (FIGURA 13). Após a reidratação, os espermatozoides puderam ser identificados com detalhamento de suas estruturas, principalmente as caudas (FIGURA 14).

Observamos que as cabeças dos espermatozoides liofilizados com os diferentes meios de cultura, comparados aos congelados com método convencional, apresentavam um contorno irregular de suas bordas. As alterações são mais evidentes para os meios Gamete e EDTA (FIGURA 15).

Quando comparamos as peças médias dos espermatozoides, observamos também a presença de irregularidade na superfície, sendo mais acentuados quando liofilizados em meios Gamete e EDTA (FIGURA 16).

Com relação à membrana plasmática e demais estruturas, também identificamos comprometimento, após a liofilização, em toda superfície do espermatozoide (FIGURA 17).

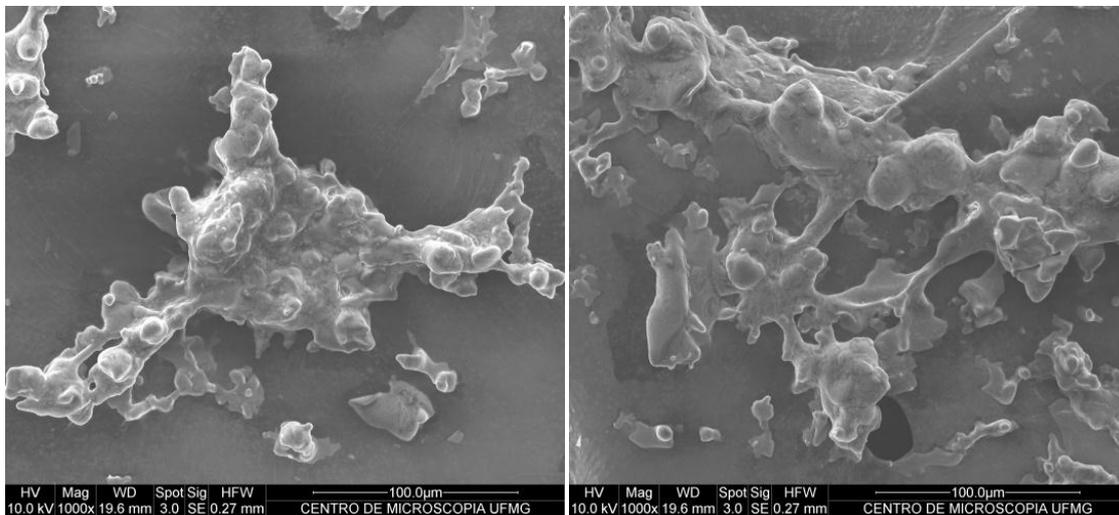


Figura 13- Liófilo de espermatozoides antes da reidratação

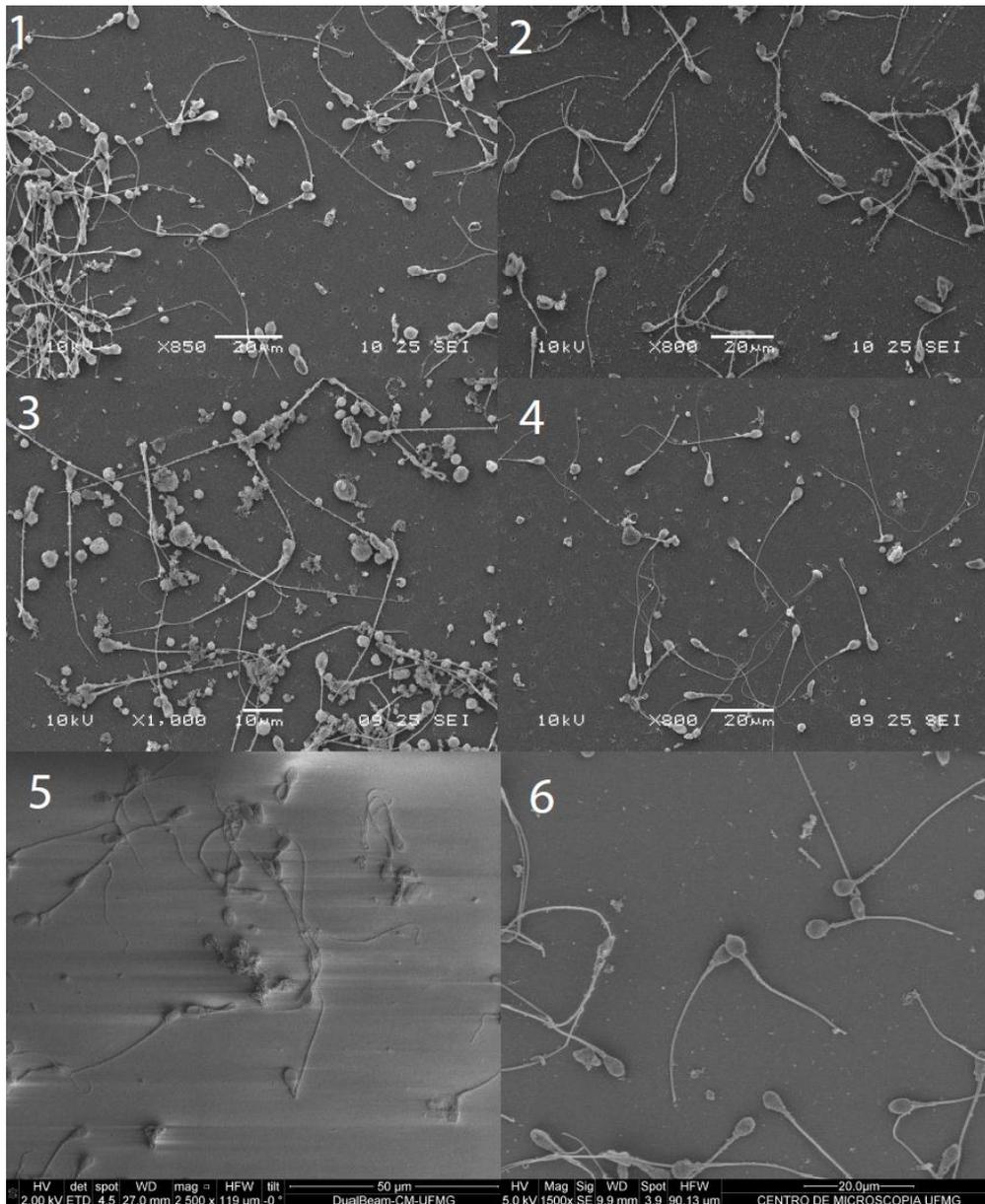


