

Universidade Federal de Minas Gerais

Faculdade de Medicina

**Relação entre dosagem de glicose e proteínas
totais no plasma seminal e a sobrevivência dos
espermatozóides ao congelamento e
descongelamento**

Belo Horizonte

2013

SÉPHORA AUGUSTA CARDOSO QUEIROZ

**RELAÇÃO ENTRE DOSAGEM DE GLICOSE E PROTEÍNAS TOTAIS NO
PLASMA SEMINAL E A SOBREVIVÊNCIA DOS ESPERMATOZÓIDES AO
CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher da Universidade Federal de Minas Gerais, sub-área Patologia Ginecológica e Reprodução, para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Marcos dos Reis

Q3r Queiroz, Séphora Augusta Cardoso.
Relação entre dosagem de glicose e proteínas totais no plasma seminal e a sobrevivência dos espermatozóides ao congelamento e descongelamento [manuscrito]. / Séphora Augusta Cardoso Queiroz. - - Belo Horizonte: 2013.
59f.: il.
Orientador: Fernando Marcos dos Reis.
Área de concentração: Saúde da Mulher.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Infertilidade. 2. Sêmen. 3. Criopreservação. 4. Congelamento. 5. Recuperação Espermática. 6. Glucose. 7. Proteínas. 8. Dissertações Acadêmicas. I. Reis, Fernando Marcos dos. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. III. Título.

NLM: WP 570

Agradecimentos

Ao meu orientador Prof. Dr. Fernando Marcos dos Reis, pela confiança, oportunidade, orientação clara e paciente tão determinantes na construção do meu aprendizado.

Ao Prof. Aroldo Fernando Camargos, por todo estímulo ao longo destes anos.

À Dra. Cláudia Navarro, mentora que me incentivou a trilhar o caminho do conhecimento, obrigada por acreditar em mim.

Ao meu esposo, Jardel Mendes Queiroz e minha filha Júlia por me apoiarem em todos os desafios, entenderem minhas ausências e preencherem de amor e cuidado toda a minha existência.

À minha família, meus pais Dimas e Léia, minhas irmãs Mélody e Mônica, Dona Ormindia e Jaqueline, por realizar o mutirão mais bonito que já presenciei em minha vida para que este mestrado fosse possível, agradeço o esforço e carinho.

Aos amigos Simone e Marco Aurélio, pelo acolhimento sincero, a alegria do convívio, a disponibilidade e paciência no laboratório.

À equipe do Laboratório de Reprodução Humana Prof. Aroldo Fernando Camargos pelo apoio e amizade que tornaram gratificante o convívio dos últimos anos.

Sumário

AGRADECIMENTOS	IV
SUMÁRIO	V
LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE TABELAS	IX
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS	X
RESUMO	XI
ABSTRACT	XII
1 INTRODUÇÃO	13
1.1 REPRODUÇÃO HUMANA	13
1.2 INFERTILIDADE MASCULINA.....	14
1.3 TERAPIA DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA.....	15
1.4 ESPERMOGRAMA: VALORES DE REFERÊNCIA E SUA RELEVÂNCIA NO DIAGNÓSTICO DE INFERTILIDADE MASCULINA.....	16
1.5 BANCO DE SÊMEN	17
1.5.1 Banco de sêmen terapêutico.....	17
1.5.2 Banco de sêmen de doadores.....	18
1.6 TERAPIA DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA COM UTILIZAÇÃO DE ESPERMATOZÓIDES CRIOPRESERVADOS	19
1.7 CRIOPRESERVAÇÃO DE ESPERMATOZÓIDES	20
1.8 MARCADORES DE CRIOSOBREVIVÊNCIA ESPERMÁTICA.....	21
1.8.1 Marcadores de criossobrevivência já estudados.....	22
1.8.2 Proteínas seminais.....	22
1.8.3 Glicose seminal	23
1.9 FITAS REAGENTES	23

2	JUSTIFICATIVA	25
3	OBJETIVO	27
4	MÉTODO	28
4.1	TIPO DE ESTUDO	28
4.2	POPULAÇÃO ESTUDADA	28
4.3	COLETA, ANÁLISE E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	29
4.3.1	Espermograma	30
4.3.2	Dosagem de proteínas	30
4.3.3	Dosagem de glicose	31
4.3.4	Congelamento e descongelamento	31
4.4	DUPLO-CEGO	32
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA E CÁLCULO AMOSTRAL	32
5	RESULTADOS	33
5.1	DESCRIÇÃO E COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS ESTUDADOS	33
5.2	CORRELAÇÃO ENTRE PARÂMETROS SEMINAIS E CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS NOS GRUPOS ESTUDADOS	35
5.3	CORRELAÇÃO ENTRE PARÂMETROS SEMINAIS E CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE NOS GRUPOS ESTUDADOS	37
5.4	ANÁLISE DAS CONCENTRAÇÕES SEMINAIS DE PROTEÍNAS EM RELAÇÃO AOS DESFECHOS DA CRIOPRESERVAÇÃO	39
5.5	ANÁLISE DAS CONCENTRAÇÕES SEMINAIS DE GLICOSE EM RELAÇÃO AOS DESFECHOS DA CRIOPRESERVAÇÃO	42
6	DISCUSSÃO	44
6.1	CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS ESTUDADOS	44
6.2	CORRELAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES SEMINAIS DE PROTEÍNAS E PARÂMETROS QUANTITATIVOS DO SÊMEN FRESCO E DA AMOSTRA CRIOPRESERVADA	45
6.3	CORRELAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES SEMINAIS DE GLICOSE E PARÂMETROS QUANTITATIVOS DO SÊMEN FRESCO E DA AMOSTRA CRIOPRESERVADA	46

6.4	COMPARAÇÃO ENTRE DOSAGENS DE PROTEÍNAS SEMINIAS E RECUPERAÇÃO ESPERMÁTICA PÓS CRIOPRESERVAÇÃO	46
6.5	COMPARAÇÃO ENTRE DOSAGENS DE GLICOSE SEMINIAS E RECUPERAÇÃO ESPERMÁTICA PÓS CRIOPRESERVAÇÃO	47
7	CONCLUSÃO	48
8	REFERÊNCIAS.....	49
9	ANEXO 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	57
10	ANEXO 2 - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	58
11	ANEXO 3 - ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO	59
12	ANEXO 4 - FOLHA DE APROVAÇÃO	60

Lista de Figuras

- FIGURA 1 - (A) RECUPERAÇÃO DE ESPERMATOZÓIDES MÓVEIS VS. CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS NO SÊMEN. (B) RECUPERAÇÃO DE ESPERMATOZÓIDES MÓVEIS PROGRESSIVOS VS. CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS NO SÊMEN. (C) RECUPERAÇÃO DE ESPERMATOZÓIDES VIVOS VS. CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS NO SÊMEN.....40
- FIGURA 2 - PROBABILIDADE DE RECUPERAR PELO MENOS 50% DOS ESPERMATOZÓIDES VIVOS CRIOPRESERVADOS EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO SEMINAL DE PROTEÍNAS41
- FIGURA 3 - (A) RECUPERAÇÃO DE ESPERMATOZÓIDES MÓVEIS VS. TERCIL DE CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE NO SÊMEN, (B) RECUPERAÇÃO DE ESPERMATOZÓIDES MÓVEIS PROGRESSIVOS VS. TERCIL DE CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE NO SÊMEN , (C) RECUPERAÇÃO DE ESPERMATOZÓIDES VIVOS VS. TERCIL DE CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE NO SÊMEN.....43

Lista de Tabelas

TABELA 1 - CARACTERIZAÇÃO DOS DOIS GRUPOS DE PACIENTES	34
TABELA 2 - MATRIZ DE CORRELAÇÃO LINEAR ENTRE AS CONCENTRAÇÕES SEMINAIS DE PROTEÍNAS E OS DEMAIS PARÂMETROS QUANTITATIVOS DO SÊMEN FRESCO E DA AMOSTRA CRIOPRESERVADA.....	36
TABELA 3 - MATRIZ DE CORRELAÇÃO LINEAR ENTRE AS CONCENTRAÇÕES SEMINAIS DE GLICOSE E OS DEMAIS PARÂMETROS QUANTITATIVOS DO SÊMEN FRESCO E DA AMOSTRA CRIOPRESERVADA.....	38

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Siglas

% = percentual

°C = graus centígrados

AMH = hormônio anti-Mulleriano

DNA = ácido desoxirribonucléico

Fator Rh = fator Rhesus

FIV = fertilização in vitro

HBA = hyaluronan binding assay

ICSI = injeção intracitoplasmática de espermatozoide

IUI = inseminação intrauterina

mL = mililitro(s)

OMS = Organização Mundial de Saúde

ROC = Receiver Operator Characteristic Curve

SPZ = espermatozóide(s)

TRA = terapia(s) de reprodução assistida

Tyb-G = Test Yolk Buffer with Gentamicine and 12% Glycerol

VR = valor(es) de referência

vs. = versus

Resumo

O processo de congelamento / descongelamento causa graves modificações estruturais e funcionais em amostras de espermatozoides (SPZ). A presença de glicose e proteínas no plasma seminal é importante para correção destes danos. Vários testes já foram propostos para prever a criossobrevivência de SPZ, porém os métodos atuais são dispendiosos e requerem maior tempo para serem realizados. O objetivo deste estudo foi correlacionar o valor das dosagens seminais de glicose e proteínas pré-congelamento através de fitas reagentes e sua relação com as taxas de criossobrevivência de SPZ. As amostras seminais foram analisadas quanto aos parâmetros do espermograma preconizados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e foram dosadas as concentrações de glicose (fitas reagentes de glicosímetro) e proteínas (fitas reagentes de urianálise). Cada amostra foi então criopreservada (meio Tyb-G= Test Yolk Buffer with Gentamicine and 12% glycerol / N₂=nitrogênio líquido). Após descongelamento (37°C / 10 minutos), a vitalidade e motilidade dos SPZ foram avaliadas. Nas amostras com maior concentração de proteínas (≥ 20 g/dL, +++) a taxa de recuperação de espermatozoides vivos foi na mediana 74% (intervalo inter-quartil 55-98%) e nas amostras com menor concentração de proteínas (≤ 1 g/dL, -/+) a mesma taxa ficou em 42% (26-73%, $p < 0,05$). Entretanto, não houve associação significativa entre a concentração de glicose e a recuperação espermática pós-congelamento. Em conclusão, o presente estudo demonstrou que a dosagem seminal de glicose não prediz a recuperação de SPZ criopreservados. Porém, quanto maior for a concentração de proteínas seminais, maior será a taxa de recuperação de espermatozoides vivos.

