

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Medicina

**COMPARAÇÃO ENTRE
DUAS TÉCNICAS DE DESCONGELAMENTO DE
SÊMEN HUMANO NORMOZOOSPÉRMICO DE
INDIVÍDUOS FÉRTEIS E INFÉRTEIS:
ESTUDO DUPLO-CEGO PROSPECTIVO**

Marco Aurélio Fernandes Vieira

Belo Horizonte
2010

MARCO AURÉLIO FERNANDES VIEIRA

**COMPARAÇÃO ENTRE
DUAS TÉCNICAS DE DESCONGELAMENTO DE
SÊMEN HUMANO NORMOZOOSPÉRMICO DE
INDIVÍDUOS FÉRTEIS E INFÉRTEIS:
ESTUDO DUPLO-CEGO PROSPECTIVO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Saúde da Mulher.

Área de Concentração: Ciências da Reprodução Humana.

Orientador: Prof. Dr. Aroldo Fernando Camargos.

Belo Horizonte

2010

Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher

Reitor: Prof. Clélio Campolina Diniz

Vice-Reitora: Prof^a. Rocksane de Carvalho Norton

Pró-Reitor de Pós-Graduação: Prof. Ricardo Santiago Gomez

Pró-Reitor de Pesquisa: Prof. Renato de Lima dos Santos

Diretor da Faculdade de Medicina: Prof. Francisco José Penna

Vice-Diretor da Faculdade de Medicina: Prof. Tarcizo Afonso Nunes

Coordenador do Centro de Pós-Graduação: Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha

Subcoordenadora do Centro de Pós-Graduação: Profa. Teresa Cristina de Abreu Ferrari

Chefe do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia: Prof. César Alencar de Lima Rezende

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher: Prof. Antônio Carlos Vieira Cabral

Subcoordenadora do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher: Profa. Alamanda Kfoury Pereira

Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher:

Prof. Agnaldo Silva Filho

Prof. Antônio Carlos Vieira Cabral

Profa. Alamanda Kfoury Pereira

Prof. Fernando Marcos dos Reis

Prof. Henrique Vitor Leite

Prof. Victor Hugo de Melo

Francisco de Assis Nunes Pereira (Disc. Titular)

À minha esposa, Nildete,
amor da minha vida,
companheira, compreensiva,
incentivadora, ajudante constante
e que soube ter paciência
nos muitos momentos da minha ausência
para realizar este trabalho.

Aos meus filhos,
Natália Cristina e Marco Túlio,
ajudantes dispostos,
participativos, apoiadores
e especialmente compreensivos
durante todos os momentos
em que estive ausente
para realizar este projeto.

Amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS

A Deus, Autor da vida, sempre presente, capacitou-me na realização deste trabalho.

Ao Professor Aroldo Fernando Camargos, amado chefe, orientador, por quem sempre terei muita gratidão e respeito, pelo seu exemplo de vida e por tudo que me ensinou ao longo dos anos.

Ao Professor Rubens Lene Carvalho Tavares, pela amizade, sugestões e valiosa ajuda na realização deste estudo.

Ao Professor Fernando Marcos dos Reis, pela disponibilidade e esclarecimentos na execução desta pesquisa.

Ao Professor Agnaldo Lopes da Silva Filho, pela disponibilidade, apoio e grande colaboração, essenciais na realização desta investigação.

À Juliana A. Oliveira, companheira, prestativa e motivadora. Sua cooperação muito contribuiu para a concretização deste trabalho.

À Professora Simone França Nery, pela amizade e participação ativa nos passos deste estudo.

À Cynthia Dela Cruz de Freitas, pelas sugestões, comentários, paciência, disponibilidade de tempo e imensa ajuda.

Aos amigos do Laboratório de Reprodução Humana do HC-UFMG, Prof^a. Márcia M. Carneiro, Dr^a. Cláudia Navarro C. D. Lemos, Dr^a. Inês Katerina D. C. Cruzeiro, Dr. Augusto Barbosa Reis, Dr^a. Flávia Ribeiro de Oliveira, Dr^a. Márcia Cristina F. Ferreira, Dr. Paulo H. Boy Torres, Maria das Graças R. S. Camargos, Edna M. C. Sant'anna, Dr. Francisco de Assis N. Pereira,

Verônica Nere de M. Lobach, Márcio Roberto L. Sá Fortes, Dr^a. Carolina Passos de Rezende, Dr^a. Estefânia Barbosa Magalhães, Dr^a. Manoela Porto Silva, Rosana Aparecida dos Santos, Dr. Leonardo Matheus R. Pereira, Dr^a. Fernanda Vitoriano C. Costa, Dr. Fábio Costa Peixoto, Dr. Reginaldo Martello, Maria Dorotéia Pires e a todos que tiveram participação importante e que involuntariamente omiti.

Aos meus irmãos de fé da IBJA, pelo apoio e constantes orações, que muito ajudaram para que eu realizasse este trabalho.