Figura 14: Identificação da cauda de espermatozoides pela técnica de varredura. 1- Espermatozoides frescos. 2- Espermatozoides liofilizados em *SpermFreezeMedium*. 3- Espermatozoides liofilizados em *FreezeMedium*. 4- Espermatozoides liofilizados em mHTF. 5- Espermatozoides liofilizados em Gamete. 6- Espermatozoides liofilizados em EDTA.

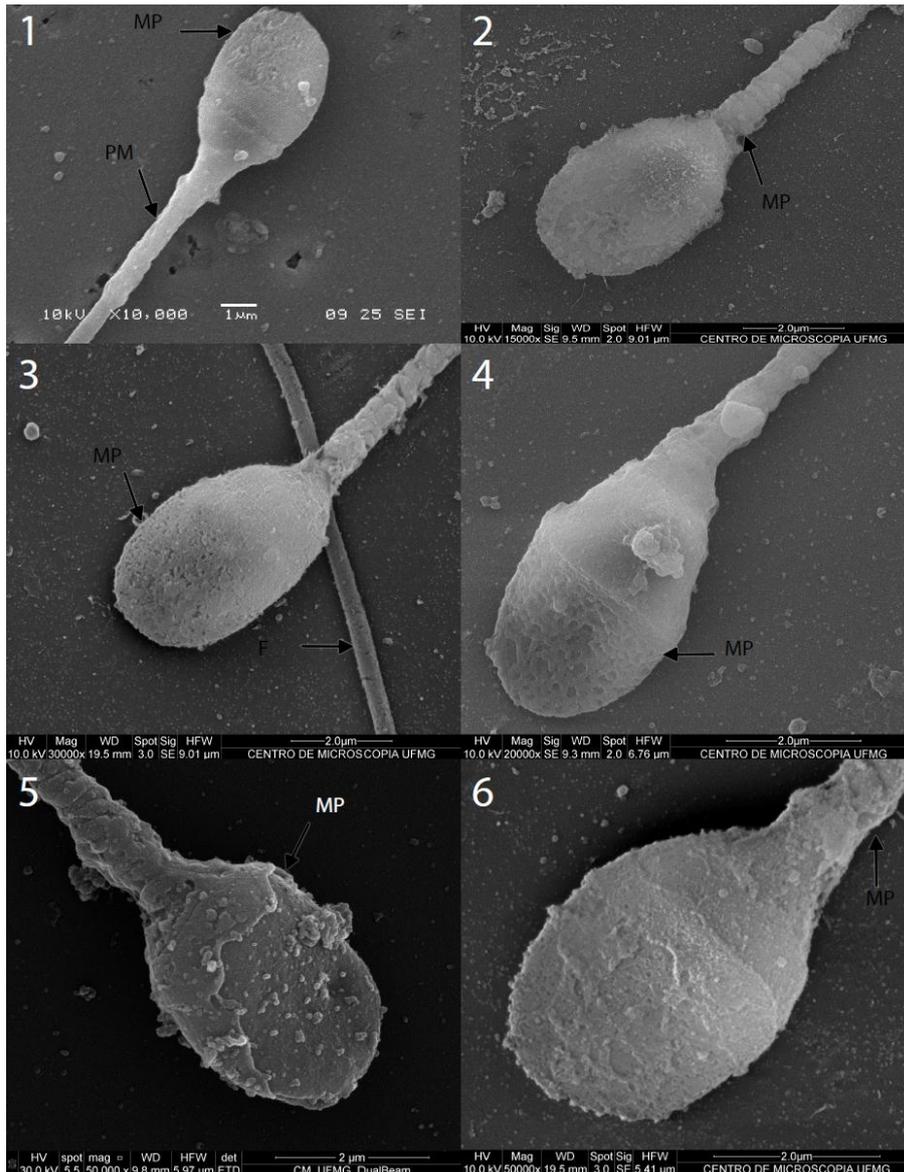


Figura 15: Identificação das cabeças dos espermatozoides pela técnica de varredura. 1- Espermatozóide congelado com crioprotetor *SpermFreezeMedium*: membrana plasmática (MP) bem delimitada e peça media (PM) íntegra. 2- Espermatozoide liofilizado com crioprotetor *SpermFreezeMedium*: Membrana irregular em toda extensão da célula. 3- Espermatozoide liofilizado com meio *FreezeMedium*: Peça media (PM) rompida em alguns pontos. Flagelo (F) em boas condições. 4- Espermatozoide liofilizado em meio mHTF: membrana plasmática enrugada no ápice da cabeça. 5- Espermatozoide liofilizado em meio Gamete: membrana plasmática rompida. 6- Espermatozoide liofilizado em meio EDTA: Contorno irregular das cabeças, peças médias.