Palavras- chave: infertilidade, sêmen, congelamento, criopreservação, recuperação espermática, proteína, glicose, fitas reagentes, glicosímetro, urianálise.

Abstract

The process of freezing / thawing causes serious structural and functional modifications in samples of spermatozoa (SPZ). The presence of glucose and proteins in the seminal plasma is important for correction of these damages. Several tests have been proposed to predict the post-thaw recovery of SPZ, however the current methods are expensive and time-consuming. The aim of this study was to assess the value of semen glucose and protein measurements through dipstick before freezing to predict post-thaw recovery of SPZ. The seminal samples were analysed according the World Health Organization (WHO) guideline and cryopreserved in Tyb-G = Test Yolk Buffer with Gentamicine and 12 % glycerol / N₂=nitrogene liquid for an average of 120 days. After thawing (37°C / 10 minutes), the vitality and mobility of the SPZ were analysed. In the samples with higher protein concentration ($\geq 20\text{g/dL}$, +++) the median recovery rate of live sperm was 74% (interquartile range 55-98%), whereas in the samples with lower protein concentration ($\leq 1\text{g / dL}$ - / +) it was only 42% (26-73%, $p < 0.05$). Conversely, seminal glucose concentrations were not associated with sperm recovery rates. In conclusion, seminal levels of glucose did not predict sperm recovery. However, the higher the levels of seminal proteins in the fresh sperm sample, the higher the rate of live sperm recovery after cryopreservation.

Key-Words: infertility, semen, freezing, cryopreservation, sperm recovery, protein, glucose, dipstick, glucosimeter, urinalysis.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Reprodução humana

Ao longo dos tempos a capacidade do ser humano de se reproduzir foi ganhando novas dimensões e deixando seu aspecto puramente biológico de preservação da espécie.

O Papiro Kahun, encontrado no Egito em 1889 e datado de 1825 a. C., discorre em seus 34 parágrafos sobre diagnóstico de infertilidade e métodos para melhorar a concepção e desordens reprodutivas, demonstrando assim, que a preocupação social de se manter e melhorar a fertilidade do casal por motivos políticos, econômicos, religiosos ou emocionais é constante ao longo dos séculos na espécie humana (1).

Após a Segunda Guerra Mundial, o comportamento do casal frente à paternidade sofreu drásticas modificações. A inserção maciça da mulher no mercado de trabalho fez com que o advento de um filho fosse cada vez mais postergado (2). Esse fato, somado à liberdade sexual conquistada pela sociedade nas últimas décadas, levou a um aumento da exposição do indivíduo a fatores que levam ao declínio da sua fertilidade (3), tais como doenças sexualmente transmissíveis, doenças crônicas, abusos de álcool e tabaco, manifestação de doenças genéticas ou oncológicas.

A fecundabilidade, ou seja, a probabilidade de um único ciclo menstrual resultar em gravidez, na espécie humana está entre 20 a 25%. O padrão de distribuição da fecundabilidade na espécie humana é cumulativo ao longo dos meses, assim, ao final de 12 meses 84% dos casais conceberão, 92% dos casais conceberão ao final de 24 meses e 93% dos casais conceberão ao final de 36 meses.

Para aqueles que não conseguem alcançar o objetivo da concepção fica o estigma do medo da esterilidade que muitas vezes é confundida com infertilidade.

A infertilidade é definida como a incapacidade de obter uma gravidez após 12 meses de relações sexuais desprotegidas e regulares, enquanto a esterilidade tem por definição a incapacidade de concepção (3). A infertilidade conjugal atinge 10-15% dos casais na atualidade e as causas mais comuns são distribuídas entre fatores etiológicos que variam de acordo com a população estudada. Segundo a American Society for Reproductive Medicine (ASRM), nos Estados Unidos os fatores femininos são responsáveis por 50% dos casos de infertilidade, 35% dos casos são causados por fatores masculinos e 15% por casos de infertilidade sem causa aparente. Na Inglaterra a prevalência destes fatores segundo o Royal College of Obstetricians and Gynaecologists (RCOG) é: fatores femininos (41%), fatores masculinos (19%), sem causa aparente (30%). No Brasil ainda não há uma avaliação adequada da prevalência desses fatores na população (1).

1.2 Infertilidade masculina

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define infertilidade por fator masculino como um ou mais valores alterados na análise seminal (espermograma) ou função sexual e ejaculatória inadequada (3).

O declínio da taxa de concepção é visto a partir dos 30 anos na população em geral e principalmente após os 35 anos em mulheres (1). Embora os parâmetros seminais declinem após 35 anos, a fertilidade masculina declina apreciavelmente somente após os 50 anos (4). Esse declínio pode ser causado pela idade apenas ou ser secundário a fatores cumulativos relacionados à idade, como doenças vasculares, acúmulo de substâncias tóxicas e infecções (3).

A avaliação do fator masculino da infertilidade tem como objetivo classificar o indivíduo em grupos e orientar o curso do tratamento (5), sendo importante principalmente para aqueles que necessitam de terapia de reprodução assistida (TRA) com utilização de sêmen autólogo ou sêmen de doador.

1.3 Terapia de reprodução assistida

Em meados do século XVIII surgiram as primeiras técnicas de tratamento de infertilidade, inicialmente com inseminações intrauterinas (IIU) até que duzentos anos mais tarde a primeira transferência de embrião resultando em gravidez foi realizada e o nascimento de Louise Brown em 1978, na Inglaterra marcou o sucesso das terapias de reprodução assistida (1).

O termo terapia de reprodução assistida se refere apenas aos procedimentos em que o uso da tecnologia da medicina moderna é necessária para facilitar o encontro do óvulo com o espermatozóide (SPZ) e se refere aos tratamentos de Inseminação Intrauterina (IIU), Fertilização *in vitro* (FIV) e Injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI) (1).

Nos casais com infertilidade por fator masculino, a IIU está indicada para casos de alterações leves (oligoastenozoospermia leve) e impossibilidade de ejaculação vaginal, podendo ser utilizadas as amostras de sêmen a fresco ou após descongelamento. A IIU consiste na injeção de SPZ previamente selecionados e separados do plasma seminal, dentro da cavidade uterina em fase ovulatória. Desta forma, a fertilização ocorre de maneira natural no trato reprodutivo feminino.

Na FIV convencional um oócito é colocado em uma placa com aproximadamente 50 a 100 mil SPZ e a fertilização ocorre através da penetração espontânea do SPZ no oócito com a formação do embrião que posteriormente é transferido para o útero. Além das indicações por fatores femininos, essa técnica é utilizada para indivíduos com contagem de SPZ após beneficiamento entre 2 e 5 milhões por mililitro (mL) (1).

Na ICSI um único SPZ é injetado diretamente no citoplasma de cada oócito e o embrião formado é transferido para o útero. Essa técnica revolucionou o tratamento da infertilidade masculina, pois beneficiou uma vasta gama de causas de infertilidade em que a contagem de SPZ é muito baixa.

1.4 Espermograma: valores de referência e sua relevância no diagnóstico de infertilidade masculina

O espermograma é constituído por um conjunto de parâmetros que afere de forma indireta a função do sistema reprodutor masculino, desde a espermatogênese até a função das vesículas seminais e da próstata.

A técnica de análise e os valores de referência (VR) são definidos pela OMS sendo os VR descritos como limites mínimos (percentil 5) e seus intervalos de 95% de confiança (6).

- Volume: 1.5 (1.4–1.7) mL
- Concentração espermática: 15 (12–16) milhões/mL
- Contagem total de SPZ: 39 (33–46) milhões/ejaculado
- Motilidade total: 40 (38–42) %
- Motilidade progressiva: 32 (31–34) %
- Morfologia estrita normal: 4 (3–4) %
- Vitalidade: 58 (55–63) %

Vale ressaltar que esses VR publicados pela OMS em 2010 foram obtidos através de um estudo com 4500 homens de 14 países cujas parceiras engravidaram dentro de 12 meses após interrupção de método contraceptivo (6). Não se trata de uma avaliação direta da fertilidade masculina mas da avaliação das características objetivas avaliadas em uma amostra seminal. Desta forma os VR para análises seminais não são os mesmos que os valores mínimos exigidos para concepção na prática clínica, assim, valores normais não asseguram fertilidade e valores anormais não implicam em infertilidade (3)(7).

A qualidade da amostra seminal seria melhor definida pela capacidade dos SPZ de realizar todas as etapas que lhe competem no processo de reprodução para a obtenção de uma gestação de sucesso. Para isso, seria importante a avaliação das várias características dos SPZ necessárias para a realização deste processo: integridade genética e morfológica, motilidade, capacidade de realizar reação acrossômica, penetrar e fecundar o oócito. Diversos são os testes disponíveis para a

avaliação de cada uma dessas características, todos com vantagens, limitações e indicações específicas (6). Na prática clínica, os três parâmetros mais utilizados para avaliação da qualidade da amostra seminal são: morfologia, concentração e motilidade espermática.

1.5 Banco de sêmen

Os bancos de sêmen são indicados em casos de azoospermia, oligospermia grave, doenças genéticas (doença de Huntington, hemofilia, anomalias cromossômicas), isoimunização Rh grave com marido Rh positivo, falhas de fertilização durante TRA, oligoastenozoospermia sem desejo ou disponibilidade de ICSI e mulheres sem parceiros masculinos (7)(8).

Os bancos de sêmen podem ser subdivididos em terapêuticos, quando há a preservação de SPZ para uso do próprio indivíduo (homólogo), ou de doadores, quando há a preservação de SPZ para uso de terceiros (heterólogo).

1.5.1 Banco de sêmen terapêutico

As principais indicações para a utilização homóloga de SPZ, são:

- Pré-tratamentos gonadotóxicos (quimioterapia e/ou radioterapia): as células germinativas são muito vulneráveis à terapia citotóxica, uma vez que estão em constante multiplicação (9). O comprometimento da espermatogênese pela terapia citotóxica resulta em alterações não apenas no número, mas também na motilidade, morfologia e integridade do DNA do espermatozóide. Portanto, idealmente, a coleta dos SPZ deve ocorrer antes do início do tratamento (10).
- Pós-punção de epidídimo / biópsia testicular: Em casos de azoospermia, os SPZ recuperados do epidídimo ou testículo, tanto em procedimentos diagnósticos quanto terapêuticos, poderão ser criopreservados para posterior utilização em TRA. Para amostras com contagem e/ou motilidade espermáticas reduzidas podem ser

utilizadas técnicas especiais de criopreservação de pequeno número de SPZ (11).

- Pós-recuperação de SPZ na urina: Em pacientes portadores de ejaculação retrógrada cuja obtenção de SPZ do ejaculado não é viável, estes podem ser recuperados através de pesquisa de SPZ na urina pós-ejaculação e utilizados a fresco em Técnicas de Reprodução Assistida (TRA) ou criopreservados para utilização posterior (12).
- Pré-vasectomia: A vasectomia é um método de esterilização masculina. No entanto, homens vasectomizados que apresentam o desejo de ter mais filhos podem recorrer à reversão cirúrgica da mesma. Durante o procedimento, podem-se obter SPZ para criopreservação e posterior utilização em TRA, considerando-se a possibilidade de falha da reversão. Entretanto, o momento ideal para criopreservação dos SPZ é antes da realização da vasectomia, quando várias amostras de sêmen fresco podem ser obtidas por masturbação.

1.5.2 Banco de sêmen de doadores

O armazenamento de SPZ para utilização heteróloga tem as seguintes indicações:

- Infertilidade por fator masculino grave: Casais com infertilidade por fator masculino grave que recorrem a TRA quase sempre são candidatos a FIV/ICSI, uma vez que, nestes casos, os SPZ recuperados geralmente estão em número reduzido e com baixa motilidade. Algumas vezes não se consegue obter SPZ próprios para TRA. Estes casais podem se beneficiar da TRA com utilização de sêmen de doador. Neste caso, se não houver fator feminino que contraindique a IIU, esta técnica (mais simples, de menor custo e com menos efeitos colaterais) poderá ser utilizada com amostra de sêmen de doador de boa qualidade.

- Casos específicos de isoimunização: Em algumas mulheres previamente imunizadas contra o fator Rhesus (Rh) o risco de doença hemolítica grave e morte do concepto Rh positivo é tão alto que pode haver indicação de utilização de sêmen de doador Rh negativo quando o parceiro for do grupo sanguíneo Rh positivo.
- Algumas doenças hereditárias: Quando o homem é portador de alterações genéticas que são transmitidas ao concepto através do SPZ, o casal pode optar pela utilização de sêmen de doador, uma vez que este passa por uma rigorosa triagem, que elimina os candidatos portadores ou considerados de risco para doenças genéticas.
- Casais homoafetivos femininos: Casais homoafetivos femininos que desejam filhos podem recorrer à TRA com utilização de sêmen de doador em uma das parceiras.

1.6 Terapia de reprodução assistida com utilização de espermatozoides criopreservados

A avaliação das taxas de gravidez em TRA com uso de sêmen criopreservado de pacientes com câncer tem demonstrado índices de sucesso satisfatórios (13).

Quando se realiza ICSI, parece não haver diferença significativa entre SPZ frescos e criopreservados (14). Ao se comparar os resultados da ICSI com uso de SPZ testicular móvel/imóvel, fresco/congelado, podem ser encontradas taxas de fertilização semelhantes (15). Quando se recuperam SPZ móveis por biópsia testicular, boas taxas de fertilização e gravidez podem ser obtidas, sem diferença quanto à utilização de SPZ frescos ou congelados (16).

Quando se realiza IIU com SPZ criopreservados, a probabilidade de gravidez pode ser até três vezes menor que com SPZ frescos (14). As chances de sucesso da IIU com SPZ criopreservados são maiores quando o número de SPZ

móveis inseminado é maior que 20 milhões (5). Portanto, após o descongelamento, o número de SPZ móveis da amostra deve ser determinado e, se necessário, outras alíquotas devem ser descongeladas, com o objetivo de se obter número suficiente de SPZ móveis para serem inseminados.

As amostras de sêmen doadas, habitualmente, são divididas em alíquotas que são criopreservadas para posterior utilização. A qualidade destas alíquotas no momento de sua utilização é muito variável, uma vez que os danos causados aos SPZ durante os processos de congelamento e descongelamento são imprevisíveis (17). Foi demonstrada uma variação de até 10 vezes entre o número de SPZ móveis das alíquotas descongeladas de doadores (18).

1.7 Criopreservação de espermatozóides

As amostras congeladas podem ser criopreservadas por tempo indeterminado. Como o processo de congelamento e descongelamento causa danos aos SPZ, a possibilidade de não haver recuperação de SPZ viáveis deve ser considerada, principalmente em casos de amostras com contagem e/ou motilidade espermáticas muito reduzidas (19).

Com o objetivo de minimizar os danos causados aos SPZ, vários protocolos de congelamento e descongelamento têm sido propostos(20), dentre eles:

- Congelamento rápido: a amostra é colocada na fase de vapor por 10 minutos, em seguida é imersa em Nitrogênio líquido a -196°C .
- Congelamento lento: a amostra é gradualmente resfriada utilizando-se uma máquina de congelamento automática programável, a uma velocidade de resfriamento de 1 a $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$.
- Descongelamento rápido: 37°C por 5-10 min.
- Descongelamento lento: temperatura ambiente por 30-60 minutos.

Para redução do dano celular e obtenção de melhores taxas de recuperação espermática, o descongelamento deve ser realizado levando-se em consideração o tipo de congelamento, ou seja, se foi realizado congelamento rápido, deve-se optar

pelo descongelamento rápido e vice-versa. Mesmo assim, a taxa de recuperação espermática após o descongelamento encontra-se, em média, em torno de 25 - 50%(17)(21).

A taxa média de 25 - 50% de recuperação espermática é utilizada como critério de seleção das amostras doadas aos bancos de sêmen.

1.8 Marcadores de criossobrevivência espermática

A sobrevivência espermática após congelamento e descongelamento nem sempre pode ser relacionada à qualidade do sêmen fresco segundo os parâmetros recomendados pela OMS. Amostras seminais de um único doador com parâmetros similares podem ter diferentes padrões de sobrevivência de SPZ(22).

Apesar de diversos esforços para se estudar a relação entre a sobrevivência de SPZ e as características químicas e físicas do plasma seminal, os resultados não têm aplicação na prática laboratorial(22).

O avanço do conhecimento de melhores marcadores de recuperação espermática pós-descongelamento é essencial para a otimização do uso de amostras de sêmen de doadores nos casos em que as amostras são extremamente valiosas como para os pacientes que se submeterão à quimioterapia ou biópsias testiculares(23)(1)(3)(8).

A identificação de marcadores de criossobrevivência espermática pode ajudar na elaboração de meios de congelamento mais adequados, métodos de congelamento menos traumáticos, assim como prever os resultados pós-descongelamento(22). A predição dos resultados pós-descongelamento é útil na seleção e recrutamento de doadores e na decisão de quantas amostras devem ser coletadas para cada indivíduo, em quantas alíquotas as amostras de sêmen podem ser divididas e qual a melhor técnica de TRA a ser utilizadas após descongelamento.

1.8.1 Marcadores de criossobrevivência já estudados

A concentração seminal de colesterol apresenta correlação com a estabilização da membrana plasmática dos SPZ de animais durante o congelamento, entretanto não apresenta correlação com a recuperação de SPZ em humanos(22)(24).

A concentração seminal de cálcio apresenta fraca correlação negativa com a recuperação de SPZ após descongelamento(22)(25).

Os testes de avaliação de ácido hialurônico no plasma seminal avaliam bem a maturidade dos SPZ apresentando boa correlação com motilidade e morfologia do sêmen fresco, mas os resultados não se repetem nos estudos após congelamento e descongelamento(23).

1.8.2 Proteínas seminais

As proteínas do plasma seminal têm seu valor estabelecido na manutenção da fertilidade de amostras congeladas de sêmen.

Um grande número de proteínas como a semenogelina, serina protease, antígeno específico prostático, clusterina, libronectina, proteína indutora de prolactina e lactoferrina foram identificadas como adjuvantes na infertilidade masculina(26).

As proteínas desempenham diversos papéis e são utilizadas no processo de descongelamento reparando parcialmente as alterações da membrana do espermatozóide(27)(28). Essa reparação tem relação direta com a concentração de proteínas no plasma seminal(29). Dentre estas proteínas encontram-se enzimas antioxidantes que preservam os lípidos de membrana contra o estresse oxidativo do congelamento(30)(31). As proteínas do plasma seminal também são responsáveis por um menor efeito mimético de capacitação acrossômica do SPZ que é induzido pelo congelamento e que é causa de infertilidade em amostras seminais consideradas férteis pré-congelamento(32)(33).

A recuperação de SPZ congelados e descongelados foi maior quando estes foram congelados com proteínas do plasma seminal ao invés de proteínas exógenas(28)(29)(34)(35)(36).

1.8.3 Glicose seminal

Mais da metade dos açúcares consumidos pelos SPZ estão na forma de glicose (37). A glicose tem papel significativo na motilidade espermática e no aumento do número de reações acrossômicas durante o processo de capacitação (38), sua concentração no plasma seminal está diretamente relacionada com altas taxas de fertilização(39). Por isso, a adição de glicose exógena ao sêmen fresco aumenta a motilidade, a vitalidade e o potencial de membrana mitocondrial (40)(41).

1.9 Fitas reagentes

Os esforços para dosar marcadores bioquímicos no plasma seminal com o intuito de prever a recuperação de SPZ após criopreservação geralmente utilizam métodos dispendiosos, com utilização de equipamentos e reagentes de alto custo e necessidade de pessoal altamente treinado e qualificado, além de serem morosos em sua realização.

As fitas reagentes são comumente encontradas no mercado a preços muito acessíveis e sua utilização não necessita de treinamento prévio. Além do fato de que sua leitura e análise de resultado é quase imediata.

No que se refere ao cotidiano de laboratórios de reprodução humana e bancos de sêmen, a utilização de um método rápido, com boa sensibilidade e especificidade, e que apresente baixo custo para identificação de marcadores de sobrevivência espermática, é o ideal para ser inserido na rotina de suas análises seminais.

Baseado no exposto acima, dosar glicose e proteínas totais no líquido seminal de maneira prática e rápida pode ter valor preditivo da criossobrevivência espermática.

Embora já tenha sido demonstrado que a presença de sêmen contaminante na urina é lida em fitas reagentes de urianálise (42)(43), o seu uso para análise de sêmen ainda não havia sido testado até a presente data.

Partindo da hipótese de que é possível medir glicose no líquido seminal através de fita reagente, a aferição quantitativa direta no sêmen através de glicosímetros mostra-se um método rápido e fácil de avaliação. Este novo método não foi testado até a presente data.

2 JUSTIFICATIVA

A criopreservação de espermatozóides é um procedimento rotineiramente utilizado nos serviços de reprodução humana. Os bancos de sêmen obedecem a protocolos bem estabelecidos e indicações clínicas bem definidas, tanto para utilização homóloga quanto heteróloga.