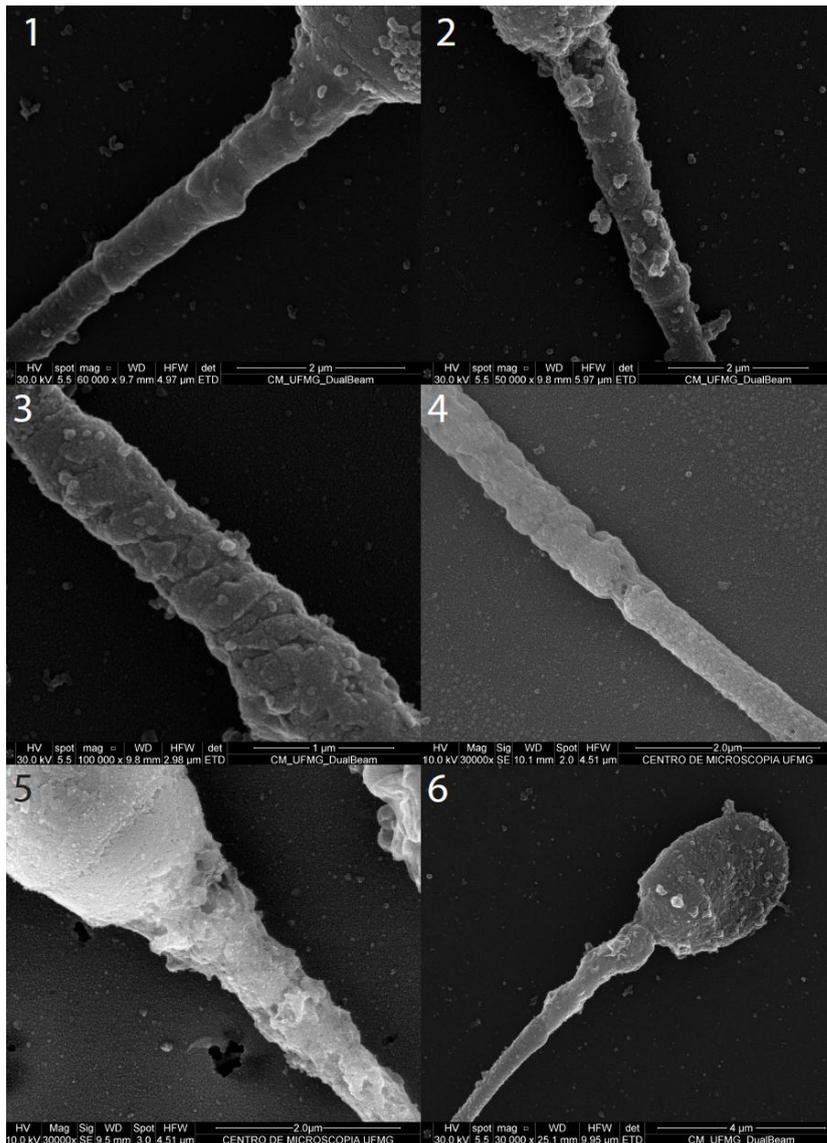


Figura 16: Identificação das peças médias dos espermatozoides pela técnica de varredura. 1. Espermatozoides congelados com crioprotetor. Peça média com a membrana (MP) regular e íntegra 2. Espermatozoides liofilizados em *SpermFreeze Médium*. Membrana plasmática rompida em alguns pontos 3. Espermatozoides liofilizados em *Freeze Médium*. Membrana (MP) da peça media irregular com estruturas semelhantes a mitocôndrias em formato espiral. 4 Espermatozoides liofilizados em mHTF. Peça media com a membrana regular mas parcialmente rompida. 5. Espermatozoides liofilizados em Gamete. Peça media danificada com membrana (MP) irregular 6. Espermatozoides liofilizados em EDTA. Membrana plasmática (MP) com contornos irregulares e parcialmente rompidas na região da inserção (I) com a cabeça.

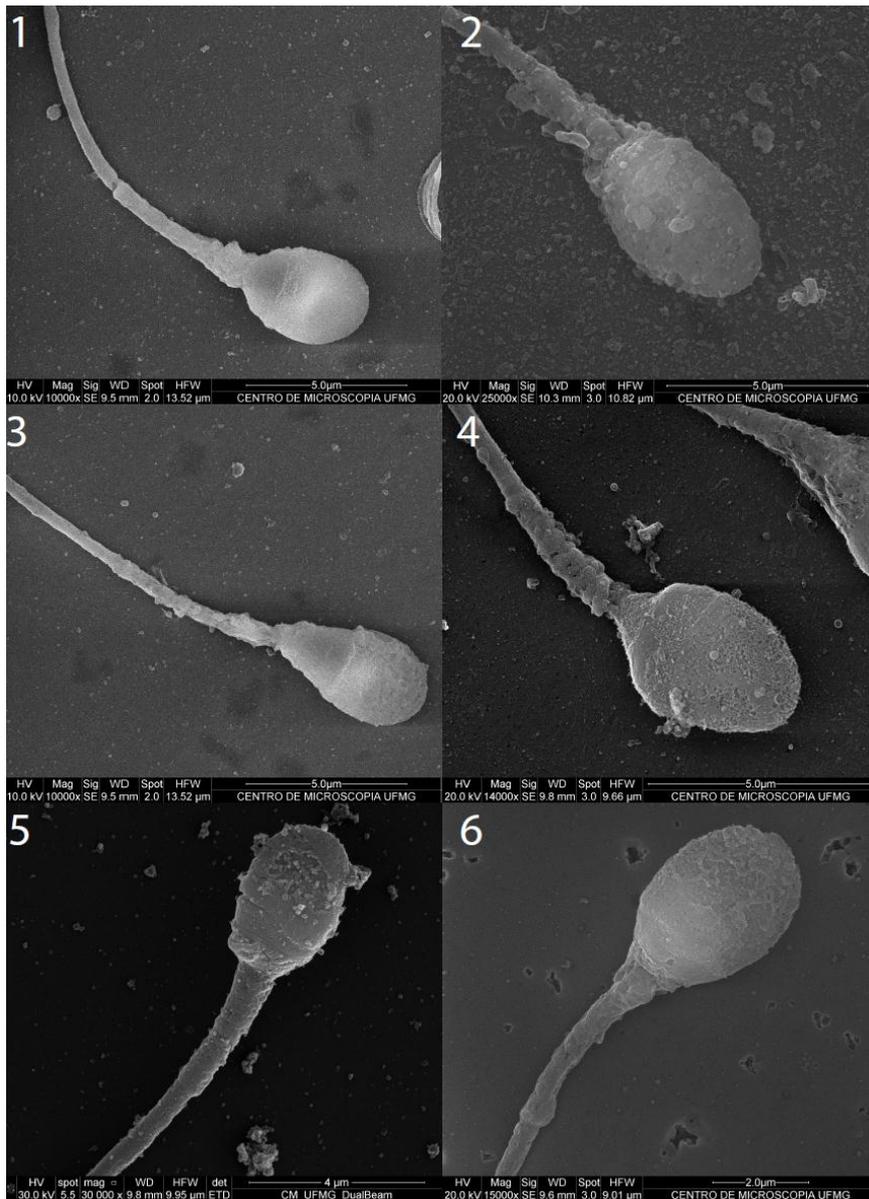


Figura 17: Identificação das estruturas dos espermatozoides pela técnica de varredura. 1. Espermatozoides congelados com crioprotetor. Membrana regular por toda extensão da cabeça, peça media e flagelo 2. Espermatozoides liofilizados em *SpermFreeze Médium*. Membrana irregular em todas estruturas 3. Espermatozoides liofilizados em *Freeze Médium*. Membrana irregular em toda extensão e parcialmente rompida na inserção da peça media com a cabeça 4 Espermatozoides liofilizados em mHTF. Membrana irregular em todas estruturas 5. Espermatozoides liofilizados em Gamete. Membrana regular entre peça media e flagelo mas rompida na cabeça e inserção entre peça media e cabeça 6. Espermatozoides liofilizados em EDTA. Membrana irregular e rompida em todas estruturas.

4.2- Avaliação Funcional dos espermatozoides após liofilização -

Todas as amostras submetidas ao teste de vitalidade e de fragmentação de DNA revelaram perda total da vitalidade e fragmentação total de DNA. (FIGURAS 18 e 19).

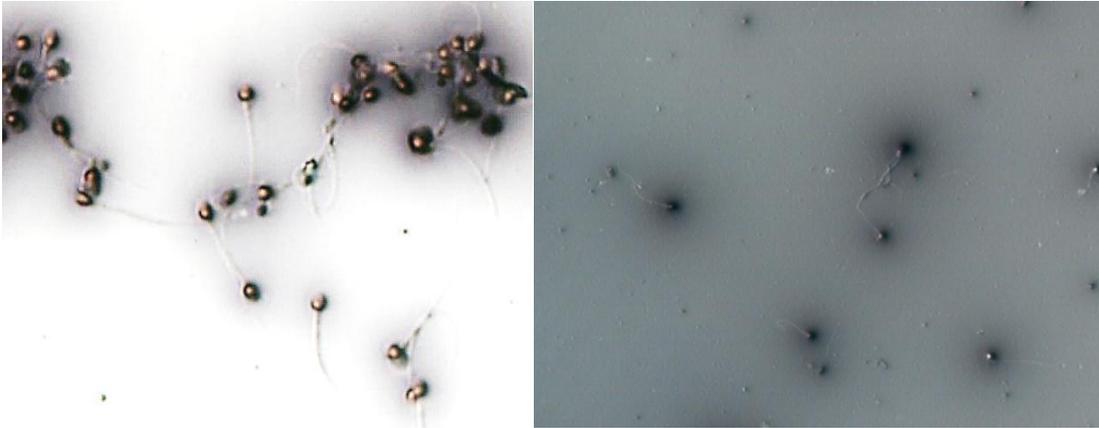


Figura 18: Teste de vitalidade espermática com eosina-nigrosina após reidratação.

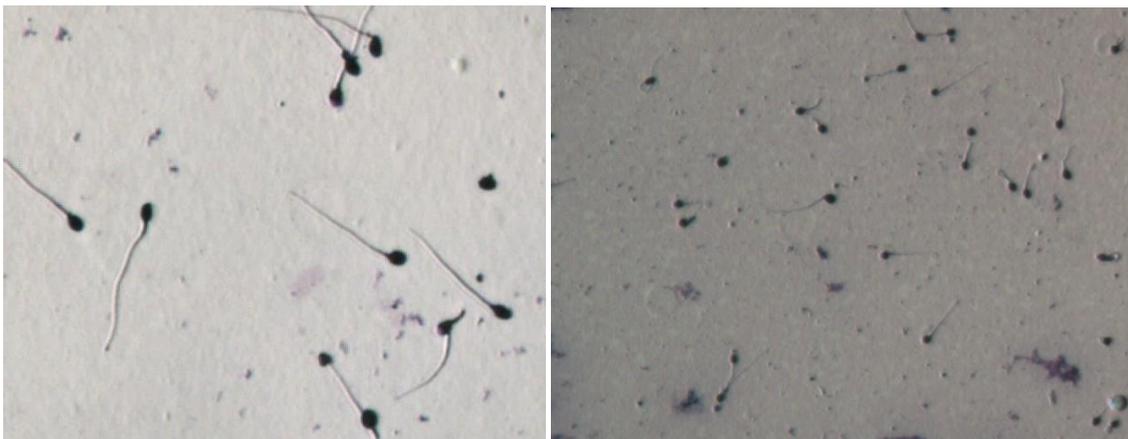


Figura 19: Teste de fragmentação de DNA (Halosperm) Após reidratação da amostra, ausência de halo em todos os espermatozoides.