Entretanto, apesar de ser a criopreservação objeto de estudo desde a década de 40, com a descoberta do crioprotetor glicerol (44)(45) os protocolos estabelecidos até hoje não conseguem evitar os danos aos espermatozóides durante o processo de congelamento (formação de cristais de gelo intra e extra celular e alterações na membrana celular dos espermatozóides) e descongelamento (alterações da permeabilidade da membrana plasmática e recristalização) (46)(36). Como consequência, a taxa média de recuperação espermática após descongelamento varia de 25- 50% (17)(19).

Na prática clínica, a taxa média de recuperação espermática após o descongelamento é o parâmetro rotineiramente utilizado pelos bancos de sêmen para avaliação da qualidade da amostra criopreservada: representa o número de SPZ da amostra que apresentam motilidade.

A importância da identificação de marcadores de criossobrevivência espermática, ou seja, de dados que forneçam uma estimativa mais precisa da recuperação espermática de uma amostra individual, está relacionada principalmente à tomada de decisões pelo banco de sêmen e pelos próprios pacientes, em relação ao manejo das amostras tanto pré-congelamento quanto pós-descongelamento. Considerando-se os parâmetros mínimos necessários para o sucesso da TRA a ser realizada a estimativa da recuperação espermática irá auxiliar a definir a indicação, a técnica de congelamento, o volume e o número de alíquotas a serem congeladas e, no momento do descongelamento, quais e quantas alíquotas serão descongeladas.

Algumas substâncias encontradas no líquido seminal têm seu valor estabelecido na manutenção da fertilidade de amostras congeladas de sêmen, como

as proteínas do plasma seminal que são consumidas após o processo de descongelamento reparando parcialmente as alterações da membrana do espermatozóide induzidas pelo congelamento(27)(28). Essa reparação tem relação direta com a concentração de proteínas no plasma seminal(29). Dentre estas proteínas encontram-se enzimas antioxidantes que preservam os lípidos de membrana contra o estresse oxidativo do congelamento(30)(31). As proteínas do plasma seminal também são responsáveis por um menor efeito mimético de capacitação acrossômica do SPZ que é induzido pelo congelamento e que é causa de infertilidade em amostras seminais consideradas férteis pré-congelamento(32).

A glicose tem papel significativo na motilidade espermática e no aumento do número de reações acrossômicas durante o processo de capacitação(38). Sua concentração no plasma seminal está significativamente relacionada com altas taxas de fertilização(39).

No caso específico dos bancos de sêmen, a identificação de marcadores seminais é de extrema importância e relevância, porém os métodos atuais são dispendiosos e requerem maior tempo para serem realizados.

Tanto a glicose quanto as proteínas totais podem ser dosadas diretamente no plasma seminal através de métodos simples, como fitas reagentes (as mesmas utilizadas para uroanálise) para a dosagem de proteínas e fitas reagentes para leitura em glicosímetros no caso da dosagem de glicose.

Baseado no exposto acima, dosar glicose e proteínas totais no líquido seminal de maneira prática e rápida através de fita reagente pode ter valor preditivo da criossobrevivência espermática.

3 OBJETIVO

Avaliar o valor das dosagens seminais de glicose e proteínas pela análise de fitas reagentes como fatores preditivos da preservação da motilidade e sobrevivência dos SPZ após criopreservação.

4 MÉTODO

4.1 Tipo de estudo

Trata-se de um estudo do tipo avaliação de acurácia diagnóstica, em coorte exploratória com bom padrão de referência, realizado em um único centro clínico.

Fatores em estudo: concentrações de proteína e glicose no líquido seminal.

Intervenções: congelamento, criopreservação e descongelamento.

Desfechos principais:

- recuperação de espermatozóides móveis
- recuperação de espermatozóides móveis progressivos
- recuperação de espermatozóides vivos

4.2 População estudada

Indivíduos inférteis em tratamento no “Laboratório de Reprodução Humana Prof. Aroldo Fernando Camargos” do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Cada indivíduo contribuiu com apenas uma amostra.

Critério de inclusão:

- Assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Critérios de exclusão:

- Azoospermia
- Morfologia estrita anormal (< 4% de SPZ normais)
- Motilidade progressiva = 0%

Grupos estudados:

Para realização das análises de correlação, a população total foi estratificada de acordo com o resultado da análise do espermograma segundo critérios da OMS em(6):

- grupo espermograma normal: quando todos parâmetros seminais estavam acima dos VR
- grupo espermograma alterado: quando pelo menos um parâmetro seminal estava abaixo dos VR

Para avaliação dos fatores em estudo optou-se por estratificação da população total de acordo com a concentração de glicose e proteínas totais medida por fita reagente antes do congelamento.

Os seguintes estratos foram avaliados para concentração de proteínas:

- -/+ = concentração de proteínas totais entre 0,3g/L e 1g/L
- ++ = concentração de proteínas totais de 3/L
- +++ = concentração de proteínas totais \geq 20g/L

Os seguintes estratos foram avaliados para concentração de glicose:

- 1° tercil = para indivíduos com valores de glicose entre 14 - 31mg/dL
- 2° tercil = para indivíduos com valores de glicose entre 32 - 45mg/dL
- 3° tercil = para indivíduos com valores de glicose entre 46 - 99mg/dL

4.3 Coleta, análise e processamento das amostras

A coleta das amostras de sêmen foi realizada entre 07:30h e 09:30h, pelos próprios pacientes, por masturbação, em frasco descartável e estéril, no laboratório onde foi realizado o experimento, entre 12/01/11 e 30/03/2013.

4.3.1 Espermograma

O espermograma foi realizado conforme protocolo da OMS (6), na primeira hora após a coleta. Foram avaliados os seguintes parâmetros:

- Morfologia estrita: confecção de esfregaço em lâmina e fixação com metanol por cinco minutos, seguida por coloração em hematoxilina por 10 minutos, secagem em meio ambiente e avaliação sob microscopia óptica em objetiva de imersão com óleo mineral, com aumento de 1000 vezes
- Concentração: contagem em Câmara de Neubauer após diluição da amostra em água destilada, sob microscopia ótica com aumento de 400 vezes
- Motilidade: exame direto de gota de sêmen fresco entre lâmina e lamínula, sob microscopia óptica com aumento de 400 vezes
- Teste de vitalidade espermática: exame direto de gota de sêmen fresco diluída na proporção 1:1 com solução de eosina a 0,5%, entre lâmina e lamínula, sob microscopia óptica, com aumento de 400 vezes

4.3.2 Dosagem de proteínas

A dosagem de proteínas foi realizada utilizando fitas reagentes de urianálise fornecidos pela Condor Tecó Medical Technology® (www.condorteco.com) modelo Labor Strips URS - X - 10®.

Segundo orientação do fabricante, uma gota de sêmen fresco foi colocado sobre a área reagente específica de proteínas da fita de urianálise e a leitura visual foi realizada após 60 segundos de espera para comparação com tabela fornecida.

Os resultados fornecidos por este teste são em variáveis semi-quantitativas, abrangendo os valores: negativo, traços (= 0,15g/L), + (= 1,0g/L), ++ (= 3,0g/L) e +++ (\geq 20g/L).

4.3.3 Dosagem de glicose

A dosagem de glicose foi realizada utilizando fitas-teste Accu-Check Active®, Roche® (www.accu-check.com)

Uma gota de sêmen fresco foi colocada sobre área específica da fita reagente e lida imediatamente em Monitor de Glicemia Portátil Accu-Chek Active®.

Os resultados fornecidos pelo monitor de glicemia foram variáveis quantitativas expressas em mg/dL.

4.3.4 Congelamento e descongelamento

O tempo entre a coleta e o congelamento variou de 30 minutos a 1 hora.

Para o congelamento do sêmen optou-se pela técnica de congelamento rápido conforme protocolo definido(47) (48).

Os frascos de crioprotetor Test Yolk Buffer with Gentamicine and 12% Glycerol (TyB-G) da Irvine Scientific, previamente armazenados em freezer a 20°C negativos, foram descongelados em temperatura ambiente por 30 minutos.

O crioprotetor foi adicionado gota a gota com agulha e seringa na proporção de 1:1 com o volume de sêmen fresco, sob homogeneização constante com pipeta de Pasteur, em criotubos previamente identificados.

Os criotubos foram fixados em racks posicionadas horizontalmente sobre o vapor do nitrogênio líquido em caixa de isopor, a 10cm da superfície líquida, por 10 minutos e, em seguida mergulhados no nitrogênio líquido antes de serem transferidos para o bujão de nitrogênio líquido a -196°C(48).

O descongelamento do sêmen foi realizado pelo método de descongelamento rápido: 37°C por 10 minutos (49).

Após descongelamento, a motilidade e a vitalidade espermáticas foram novamente avaliadas, conforme os mesmos protocolos utilizados antes do congelamento.

4.4 Duplo-cego

As amostras de sêmen foram identificadas numericamente de forma sequencial (1, 2, etc.), para realização do espermograma e dosagem de proteína e glicose. A seguir, as alíquotas seminais foram identificadas de forma aleatória (sorteio de números de 1 à 200) por um colaborador (que não tinha conhecimento dos resultados dos exames), que guardou em sigilo as informações referentes à identificação da amostra de sêmen correspondente. O espermograma pós-descongelamento foi realizado sem o conhecimento da identificação das amostras e sem o conhecimento do grupo ao qual pertenciam. Somente após o registro dos valores do espermograma pós-descongelamento, foi feita a correspondência dos resultados para análise.

4.5 Análise estatística e cálculo amostral

A população total, o grupo espermograma normal e o grupo espermograma alterado foram submetidos a análise de correlação linear entre as concentrações seminais de proteínas e glicose, e os demais parâmetros quantitativos do sêmen fresco e da amostra criopreservada.

Para as análises preditivas a população total foi avaliada comparando as concentrações de proteína e glicose do sêmen com aos desfechos principais de recuperação de espermatozoides móveis, recuperação de espermatozoides móveis progressivos e recuperação de espermatozoides vivos.

Os dados foram submetidos ao teste de D'Agostino-Pearson no programa Graphpad Prism 6 e, como não houve distribuição normal, os dados foram expressos como mediana e intervalo inter-quartil e comparados pelos testes não-paramétricos de Mann-Whitney (2 grupos) e Kruskal-Wallis (3 grupos). O coeficiente de correlação linear não paramétrico de Spearman foi calculado.

Para identificar uma diferença de 0,2 desvios-padrão nas taxas de recuperação de SPZ entre os grupos avaliados, com poder estatístico de 80% e nível de confiança de 95%, são necessários no mínimo 45 indivíduos por grupo.