DISCUSSÃO

A elaboração do presente estudo alinha-se com a tendência das pesquisas contemporâneas que buscam segurança e efetividade na conservação de gametas para utilização nos processos de reprodução assistida.

A necessidade de preservar a capacidade reprodutiva em situações especiais faz com que aumentem em todo mundo os bancos de sêmen e de óvulos, seja na forma específica ou no armazenamento de tecidos que produzem estas células (tecido testicular e fragmentos ovarianos).

As indicações para armazenamento das células germinativas se ampliam a cada dia, englobando a necessidade de tratamentos quimioterápicos capazes de lesar estas células, a ocorrência de trauma agudo testicular, desejo de manutenção reprodutiva para momento posterior mais adequado (GADDA et al, 2013). Esta tendência se tornou possível a partir do desenvolvimento de técnicas de reprodução assistida que utilizando os gametas produzem com efetividade progressivamente maior a obtenção de embriões e, a partir destes, a obtenção de gestações.

Uma questão específica envolve a conservação dos espermatozoides, seja humano como também nas espécies bovina e equina. Os chamados bancos de espermatozoides são instalados em crio ambiente, ou seja, as células reprodutivas ficam armazenadas em baixa temperatura, seja em freezer ou em bojões de nitrogênio líquido. Esta situação envolvem custos elevados, seja pelo espaço físico, seja pelo custeio dos próprios equipamentos. Outro aspecto fundamental é a vulnerabilidade existente neste tipo de conservação, também geradora de custeio e de responsabilização jurídica em seus responsáveis.

Em decorrência deste aspecto citado acima, iniciou-se há alguns anos a procura de alguma técnica que permita a manutenção dos espermatozoides para uso posterior em reprodução assistida com baixo custeio e maior facilidade de execução. A técnica da liofilização foi a escolhida de maneira automática pela experiência que já se tinha observado na conservação de outros produtos biológicos e farmacológicos.

A liofilização é o processo de retirar de maneira aguda o componente líquido de qualquer produto. No caso de células pretende-se promover a desidratação da estrutura sem comprometer sua integridade funcional. A passagem do estado líquido para o estado gasoso, denominado sublimação é essencial na Liofilização. A reconstituição de qualquer material liofilizado é simples, pois envolve exclusivamente a restauração do componente líquido retirado. Toda célula, fármaco ou vacinas liofilizadas passam a ser

estáveis em temperatura ambiente, não necessitando de local específico ou estrutura laboratorial para sua armazenagem. Esta técnica permite que lotes de vacinas e medicamentos possam ser transportados por grandes distâncias em embalagens simples e sem cuidados especiais, gerando a possibilidade de atender populações em risco de locais distantes e desprovidos de estrutura básica, tais como eletricidade e ambientes assépticos. No caso de espermatozoides para uso em reprodução assistida permitirá a dispensa dos bancos de sêmen específicos e também os bojões de transportes para locais distantes onde o processo é realizado, especificamente em se tratando de reprodução bovina e equina.

A liofilização é técnica relativamente antiga e testada na área de saúde. Há cerca de trinta anos começou a ser utilizada de forma sistemática na conservação de fármacos e vacinas. Seu uso envolvendo células reprodutivas e outras são mais recentes, sendo iniciado há uma década envolvendo os bovinos (MARTINS et al, 2007).

A maior diferença entre liofilizar um fármaco e uma célula situa-se na estabilidade dos produtos que serão submetidos à perda aguda de líquidos. Em estruturas físicas estáveis como os medicamentos este processo envolve menores riscos, no entanto ao realizar esta “desidratação” em células existe o risco de promover-se perda de qualidade do material submetido ao processo.

Dois desafios são os principais ao pretender-se liofilizar-se espermatozoides ou óvulos. O primeiro é o grau de lesão que se promove à estrutura da célula, seja em nível macroscópico como no nível microscópico e, principalmente, no aspecto Ultraestrutural.

O segundo desafio, ainda mais difícil de verificação, se refere a possibilidade de lesão na estrutura genômica da célula submetida a este processo, ou seja qual a consequência sobre a cadeia do DNA que a desidratação aguda e a exposição a temperaturas limítrofes podem promover nesta delicada e fundamental estrutura celular. A chamada fragmentação do DNA tem consequências graves e importantes em se tratando de gametas a serem utilizados para a obtenção de uma gravidez.

Recentemente um artigo de saúde animal aborda esta questão e tenta instigar pesquisadores a obter a resposta (OLACIREGUI & GIL, 2017).

Nosso estudo pretendeu verificar exatamente estes dois aspectos fundamentais, ou seja, a ultraestrutura dos espermatozoides após a liofilização, utilizando a técnica de microscopia eletrônica de varredura. Também o aspecto de manutenção da integridade do DNA e capacidade funcional do espermatozoide foi avaliado, utilizando os testes de

fragmentação do DNA e avaliação de motilidade (eosina-Negrosina). Em nosso serviço, utilizando de maneira comum o material utilizado em nosso estudo, BOSSI (2016) apresentou tese de doutorado realizando exame de ultraestrutura dos espermatozoides liofilizados através da microscopia eletrônica de transmissão, também realizando espermograma pré e pós liofilização obteve informações da motilidade espermática.