5 RESULTADOS

5.1 Descrição e comparação entre os grupos estudados

Não houve diferença entre os grupos com espermograma normal (n=100) e alterado (n=49) no que se refere ao tempo de abstinência, tempo de congelamento das amostras, concentração de glicose seminal e proporção de espermatozoides vivos recuperados (Tabela 1). A idade entre os dois grupos foi diferente, porém o grupo com indivíduos mais velhos foi aquele com espermograma normal. As medianas da concentração de proteínas seminais foram iguais nos dois grupos, mas o grupo espermograma normal apresentou maior número de amostras com valores de concentração de proteínas seminais $\geq 20\text{g/L}$ (+++) que o grupo espermograma alterado. A proporção de espermatozoides móveis e móveis progressivos recuperados é maior no grupo espermograma normal do que no grupo espermograma alterado ($p < 0,05$, Tabela 1).

Tabela 1 - Caracterização dos dois grupos de pacientes

	Espermograma	Espermograma	P
	Normal (n=100)	Alterado (n=49)	
Idade (anos)	37 (33-40)	35 (31-37)	0,004*
Tempo de abstinência (dias)	5 (4-5)	5 (4-5)	0,635
Tempo de criopreservação (dias)	120 (91-122)	120 (91-122)	0,953
Glicose seminal (mg/dl)	41 (30-48)	36 (27-56)	0,248
Proteínas seminais (g/l)	3,0 (1,5-3,0)	3,0 (1,0-3,0)	0,004*
Proporção de espermatozoides móveis recuperados (%)	89 (56-99)	60 (0-92)	<0,001*
Proporção de espermatozoides com motilidade tipo A ou B recuperados (%)	60 (25-90)	40 (0-60)	0,003*
Proporção de espermatozoides vivos recuperados (%)	50 (32-83)	50 (32-88)	0,846

Os dados são expressos como mediana e intervalo interquartil.

Os grupos foram comparados pelo teste U de Mann-Whitney

*estatisticamente significativo

5.2 Correlação entre parâmetros seminais e concentração de proteínas nos grupos estudados

Na população total apenas o volume ($r=0,230$, $p<0,05$), a contagem total no semen fresco ($r=0,216$, $p<0,05$) e a taxa de recuperação de SPZ vivos na amostra criopreservada ($r=0,187$, $p<0,05$) tiveram correlação positiva com a dosagem de proteínas seminais, porém esta correlação foi fraca (Tabela 2).

O grupo espermograma normal não apresentou correlação entre os parâmetros quantitativos tanto do sêmen fresco quanto da amostra criopreservada com a concentração seminal de proteína.

O grupo espermograma alterado apresentou fraca correlação entre a concentração seminal de proteínas e a contagem total no sêmen fresco e motilidade total, motilidade A ou B e vitalidade na amostra criopreservada. Porém, houve correlação positiva entre volume e concentração seminal de proteínas, com $r=0,543$ e $p<0,0001$ (Tabela 2).

Tabela 2 - Matriz de correlação linear entre as concentrações seminais de proteínas e os demais parâmetros quantitativos do sêmen fresco e da amostra criopreservada.

Parâmetro seminal	Todos (n=149)	Espermograma Normal (n=100)	Espermograma Alterado (n=49)
Sêmen fresco			
Volume	r = 0,230*	r = 0,041	r = 0,543***
Concentração	r = 0,129	r = -0,044	r = 0,062
Contagem total	r = 0,216**	r = 0,003	r = 0,227
Motilidade total	r = 0,006	r = -0,109	r = 0,032
Motilidade A ou B	r = -0,015	r = -0,090	r = -0,243
Vitalidade	r = 0,034	r = 0,020	r = -0,004
Amostra criopreservada			
Motilidade total#	r = 0,133	r = -0,069	r = 0,115
Motilidade A ou B#	r = 0,134	r = -0,129	r = 0,135
Vitalidade#	r = 0,187*	r = -0,138	r = 0,179

r = coeficiente de correlação não paramétrico de Spearmann,

*p<0,05; **p<0,001; ***p<0,0001

#Percentual recuperado após descongelamento da amostra

5.3 Correlação entre parâmetros seminais e concentração de glicose nos grupos estudados

Na população total a concentração e a motilidade tipo A ou B no sêmen fresco tiveram fraca correlação com a concentração seminal de glicose ($r=0,167$, $p<0,05$, Tabela 3). Na amostra criopreservada, nenhuma das medidas avaliadas apresentou correlação significativa com a concentração seminal de glicose.

O grupo espermograma normal não apresentou correlação entre os parâmetros quantitativos tanto do sêmen fresco quanto da amostra criopreservada com a concentração seminal de glicose.

O grupo espermograma alterado teve fraca correlação entre concentração seminal de glicose e contagem total de espermatozoides no sêmen fresco ($r=0,301$, $p<0,05$), mas não com as taxas de recuperação espermática na amostra criopreservada (Tabela 3).

Tabela 3 - Matriz de correlação linear entre as concentrações seminais de glicose e os demais parâmetros quantitativos do sêmen fresco e da amostra criopreservada.

Parâmetro seminal	Todos (n=149)	Espermograma Normal (n=100)	Espermograma Alterado (n=49)
Sêmen fresco			
Volume	r = 0,00	r = 0,036	r = -0,071
Concentração	r = 0,108	r = -0,012	r = 0,170
Contagem total	r = 0,079	r = 0,002	r = 0,301*
Motilidade total	r = 0,08	r = -0,124	r = 0,159
Motilidade A ou B	r = 0,167*	r = -0,046	r = 0,199
Vitalidade	r = -0,087	r = -0,015	r = -0,238
Amostra criopreservada			
Motilidade total#	r = 0,106	r = -0,017	r = 0,121
Motilidade A ou B#	r = 0,068	r = -0,079	r = 0,089
Vitalidade#	r = -0,043	r = -0,008	r = 0,159

r = coeficiente de correlação não paramétrico de Spearman

*p<0,05

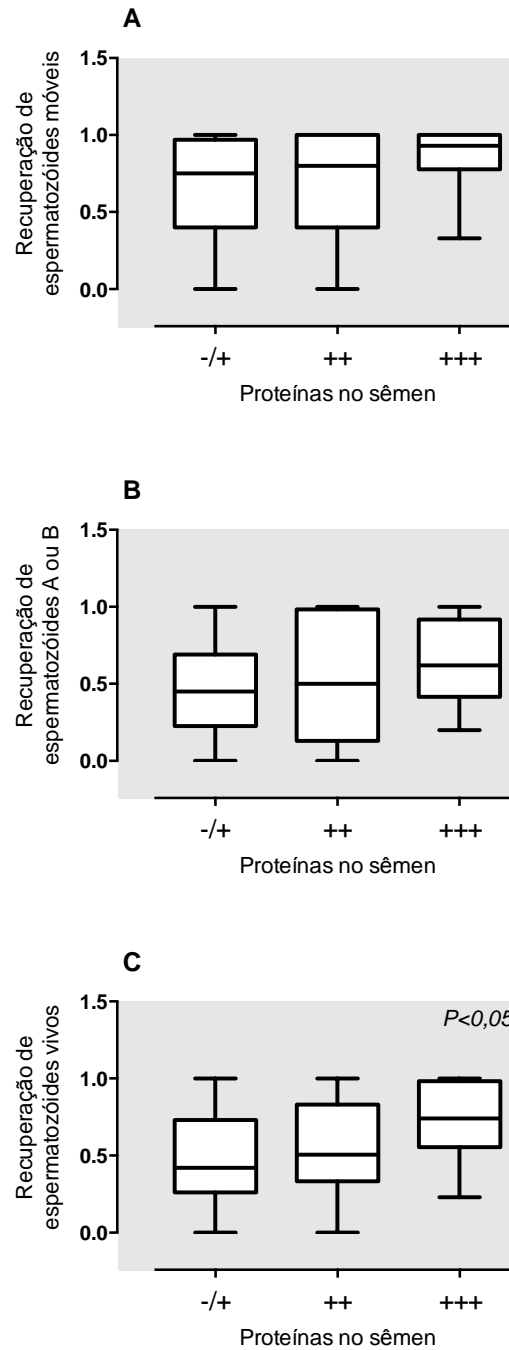
#Percentual recuperado após descongelamento da amostra

5.4 Análise das concentrações seminais de proteínas em relação aos desfechos da criopreservação

A recuperação de espermatozóides móveis, a recuperação de espermatozóides móveis progressivos e a recuperação de espermatozóides vivos foi maior nas amostras que tiveram maior concentração de proteínas. O desfecho que teve maior relação com a dosagem de proteínas foi a recuperação de espermatozóides vivos. Entre as amostras com maior concentração de proteínas a taxa de recuperação de espermatozóides vivos foi na mediana 74% (intervalo interquartil 55-98%), ao passo que nas amostras com menor concentração de proteínas a mesma taxa ficou em 42% (26-73%, $p < 0,05$, Figura 1).

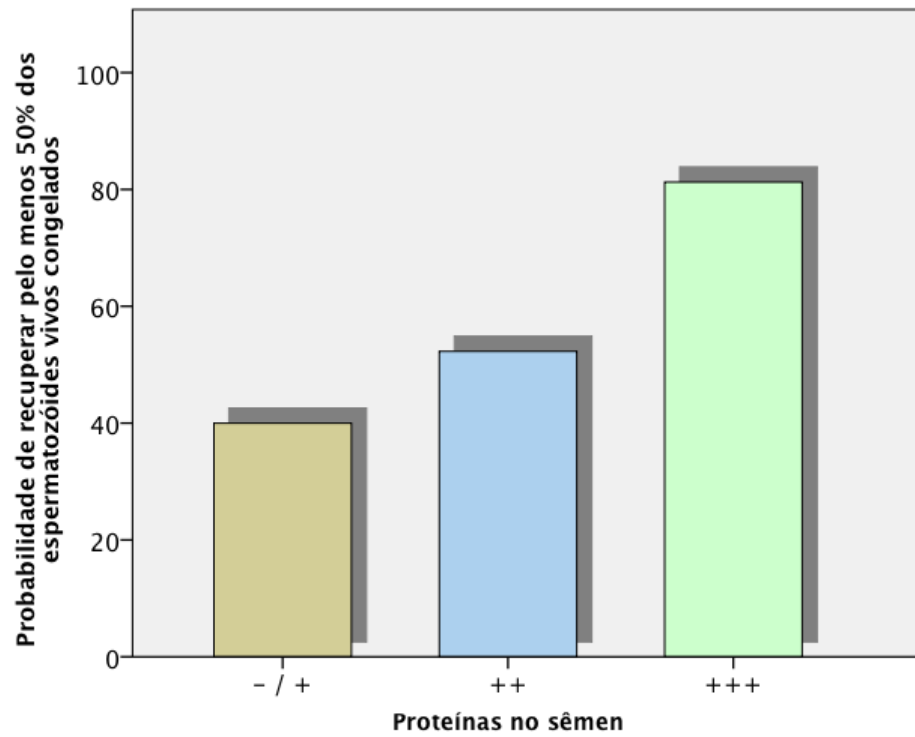
Ao se calcular a probabilidade de recuperação de pelo menos 50% dos espermatozóides vivos após descongelamento em função da concentração seminal de proteínas, observa-se que a recuperação é maior quanto maior for a concentração de proteínas seminais (qui-quadrado para associação linear = 7,17; $p = 0,007$; Figura 2).