Uma análise de questões fundamentais que envolveram nosso estudo merece uma discussão preliminar. A questão ética envolvida foi bem equacionada desde o aceite dos doadores de espermatozoides para estudo, com explicitação que o material se destinava exclusivamente à pesquisa e sem uso para qualquer processo gerador de reprodução. Outra questão é que a análise não envolveu nenhum processo de fertilização, e, portanto nenhum embrião foi gerado pelos espermatozoides doados. Nossa análise metodológica foi simples, ou seja, avaliamos espermatozoides obtidos por ejaculação em condições ambientais, reavaliamos após criopreservação e nova avaliação após o processo de liofilização. Fizemos uma análise exclusivamente descritiva das características ultra estruturais mais importantes do espermatozoide nos três momentos descritos, ou seja, condição imediata pos ejaculado, após criopreservação e após a liofilização. Comparamos estas análises qualitativas de maneira sistemáticas, envolvendo as mesmas estruturas de análise.

O processo de análise das características funcionais do espermatozoide liofilizado também seguiu este mesmo caminho, ou seja, testamos o espermatozoide após ejaculado, após congelamento e após liofilização. Os testes de fragmentação do DNA e verificação de motilidade foram realizados nestes três momentos.

Em humanos não existe descrição deste tipo de estudo que realizamos, principalmente em relação ao uso da avaliação Ultraestrutural com uso da microscopia eletrônica de varredura e de transmissão. Existem relatos de pesquisa semelhante em espermatozoides de bovinos (MARTINS et al, 2010) e de outros animais (KUSAKABE, 2001).

Um aspecto muito relevante a se destacar é que tanto a liofilização quanto o congelamento apresentam variações conforme o meio de cultura no qual o sêmen estava em conservação. Os chamados crio preservadores exercem papel relevante em atenuar os agravos decorrentes dos processos de congelamento e liofilização.

Além de avaliar o impacto da própria liofilização sobre os espermatozoides humanos, também realizamos uma comparação deste impacto sobre as células reprodutivas na dependência do meio de cultura que se encontravam no momento em que foram crio preservados e, posteriormente, liofilizados. No estudo realizado em nosso grupo de

pesquisa por BOSSI (2016) observou-se importante variação entre os achados na microscopia eletrônica por transmissão nos espermatozoides, conforme o meio de cultivo em que estavam durante o processo de congelamento e liofilização.

Os achados de alterações ultra estruturais ocorreram quase exclusivamente no grupo de espermatozoides liofilizados. 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 crioprotetores, *SpermFreezeMedium* ou *FreezeMedium*, tiveram um alto grau de comprometimento das estruturas espermáticas, principalmente da membrana plasmática.

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 *FreezeMedium* utilizado em nosso estudo é rico em lipoproteína de baixa densidade (LDL), cuja função é proteger os fosfolípides 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.

A microscopia eletrônica se mostrou uma ferramenta valiosa para avaliação da estrutura do espermatozoide liofilizado. Trata-se de procedimento para uso em pesquisas, não se constituindo em rotina assistencial, no entanto, promove correta avaliação dos impactos de processos exógenos em células germinativas como a liofilização estudada em nossa pesquisa. Os métodos tradicionais de avaliação morfológica do espermatozoide não detectam algumas alterações decorrentes do processo de liofilização.

Os achados ultra estruturais quando a liofilização foi realizada em meio de EDTA mostrou resultados mais favoráveis semelhante ao observado por KANEKO & NAKAGATA (2006) e HOCHI *et al* (2008) que utilizando-se uma solução de 1 mM de EDTA 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).

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 *FreezeMedium* era 7,4; o pH do meio de congelamento *SpermFreezeSolution* 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 deoxynucleotidyltransferaseUTPnickendlabeling*) (GORCZYCA *et al*, 1993), Cometa (HUGHES *et al*, 1996), Teste de Dispersão da Cromatina (SCD) (FERNANDEZ *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 nossa pesquisa o Halosperm foi teste de escolha para verificar a fragmentação do DNA espermático.

Estudo utilizando outras técnicas de avaliação da integridade do DNA, como a dispersão da cromatina, foi verificado um permanente alteração da integridade do DNA. No entanto, pela técnica de ICSI, é possível de obter gravidez em alguns animais sem uma aparente alteração genética significativa (OLACIREGUI et al, 2017).

Em nosso estudo 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. GONSÁLVEZ *et al* (2011) observaram um aumento da fragmentação do DNA espermático após congelamento e descongelamento de amostras quando comparadas ao sêmen fresco.

Neste aspecto observamos como efeito mais marcante da liofilização do sêmen humano 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 quebradiço 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 integro.

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.