Figura 1 - (A) Recuperação de espermatozóides móveis vs. concentração de proteínas no sêmen. (B) Recuperação de espermatozóides móveis progressivos vs. concentração de proteínas no sêmen. (C) Recuperação de espermatozóides vivos vs. concentração de proteínas no sêmen



(-/+) = 0,15 a 1 g/L; (++) = 3 g/L; (+++) ≥ 20 g/L

Figura 2 - Probabilidade de recuperar pelo menos 50% dos espermatozoides vivos criopreservados em função da concentração seminal de proteínas



(-/+) = 0,15 a 1 g/L; (++) = 3 g/L; (+++) \geq 20 g/L
Qui-quadrado para associação linear = 7,17; p = 0,007

5.5 Análise das concentrações seminais de glicose em relação aos desfechos da criopreservação

Ao comparar as concentrações seminais de glicose e os principais desfechos, não houve diferença estatisticamente significativa entre os tercis de concentração, demonstrando ausência de correlação entre dosagens de glicose seminal e recuperação de espermatozoides (Figura 3).

Figura 3 - (A) Recuperação de espermatozoides móveis vs. tercil de concentração de glicose no sêmen, (B) Recuperação de espermatozoides móveis progressivos vs. tercil de concentração de glicose no sêmen , (C) Recuperação de espermatozoides vivos vs. tercil de concentração de glicose no sêmen



1^o tercil = 14-31 mg/dL, 2^o tercil = 32-45 mg/dL, 3^o tercil = 46-99 mg/dL

6 DISCUSSÃO

6.1 Caracterização dos grupos estudados

A avaliação da concentração de glicose no plasma seminal humano em grupos com espermogramas normal ou alterado ainda não havia sido realizado até a presente data. No presente estudo, apesar de haver diferença entre as medianas encontradas nos dois grupos estudados, essa diferença não foi significativa.

Os resultados da concentração de proteínas seminais fornecidos pelas fitas reagentes de urianálise são semi-quantitativos com pouca variedade de valores. Esta pequena gama de valores ao ser analisada estatisticamente acaba por fornecer medianas iguais para a concentração de proteínas seminais entre os dois grupos, porém a quantidade de indivíduos com concentrações elevadas de proteínas seminais é maior no grupo espermograma normal do que no grupo espermograma alterado, por isso a diferença encontrada entre os grupos é estatisticamente significativa.

Estudos já demonstraram a importância da presença das proteínas totais seminais na recuperação de danos à membrana celular ao congelar amostras na ausência ou presença de plasma seminal (32)(28)(27). E que baixas concentrações de proteínas totais seminais no ejaculado podem causar redução na motilidade (50), atividade metabólica e capacidade de fertilização através de experimentos que diluíram as amostras seminais em várias concentrações antes de serem submetidas ao processo de congelamento e descongelamento (37). Todavia, a diferença nas concentrações das proteínas totais seminais entre indivíduos com espermograma normal e espermograma alterado, que já é bem estabelecida em animais, ainda não havia sido estudada em humanos.

No presente estudo a proporção de espermatozoides móveis recuperados e a proporção de espermatozoides com motilidade progressiva recuperados foi significativamente maior no grupo com espermograma normal do que no grupo com espermograma alterado, corroborando com dados da literatura que demonstraram a relação positiva entre qualidade seminal e recuperação espermática (21).

A proporção de espermatozoides vivos recuperados após congelamento e descongelamento pode variar entre 25-50%. Seria esperado que aqueles indivíduos com espermograma alterado tivessem pior proporção de recuperação de SPZ vivos que os indivíduos com espermograma normal, porém, a mediana desta proporção foi a mesma nos dois grupos estudados. Este fato reafirma a idéia de que os parâmetros analisados no espermograma para classificação de qualidade espermática (normal ou alterado) não são bons preditores de recuperação espermática (50)(7)(3).

6.2 Correlação entre as concentrações seminais de proteínas e parâmetros quantitativos do sêmen fresco e da amostra criopreservada

O presente estudo apresentou correlação positiva entre o volume seminal ejaculado e a concentração de proteínas seminais tanto na população total quanto nos dois grupos estudados, o que está de acordo com o fato de que a maior porção do plasma seminal e das proteínas seminais são produzidos nas vesículas seminais.

Não houve correlação linear entre dosagem de proteínas e a maioria dos parâmetros de motilidade e vitalidade, especialmente os índices de recuperação e, quando a correlação existiu, esta foi muito fraca. Por se tratar de uma variável discreta e com apenas 4 valores possíveis, a associação entre a concentração de proteínas e os demais parâmetros seminais não se mostra evidente pelo coeficiente de correlação linear, mas apenas quando se avaliam os desfechos em subgrupos de amostras definidos a partir dos valores de proteínas (Figuras 1 e 2).

6.3 Correlação entre as concentrações seminais de glicose e parâmetros quantitativos do sêmen fresco e da amostra criopreservada

As correlações positivas no sêmen fresco entre dosagem de glicose seminal e contagem total de SPZ de indivíduos com espermograma anormal e com a Motilidade progressiva no grupo espermograma normal e anormal foram fracas.

Estudos já comprovaram que a adição de glicose no meio de processamento dos SPZ para TRA aumentou a motilidade e tempo de sobrevivência dos SPZ. Os meios enriquecidos com glicose exógena são melhores que os contendo apenas glicerol, citrato e colesterol(41)(40).

Apenas um estudo avaliou a dosagem de glicose no sêmen fresco de pacientes com espermograma normal e alterado e não encontrou diferença estatisticamente significativa entre amostras normais, oligospérmicas, azoospérmicas e de homens vasectomizados (51), corroborando com os dados do presente estudo.

Ao analisar a dosagem seminal de glicose em função dos parâmetros de qualidade seminal da amostra congelada, houve fraca correlação com a motilidade total e vitalidade no grupo espermograma anormal, enquanto nos demais parâmetros não houve correlação. Na literatura não existe um estudo que tenha tentado analisar concentração seminal de glicose com indicadores de qualidade seminal após criopreservação de amostras com espermograma normal e anormal, para comparação com os dados do presente estudo.

6.4 Comparação entre dosagens de proteínas seminais e recuperação espermática pós criopreservação

Ao se analisar a distribuição dos indivíduos de acordo com os desfechos principais de criopreservação e com as faixas de concentração de proteínas, observa-se que há relação entre concentração de proteínas seminais e recuperação de SPZ vivos.

Para os indivíduos que apresentaram concentração de proteínas seminais $\geq 20\text{g/L}$ (+++), a probabilidade de recuperar pelo menos 50% de espermatozoides vivos após criopreservação foi o dobro da probabilidade de recuperação dos indivíduos que apresentaram concentração de proteínas seminais entre 0 a 1g/L (-/+).

Esses dados são congruentes com estudos realizados em criopreservação de SPZ de mamíferos e humanos que demonstraram que a presença das proteínas do plasma seminal é fundamental para reparação de danos causados pelo processo de congelamento e descongelamento à membrana plasmática, citoesqueleto e membrana nuclear de SPZ, devido à formação de cristais de gelo ou perda da integridade das membranas durante o processo(35)(34)(27)(52)(36).

6.5 Comparação entre dosagens de glicose seminais e recuperação espermática pós criopreservação

Existem estudos sobre a importância da adição de glicose exógena à solução crioprotetora durante o processo de congelamento e descongelamento de SPZ produzindo um aumento da motilidade, da vitalidade e da função mitocondrial no sêmen humano após descongelamento(41)(39)(38), mas não havia estudos até o presente momento sobre a dosagem de glicose endógena no sêmen humano e sua relação com a recuperação de SPZ criopreservados.

A comparação das concentrações da glicose com os principais desfechos demonstra o seu papel metabólico e não estrutural. Assim, maiores concentrações de glicose na solução crioprotetora conferem maiores porcentagens na recuperação de espermatozoides móveis progressivos (41), não alterando a recuperação de espermatozoides vivos(52)(36). No entanto, essa associação não ocorreu em relação à glicose endógena, medida no presente estudo, sugerindo que o benefício das maiores concentrações de glicose só ocorra em níveis suprafisiológicos.

7 CONCLUSÃO

A dosagem seminal de proteínas pode ser considerado um preditor de recuperação de espermatozóides vivos após processo de criopreservação. Entretanto, a dosagem seminal de glicose não teve correlação com a recuperação de espermatozóides.

8 REFERÊNCIAS

1. **Camargos, A.F., Melo, V.H., Carneiro, M.M., Reis, F.M.** *Ginecologia Ambulatorial: baseada em evidências científicas*. 2a ed. Belo Horizonte : Coopmed, 2008.
2. **Berek, J.S., editor.** *Novak Tratado de Ginecologia*. . 13a ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2005.
3. **Camargos, A. F., Pereira, F.A.N., Cruzeiro, I.K.D.C., Machado, R.B.** *Anticoncepção, endocrinologia e infertilidade: soluções para as questões da ciclicidade feminina*. . Belo Horizonte : Coopmed, 2011.
4. **ASRM.** *Practice Comittee Reports*. s.l. : Fertil Steril, 2008. pp. 1-287. Vol. 90.
5. **Fritz, M.A. and L. Speroff.** *Clinical Gyneologic Endocrinology and Infertility*. Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins, 2011. Vol. 8a ed.
6. **WHO.** *Laboratory manual for the examination and processing of human semen*. Melbourne : World Health Organization, 2010. Vol. 5a ed.
7. **Filho, A.L.S., Aguiar, R.A.L.P., Melo, V.H.** *Manual de Ginecologia e Obstetrícia SOGIMIG*. [ed.] 5a ed. Belo Horizonte : Coopmed, 2012.
8. **Hu, L., Liao, A.H., Song, S., Xiao, N., Xiang, W.P., Xiong, C.L.** Evaluation os donor semen quality provided by six sperm banks: a retrospective study of 1877 artificial insemination cycles. *Andrologia*. 2012, Vol. 44, pp. 499-504.
9. **Maltaris, T., Koelbl, H., Seufert, R., Kiesewetter, F., Beckmann, M.W., Mueller, A., Dittrich, R.** Gonadal damage and options for fertility preservation in female and male cancer survivors. *Asian J Androl*. 2006, Vol. 8, 5, pp. 515-33.
10. **Lee, S.J., Schover, L.R., Partridge, A.H., Patrizio, P., Wallace, W.H., Hagerty, K., Beck, L.N., Brennan, L.V., Oktay, K.** American Society of Clinical

Oncology recommendations on fertility preservation in cancer patients. *J Clin Oncol*. 2006, Vol. 24, 18, pp. 2917-31.

11. **Abdelhafez, F., Bedaiwy, M., El - Nashar, S.A., Sabanegh, E., Desai, N.** Techniques for cryopreservation of individual or small numbers of human spermatozoa: a systematic review. *Hum Reprod Update*. 2009, Vol. 15, 2, pp. 153-64.

12. **Meacham, R.B.** Strategies for enhancing sperm survival in specimens obtained from patients with retrograde ejaculation. *J Androl*. 2005, Vol. 26, 2, pp. 174-5.

13. **Hourvitz, A., Goldschlag, D.E., Davis, O.K., Gosden, L.V., Palermo, G.D., Rosenwaks, Z.** Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) using cryopreserved sperm from men with malignant neoplasm yields high pregnancy rates. *Fertil Steril*. 2008, Vol. 90, 3, pp. 557-63.

14. **Baumann K., Weidner A., Kalff-suske M., Bock K.** Assisted reproduction using cryopreserved sperm: a mini review. *J Reproduk Endokrinol*. 2007, Vol. 4, 2, pp. 97-100.

15. **Konc, J., Kanyó, K., Cseh, S.** The effect of condition/state of testicular spermatozoa injected to the outcome of TESE-ICSI-ET cycles. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2008, Vol. 141, 1, pp. 39-43.

16. **Ishikawa, T., Shiotani, M., Izumi, Y., Hashimoto, H., Kokeyuchi, S., Goto, S., Fujisawa, M.** Fertilization and pregnancy using cryopreserved testicular sperm for intracytoplasmic sperm injection with azoospermia. *Fertil Steril*. 2009, Vol. 92, 1, pp. 174-9.

17. **Polcz, T.E., Stronk, J., Xiong, C., Jones, E.E., Olive, D.L., Huszar, G.** Optimal utilization of cryopreserved human semen for assisted reproduction: recovery and maintenance of sperm motility and viability. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 1998, Vol. 15, 8, pp. 504-12.

18. **Carrell, D.T., Cartmill, D., Jones, K.P., Hatasaka, H.H., Peterson, C.M.** Prospective, randomized, blinded evaluation of donor semen quality provided by seven commercial sperm banks. *Fertil Steril.* 2002, Vol. 78, 1, pp. 16-21.
19. **Oehninger, S., Duru, N.K., Srisombut, C., Morshedi, M.** Assessment of sperm cryodamage and strategies to improve outcome. *Mol Cell Endocrinol.* 2000, Vol. 169, 1-2, pp. 3-10.
20. **Vutyavanich, T., Piromlertamorn, W., Nunta, S.** Rapid freezing versus slow programmable freezing of human spermatozoa. *Fertil Steril.* 2010, Vol. 93, 6, pp. 1921-8.
21. **Keel, B.A.** Within- and between-subject variation in semen parameters in infertile men and normal semen donors. *Fertil Steril.* 2006, Vol. 85, 1, pp. 128-34.
22. **Meseguer, M., Garrido, N., Martinez-Conejero, J.A., Simon, C., Pellicer, A., Remohi, J.** Role of cholesterol, calcium, and mitochondrial activity in the susceptibility for cryodamage after a cycle of freezing and thawing. *Fertil Steril.* 2004, Vol. 81, 3, pp. 588-94.
23. **Yogev, L., Kleiman, S.E., Hauser, R., Botchan, A., Lehavi, O., Paz, G., Yavetz, H.** Assessing the predictive value of hyaluronan binding ability for the freezability potential of human sperm. *Fertil Steril.* 2008, Vol. 93, 1, pp. 154-8.
24. **Beer-Ljubic, B., Aladrovic, J., Marenjak, T.S., Laskaj, R., Majic-Balic, I., Milinkovic-Tur, S.** Cholesterol concentration in seminal plasma as predictive tool for quality semen evaluation. *Theriogenology*,. 2009, Vol. 72, pp. 1132-40.
25. **Szasz, F., Sirivaidyapong, S., Cheng, F.P., Voorhout, W.F., Marks, A., Colenbrander, B., Solti, L., Gadella, B.M.** Detection of calcium ionophore induced membrane changes in dog sperm as a simple method to predict the cryopreservability of dog semen. *Mel. REprod. Dev.* 2000, Vol. 55, pp. 289-98.
26. **Stetson, T., Yadav, S.P., Sharma, R.K., Kashou, A., Willard, B., Zhang, D., Agarwal, A.** Evaluation of sperm proteins in infertile men: a proteomic approach. *Fertil and Steril.* 2011, Vol. 95, 8, pp. 2745-2748.

27. **Muiño-Blanco T., Perez-Pe, R., Cebrian-Perez, J.A.** Seminal Plasma Proteins and Sperm resistance to Stress. *Reprod Dom Anim.* 2008, Vol. 43, 4, pp. 18-31.
28. **Colás C., JUnqueira, C., Perez-Pe, R., Cebrian-Perez, J.A., Muiño-Blanco, T.** Ultrastructural Study of the Ability of Seminal Plasma Proteins to Protect Ram Spermatozoa Against Cold-shock. *Microscopy Research and Technique.* 2009, Vol. 72, pp. 566-72.
29. **Barrios B., Perez-PE, R., Gallego, M., Tato, A., Osada, J., Muiño-Blanco, T., Cebrian-Perez, J.A.** Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *Biology of Reproduction.* 2000, Vol. 63, pp. 1531-37.
30. **Lasso U., Noiles, E., Alvarez, J., Storey, B.** Mechanism of superoxide dismutase loss from human sperm cells during cryopreservation. *Journal of Andrology.* 1994, Vol. 15, pp. 255-65.
31. **Pena F.J., Saravia, F., Nunez-Martinez, I., Johannisson, A., Wallgren, M., Martinez, H.R.** Do different portions of the boar ejaculate vary in their ability to sustain cryopreservation? *Animal Reproduction Science.* 2006, Vol. 93, pp. 101-13.
32. **Maxwell W.M.C., Long, C.R., Johnson, L.A., Dobrinsky, J.R., Welch, G.R.** The relationship between membrane status and fertility of boar spermatozoa after flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Reproduction, Fertility and Development.* 1998, Vol. 10, pp. 433-40.
33. **Vadnais M.L., Roberts, K.P.** Effects of seminal plasma on cooling-induced capacitative changes in boar sperm. *Journal of Andrology.* 2007, Vol. 28, pp. 416-22.
34. **Perez-Pe, R., Muiño-Blanco, T., Cebrian-Perez, J.A.** Sperm washing method alters the ability of seminal plasma proteins to revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *Int J Androl.* 2001, Vol. 24, 6, pp. 352-59.

35. **Corcini, C.D., Varela, A.S., Pigozzo, R., Rambo, G., Goularte, K.L., Calderam, K., Leons, P.M.M., Bongalhardo, D.C., Lucia, T.** Pre-freezing and post-thawing quality of boar sperm for distinct portions of the ejaculate and as a function of protein bands present in seminal plasma. *Livest Sci.* 2012, Vol. 145, 1-3, pp. 28-33.
36. **Watson P.F.** Recent development and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev.* 1995, Vol. 7, pp. 871-91.
37. **Mann, T., Rottenberg, D.A.** The carbohydrate of human semen. *J Endocrinol.* 1966, Vol. 34, pp. 247-59.
38. **Williams, A.C., Ford, W.C.L.** The role of glucose in supporting motility and capacitation in human spermatozoa. *J Androl.* 2001, Vol. 22, 4, pp. 680-95.
39. **Mahadevan, M.M., Miller, M.M., Moutos, D.M.** Absence of glucose decreases human fertilization and sperm movement characteristics in vitro. *Hum Reprod.* 1997, Vol. 12, 1, pp. 119-23.
40. **Amaral, A., Paiva, C., Baptista, M., Sousa, A.P., Ramalho-Santos, J.** Exogenous glucose improves long-standing human sperm motility, viability, and mitochondrial function. *Fertil Steril.* 2011, Vol. 96, 4, pp. 848-50.
41. **McGonagle, L.S., Goldtein, M., Feldschuh, J., Foote, R.H.** The influence of cryoprotective media and processing procedures on motility and migration of frozen-thawed human sperm. *Asian J Androl.* 2002, Vol. 4, 2, pp. 137-41.
42. **Mazouz, B. Almagor, M.** False-positive microhematuria in dipsticks urianalysis caused by the presence of semen in urine. *Clin Biochem.* 2003, Vol. 36, 3, pp. 229-31.
43. **Prober, L.G., Johnson, C.A., Olivier, N.B., Thomas, J.S.** Effect of semen in urine specimens on urine protein concentration determined by means of dipstick analysis. *Am J Vet Res.* 2010, Vol. 71, 3, pp. 288-92.

44. **Polge, C., Smith, A. U., and Parkes, S.** Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*. 1949, Vol. 1, pp. 164-166.
45. **Taitson P. F.** Bases para criopreservação de espermatozoides. *Revista Médica de Minas Gerais*. 2001, Vol. 11, pp. 150-154.
46. **Esteves, S.C., Spaine, D.M., Cedenho, A.P., Srougi, M.** Effects of the technique of cryopreservation and dilution centrifugation after thawing on the motility and vitality of spermatozoa of oligoasthenozoospermic men. *Int Braz J Urol*. 2003, Vol. 29, pp. 133-40.
47. **Franco Jr, J.G.** *Manual de Procedimentos Laboratório de Reprodução Assistida*. s.l. : Red Latinoamericana de Reproducción Asistida, 2006.
48. **Vieira, M.A., Nery, S.F., Tavares, R.L., Dela Cruz, C., Reis, F.M., Camargos, A.F.** Rapid thawing human sperm does not affect basic parameters in normozoospermic men: a double-blind prospective study. *International Braz J Urol*. 2012, Vol. 38, 1, pp. 108-15.
49. **Hossaim, A.** *Book infertility and assisted reproduction*. Cambridge : Cambridge University Press, 2008.
50. **Graham, J. K.** Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Animal Reproduction Science*. 2001, Vol. 68, pp. 239-47.
51. **Diamandis, E.P., Arnett, W.P., Foussias, G., Pappas, H., Ghandi, S., Melegos, D.N., Mullen, B., Yu, H., Srigley, J., Jarvi, K.** Seminal plasmas biochemical markers and their association with semen analysis findings. *Urology*. 1999, Vol. 53, pp. 596-603.
52. **Yogev, L., Kleiman, S.E., Shabtai, E., Botchan, A., Paz, G., Hauser, R., Lehavi, O., Yavetz, H., Gamzu, R.** Long-term cryostorage of sperm in a human sperm bank does not damage progressive motility concentration. *Hum Reprod*. 2010, Vol. 25, 5, pp. 1097-103.