Merece destacar um achado muito importante e que não foi ainda devidamente estudado. Trata-se de parte do estudo de GIANAROLI *et al* (2012) que verificaram que a liofilização realizada a partir do sêmen fresco apresenta menor grau de alterações morfológicas em relação as amostras que são liofilizadas após processo de congelamento. É possível que a sublimação (passagem da água presente na amostra do estado líquido para gasoso) promovido no sêmen fresco seja menos traumático que a partir do líquido em forma de cristais que esta presente após o congelamento, persistindo parcialmente mesmo após o retorno à temperatura ambiente. Este estudo não teve a devida atenção e continuidade, e a nosso ver poderá auxiliar em muito a continuidade das pesquisas relativas a liofilização de espermatozoide humano e de outros animais. Tanto a liofilização quanto o congelamento apresentam variações conforme o meio de cultura no qual o sêmen estava em conservação. Esta variação mostra o quanto a composição de cada meio influencia na biodinâmica da célula durante congelamento e liofilização. A procura de novos métodos de conservação de células germinativas, em especial os espermatozoides, deve continuar. Nosso estudo se constituiu um passo nesta direção. Os resultados que obtivemos indicam a necessidade de promover a liofilização com novas tecnologias, já disponíveis em processos industriais e biológicos

Sabemos que a célula humana é extremamente sensível aos processos externos que modifiquem sua ambientação. Mudanças de temperatura e condições nutricionais geram processo de stress oxidativo intenso, capaz de lesar ou mesmo matar a célula. Tendência mundial em todos os laboratórios que lidam com as células germinativas é acrescentar aos meios de cultura de manipulação destas células algumas substâncias com ações anti estresse oxidativo. Alguns bons resultados já foram descritos quando se processa a criopreservação destas células com a utilização de vitaminas (E, B9) nos meios de cultura de conservação. No caso da liofilização este mesmo princípio se aplica.

Na nossa análise específica observamos grande impacto na ultraestrutura das células liofilizadas. Analisando por meio de cultura na qual a célula foi submetida ao processo observamos melhores resultados com o uso do EDTA. Este fato nos encoraja a encontrar em novas pesquisas de meios de cultivo que possam atenuar ainda mais o processo da liofilização, podendo idealmente encontrar uma situação de proteção total dos gametas durante o processo de liofilização.

Embora o nosso estudo seja apenas um pequeno passo na caminhada do estabelecimento da liofilização de espermatozoides, certamente será complementado por muitos outros passos que irão cuidar da análise genética e funcional dos espermatozoides liofilizados, utilizando novas técnicas e novas metodologias de proteção celular. A avaliação ultraestrutural do espermatozoide humano após o processo de liofilização é de grande relevância, pois trata-se de uma proposta inédita em estudos científicos.

A pesquisa científica permite ganhos definitivos tanto quanto oferecem resultados favoráveis quanto são absolutos em mostrar resultados adversos. Na nossa pesquisa a lesão absoluta de fragmentação do DNA dos espermatozoides indica que os caminhos que usamos no preparo das amostras e na técnica de liofilização que utilizamos são incompatíveis com o armazenamento dos gametas para uso posterior, portanto não devem fazer parte de nenhuma rotina de banco de sêmen para armazenamento. Isto indica a necessidade de novas pesquisas no que se refere a técnicas diversas de preparo de amostras e nova metodologia de liofilização dos espermatozoides.

CONCLUSÃO

6.1 – Os espermatozoides humanos após serem submetidos a liofilização apresentaram de forma alterações ultra estruturais evidentes, assim como comprometimento da sua capacidade funcional de manter íntegro o DNA nuclear.

6.2 – As alterações ultra estruturais e funcionais observadas apresentaram pequenas variações conforme o meio de cultivo nos quais foram submetidos à liofilização, indicando a necessidade de novos estudos relacionados a técnicas diferentes daquelas que estudamos, na esperança de encontrar-se melhor maneira de proteção para os espermatozoides durante a liofilização.

ANEXOS

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 ira facilitar a preservação de espermatozoides, para todos os homens.

Serão resguardadas a sua identidade e privacidade, sendo consideradas confidenciais todas as informações pessoais. Serão divulgadas apenas os resultados da pesquisa, em eventos medico-científicos ou publicações científicas, sem qualquer identificação dos participantes. Se você não participar ou retirar sua autorização, a qualquer momento, não haverá prejuízo para você.

Eu, _____, após a leitura deste documento, declaro que conversei com o/a pesquisador/a responsável, para esclarecer todas as minhas dúvidas, estando suficientemente informado a respeito dos objetivos da pesquisa, dos possíveis danos ou riscos deles provenientes e da garantia de confidencialidade e de esclarecimentos sempre que desejar. Declaro estar ciente de que a participação no estudo é voluntária e que não farei jus a nenhum tipo de remuneração ou indenização ao final da pesquisa, sendo a revogação deste consentimento permitida a qualquer tempo, por escrito, mediante recibo, sem qualquer penalidade. Diante do exposto, expresso minha concordância de espontânea vontade em participar deste

estudo e permito ao pesquisador a utilização dos dados obtidos, para serem incluídos na pesquisa, sem que isso implique na minha identificação.

ASS. participante.....

ASS. pesquisador:.....

SelmoGeber (tel: 34099764) CRM: 22188

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

DATA: ____/____/____

BELO HORIZONTE – MG

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: IMPACTO DA TÉCNICA DE LIOFILIZAÇÃO NA PRESERVAÇÃO DE ESPERMATOZOÍDES 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

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 espermatozoides

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

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

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

Continuação do Parecer: 743.984

posteriormente, não existem riscos relacionados.

Benefícios:

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

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

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

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatória foram apresentadas

Recomendações:

Não há recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado segundo parecer.