53. **Thacker, S., Yadav, S.P., Sharma, R.K., Kashou, A., Willard, B., Zhang, D., Agarwal, A.** Evaluation of sperm proteins in infertile men: a proteomic approach. *Fertil Steril*. 2011, Vol. 95, 8, pp. 2745-48.
54. **Stewart, A.F., Kim, E.D.** Fertility concerns for the aging male. *Urology*. 2011, Vol. 78, 3, pp. 496-9.
55. **Sion, B., Janny, L., Boucher, D., Grizard, G.** Annexin V binding to plasma membrane predicts the quality of human cryopreserved spermatozoa. *Int J Androl*. 2004, Vol. 27, 2, pp. 108-14.
56. **Said, T.M., Gaglani, A., Agarwal, A.** Implication of apoptosis in sperm cryoinjury. *Reprod Biomed Online*. 2010, Vol. 21, 4, pp. 456-62.
57. **Lin, M.H., Morshedi, M., Srisombut, C., Nassar, A., Oehninger, S.** Plasma membrane integrity of cryopreserved human sperm: an investigation of the results of the hypoosmotic swelling test, the water test, and eosin-Y staining. *Fertil Steril*. 1998, Vol. 70, 6, pp. 1148-55.
58. **Guzick, D.S., Overstreet, J.W., Factor - Litvak, P., Brazil, C.K., Nakajima, S.T., Coutifaris, C., Carson, S.A., Cisneros, P., Steinkampf, M.P., Hill, J.A., Xu, D., Vogel, D.** Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *N Engl J Med*. 2001, Vol. 345, 19, pp. 1388-93.
59. **Kruger, T.** Sperm Morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 1996, Vol. 46, 6, pp. 1118-23.
60. **Cooper, T.G., Noonan, E., Von Eckardstein, S., Auger, J., Baker, H.W.G., Behre, H.M., Haugen, T.B., Kruger, T., Wang, C., Mbizvo, M., Vogelsong, K.M.** World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod Update*. 2010, Vol. 16, 3, pp. 231-45.
61. **Chan, S.Y.W., et al.** Human spermatozoal tail hypo-osmotic swelling test, motility characteristics in hypotonic saline, and survival of spermatozoa after cryopreservation. *Human Reproduction*. 1993, Vol. 8, 5, pp. 717-21.

62 **Casper R.F., Meriano J.S., Jarvi K.A., Cowan L., Lucato M.L.** The hypo-osmotic swelling test for selection of viable sperm for intracytoplasmic sperm injection in men with complete asthenozoospermia. *Fertil Steril.* 1996, Vol. 65, 5, pp. 972-6.

63. **Bolten, M., Weißbach, L., Kaden, R.** Cryopreserved human sperm deposits: usability after decades of storage. *Urologe.* 2005, Vol. 44, 8, pp. 904-8.

64. **Agarwal, A., Ranganathan, P., Kattal, N., Pasqualotto, F., Hallak, J., Khayal, S., Mascha, E.**Fertility after cancer: a prospective review of assisted reproductive outcome with banked semen specimens. *Fertility and Sterility.* 2004, Vol. 81, 2, pp. 456-62.

9 ANEXO 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você é convidado a participar, como voluntário, de um projeto de pesquisa cujo título é "Relação entre marcadores bioquímicos dosados no líquido seminal e a sobrevivência de espermatozoides ao congelamento/descongelamento."

Esta pesquisa tem por finalidade avaliar melhor o processo que envolve o congelamento e descongelamento de sêmen humano, pois muitos espermatozoides morrem ou são danificados quando se submetem a esse processo, prejudicando sua capacidade de fertilizar o óvulo e originar gravidez.

Nesta pesquisa, você deverá coletar seu sêmen através de masturbação em um frasco estéril para realização do espermograma. A amostra do seu ejaculado será congelada e armazenada em botijão contendo nitrogênio líquido, à temperatura de - 196 °C durante o período da pesquisa. Após o descongelamento, será realizada a dosagem dos marcadores bioquímicos seminais e novo espermograma, então a amostra será imediatamente descartada. O resultado do seu exame não será modificado ou prejudicado devido a estes procedimentos.

Todos os seus dados serão confidenciais, sua identidade não será revelada publicamente em hipótese alguma, e somente os pesquisadores envolvidos neste projeto terão acesso a estas informações, que serão utilizadas unicamente para fins de pesquisa, cujos resultados poderão ser publicados em teses, revistas e livros, e apresentados em congressos e aulas.

A participação no estudo não acarretará custos para você e não será disponível nenhuma compensação financeira adicional. Você dispõe de total liberdade de esclarecer qualquer dúvida que possa surgir durante a pesquisa. Sua participação neste estudo é inteiramente voluntária e você poderá recusar-se a participar ou abandonar o estudo a qualquer momento, sem precisar se justificar, sem que haja qualquer influência sobre o seu tratamento.

Eu, _____ RG nº _____
 _____ declaro ter sido informado e concordo voluntariamente em participar desta
 pesquisa científica, após ter lido e compreendido todos os termos deste.

Belo Horizonte, _____ de _____ de _____.

 (assinatura)

 Séphora Augusta Cardoso Queiroz (pesquisadora)
 Telefone: 3409-9264 / 88638288

 Simone França Nery (pesquisadora)
 Telefone: 3409-9264

 Fernando Marcos dos Reis (pesquisador principal)
 Telefone: 3409-9264

Se tiver qualquer dúvida sobre o estudo, contatar os pesquisadores no Laboratório de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas da UFMG: Av. Prof. Alfredo Balena, nº 110, 9º andar, ala norte, Santa Efigênia, Belo Horizonte – MG. Fone: 3409-9484.
 Comitê de Ética em Pesquisa (COEP): Av. Antonio Carlos, 6627 – Unidade Administrativa II, 2º Andar, sala 2005 - Pampulha, Belo Horizonte – MG. Fone: (31) 3409-4592.

10 ANEXO 2 - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Parecer nº. ETIC 0237.0.203.000-10

Interessado(a): Prof. Fernando Marcos dos Reis
Departamento de Ginecologia e Obstetrícia
Faculdade de Medicina - UFMG

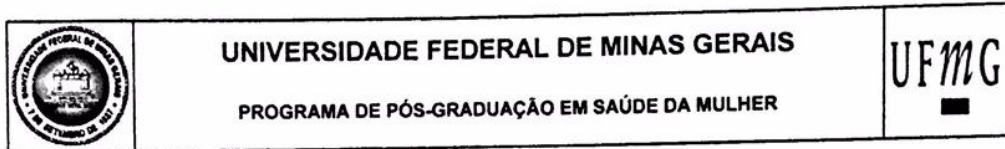
DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 22 de maio de 2013, o relatório parcial e a emenda, abaixo relacionada, do projeto de pesquisa intitulado "Relação entre hormônios dosados no líquido seminal e a sobrevivência de espermatozóides ao congelamento/descongelamento" .

- Extensão da pesquisa até 31/07/2013;
- Inclusão de dois novos marcadores potenciais de criosobrevivência espermática;

Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

11 ANEXO 3 - ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO



ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DA ALUNA SEPHORA AUGUSTA CARDOSO QUEIROZ - 2011661018


Realizou-se, no dia 11 de julho de 2013, às 16:00 horas, Sala 526 - 5º andar da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de dissertação, intitulada *"Relação entre marcadores bioquímicos no sêmen e a sobrevivência de espermatozoides ao congelamento/descongelamento"*, apresentada por SEPHORA AUGUSTA CARDOSO QUEIROZ, graduada no curso de MEDICINA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em SAÚDE DA MULHER, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Fernando Marcos dos Reis - Orientador (UFMG), Prof(a). Augusto Barbosa Reis (Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)), Prof(a). Hélio Chiarini Garcia (UFMG).

A Comissão considerou a dissertação:

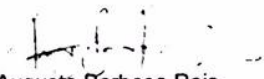
- Aprovada
 Aprovada condicionalmente, sujeita a alterações, conforme folha de modificações, anexa
 Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão. ¹

Belo Horizonte, 11 de julho de 2013.



Prof(a). Fernando Marcos dos Reis
Doutor - UFRGS



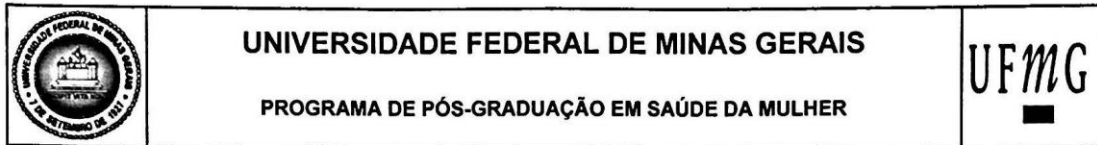
Prof(a). Augusto Barbosa Reis
Doutor - UFMG



Prof(a). Hélio Chiarini Garcia
Doutor - UFMG


CONFERE COM ORIGINAL
 Centro de Pós-Graduação
 Faculdade de Medicina - UFMG

12 ANEXO 4 - FOLHA DE APROVAÇÃO



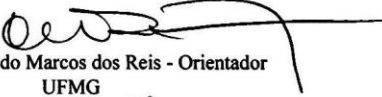
FOLHA DE APROVAÇÃO

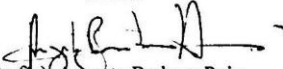
"Relação entre marcadores bioquímicos no sêmen e a sobrevivência de espermatozoides ao congelamento/descongelamento"


SEPHORA AUGUSTA CARDOSO QUEIROZ

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

Aprovada em 11 de julho de 2013, pela banca constituída pelos membros:


 Prof(a). Fernando Marcos dos Reis - Orientador
 UFMG


 Prof(a). Augusto Barbosa Reis
 Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)


 Prof(a). Helio Chiarini Garcia
 UFMG

Belo Horizonte, 11 de julho de 2013.