Continuação do Parecer: 743.984

BELO HORIZONTE, 08 de Agosto de 2014

Assinado por:
Telma Campos Medeiros Lorentz
(Coordenador)

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. **FertilSteril**.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.
- BOSSI, R -ANÁLISE DA ULTRAESTRUTURA DO ESPERMATOZOIDE HUMANO APÓS LIOFILIZAÇÃO. (Tese Doutorado – UFMG, 2016).
- BOZZOLA, J.J. & RUSSELL, L.D. **Electron Microscopy: Principles and Techniques for Biologists**. 2a 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. **FertilSteril**. v.5, n.6, p.520-9,1954.
- CANOVAS, S.; COY, P. Aspectos moleculares de la fecundación: unión y fusión de gametos. **Revista de investigación clínica**, v.60, p.403-413, 2008.
- CHAVEZ, F - Microscópio eletrônico de varredura, SEM, Seminário para o curso técnicas para caracterização em microeletrônica,1991.
- 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.
- CHOI YH, VARNER DD, HARTMAN DL, HINRICHS K-Blastocyst production from equine oocytes fertilized byintracytoplasmic injection of lyophilized sperm **Animal Reproduction Science** 94: 307–308, 2006.

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.**HumReprod 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. **ExpCell 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. **FertilSteril.** v.84, n.4, p.846-9, 2005.

FABBRI, R., P. CIOTTI AND B. DI TOMMASO.Tecniche di crioconservazione riproduttiva. **Rivista Italiana diOstetricia e Ginecologia.** v.3, p. 33–41, 2004.

FLESCH, M.F.; GADELLA B.M. Dynamic of the mammalian sperm plasma membrane in the processo of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta,** v.1469, p.197-235, 2000.

FRANKEN D.R, OEHNINGER S. Semen analysis and sperm function testing. **Asian J Androl.**v.14, n.1, p.6-13, 2012.

GADDA F,SPINELLI MG, COZZI G, PAFFONI A, CARMIGNANI L, ROCCO F - Emergency testicular sperm extraction after scrotal trauma in a patient with a history of contralateral orchiopexy for cryptorchidism: case report and review of the literature. **Fertility and Sterility®** Vol. 97, No. 5, May 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. **FertilSteril.**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. **MolReprod Dev.** v.75, n.5, p.890-4, 2008.
- HOLT, W. V., VAN LOOK, K.J.W. Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory tests of semen quality. **Reproduction.** v.127, p.527-535, 2004.
- 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.
- 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. **MolReprod 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. *etal.*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. *etal.*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. **JDairySci.**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. **BiolReprod.** 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. **BiolReprod.**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. **BiolReprod**.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. **JReprod Dev**. v.57, n.2, p.176-82, 2011.
- KAWASE Y. *et al.* Possibility of long-term preservation of freeze-dried mouse spermatozoa. **BiolReprod**.v.72, n.3, p.568-73, 2005.
- KLEN R- Biological principles of tissue banking. England, Pergamon Press, Oxford, 1982.
- KUSAKABE H. *et al.* Maintenance of genetic integrity in frozen and freeze-dried mouse spermatozoa. **ProcNatlAcadSci 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. **BiolReprod**.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. **BiolReprod**. 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. **BiochemBiophys Res Commun**. v. 328, n.4, p.824-30, 2005.

LOI P, D. IUSO, M. CZERNIK, F. ZACCHINI, and G. PTAK - Towards storage of cells and gametes in dry form. *Trends in Biotechnology*, Vol. 31, No. 12, 2013.

LUYET B, HODAPP EL - Revival of frog's spermatozoa vitrified in liquid air. *Proc Soc Exp Biol Med* 39:433–435, 1938.

MALISKA AM - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA - UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA – UFSC, 2001.

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.

MARTINS CF, DODE MN, BÁO MS and RUMPF R - The use of the acridine orange test and the TUNEL assay to assess the integrity of freeze-dried bovine spermatozoa DNA. ***Genetics and Molecular Research*** 6 (1): 94-104 ,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.

MORETTI E, COLLODEL G - Electron microscopy in the study of human sperm pathologies Department of Biomedical Sciences, Applied Biology Section 2 Interdepartmental Centre for Research and Therapy of Male Infertility, University of Siena, viale Bracci, Ospedale Santa Maria alle Scotte, Siena

Current Microscopy Contributions to Advances in Science and Technology (A. Méndez-Vilas, Ed. 2010)-

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.

OLACIREGUI, M, GIL, L- Freeze-dried spermatozoa: A future tool? **Reprod Domest Anim**.;52 Suppl 2:248-254, 2017

OLACIREGUI M, LUÑO V, DOMINGO P, GONZÁLEZ N, GIL L.-In vitro developmental ability of ovine oocytes following intracytoplasmic injection with freeze-dried spermatozoa. **Sci Rep**. Apr 24;7(1):1096, 2017

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. **Adv Exp 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

Reimer L - Scanning Electron Microscopy, Physics of Image Formation and Microanalysis, Springer-Verlag, 1985.

ROWE AW, RINFRET A - Controlled rate freezing of bone marrow. **Blood** 20:636, 1962

ROWE AW, EYSTER E, KELLNER A - Liquid nitrogen preservation of red blood cells for transfusion. **Cryobiology** 5:119-128, 1968.

SAJIO S- Transfusion and transplantation of cryopreserved cells and tissues. **CellTissueBanking**7:265–305, 2006.

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

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

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

SHERMAN JK - Synopsis of the use of frozen human semen since 1964: state of the art of human semen banking. **Fertil Steril**24:397, 1973.

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**, P-337. 2011.

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. **FertilSteril**, v. 8, p. 8, Jan. 2009.

THORNTON PR - Scanning Electron Microscopy, Applications to materials and device science, **Chapman and Hall Ltd**,1968.

UEHARA T., YANAGIMACHI R. Microsurgical injection of spermatozoa into hamster eggs with subsequent transformation of sperm nuclei into male pronuclei. **BiolReprod.**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. **FertilSteril,** 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. **NatBiotechnol.**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. **FertilSteril.**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. **BiolReprod.**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. **FertilSteril.**v.94, n.3, p.1027-32, 2010.

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