À minha mãe, Eunira, pelo amor, cuidado, carinho, compreensão, exemplo de fé e total apoio a mim dispensado na realização deste trabalho.

Aos meus irmãos, Ana Maria, Norma e Luiz Henrique, pelo apoio e amizade.

À minha esposa, Nildete, meu grande amor e companheira fiel.

Aos meus filhos, Natália Cristina e Marco Túlio, por tudo que representam em minha vida.

Este trabalho foi financiado pela Comissão de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES), por intermédio do programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

RESUMO

A qualidade espermática de amostras criopreservadas ainda é considerada insatisfatória devido à baixa taxa de recuperação de espermatozoides viáveis após os processos de congelamento e descongelamento. Na tentativa de melhorar a qualidade do sêmen humano criopreservado, o presente estudo teve como objetivo comparar duas técnicas de descongelamento em amostras de homens normozoospermicos. Cada amostra seminal, após análise inicial da motilidade (microscopia ótica), da concentração (contagem em câmara de Neubauer), da morfologia estrita (critério de Kruger) e da integridade funcional das membranas (teste hiposmótico), foi dividida em duas alíquotas iguais de 0,5 mL cada, que foram congeladas em meio de criopreservação *Test Yolk Buffer com Glicerol* (TYB-G). Uma amostra foi descongelada em temperatura ambiente por 25 minutos (descongelamento 1) e a outra em banho-maria a 75°C por 20 segundos, seguido por imersão em banho-maria a 37°C por três minutos (descongelamento 2). Após o descongelamento, os seguintes parâmetros foram avaliados e comparados entre as duas amostras: motilidade, morfologia estrita e integridade funcional das membranas. Os resultados foram expressos como média \pm desvio-padrão para variáveis paramétricas e analisadas pelo teste t de *Student*. Os dados com variáveis não-paramétricas e não-pareadas foram expressos como mediana (intervalo interquartil) e analisados pelo teste de *Mann-Whitney*. O nível de significância foi estabelecido como $p < 0,05$. A motilidade total espermática e progressiva pós-descongelamento do grupo fértil com a técnica de descongelamento 1 foi de 45,00 (10,00–50,00) e 40,00 (5,00–45,00), respectivamente. Com o uso da técnica de descongelamento 2, foi de 35,00 (20,00–60,00) e de 30,00 (15,00–55,00), respectivamente. No grupo infértil, a motilidade espermática total e progressiva com a técnica de descongelamento 1 foi de 40,00 (30,00–50,00) e 35,00 (25,00–45,00), respectivamente. Com o uso da técnica 2, 45,00 (35,00–60,00) e 40,00 (25,00–55,00). As formas morfológicas normais no grupo fértil com a técnica 1 foram de 18,00 e com a técnica 2 de 17,00. No grupo infértil com a técnica 1 foram de 15,00 e com a técnica 2 também de 15,00. O teste hiposmótico no grupo fértil com a técnica 1 foi de 46,00 e com a técnica 2, 41,81. No grupo infértil com a técnica 1, foi de 47,00 e com a técnica 2 de 50,00. Os resultados mostraram que não houve diferença estatística significativa quando se compararam os parâmetros avaliados entre os dois grupos e com o uso das duas técnicas.

Palavras-chave: Infertilidade. Sêmen. Criopreservação. Congelamento. Recuperação espermática.

ABSTRACT

The sperm quality of cryopreserved samples is still considered unsatisfactory due to low recovery rate of viable sperm after freezing and thawing. In an attempt to improved quality of human cryopreserved semen, the present study was to compare two techniques of thawing in samples of normozoospermic men. Each semen sample after initial analysis of motility (light microscopy), concentration (counting in a Neubauer chamber), the strict morphology (Kruger criterion) and functional integrity of membranes (swelling test) was divided into 2 aliquots of 0,5 ml each, which were frozen in cryopreservation medium TYB-G. A sample was thawed at room temperature for 25 minutes (thawed 1), and the other in a water bath at 75 ° C for 20 seconds followed by immersion in water bath at 37 ° C for 3 minutes (thawed 2). After thawing, the following parameters were evaluated and compared between the two samples: motility, strict morphology and functional integrity of membranes. The results were expressed as mean \pm standard deviation for parametric variables and analyzed using t-student. Data with non-parametric variables and unpaired were expressed as median (interquartile range) and analyzed by the Mann-Whitney. The level of significance was $p < 0,05$. The total motility and progressive motility after thawing the fertile group with the technique of thawing 1 was 45,00 (10,00 - 50,00) and 40,00 (5,00 to 45,00), respectively. Using the technique of thawing 2 was 35,00 (20,00 to 60,00) and 30,00 (15,00 to 55,00), respectively. In the infertile group total sperm motility and progressive with the technique of thawing 1 was 40,00 (30,00 - 50,00) and 35,00 (25,00 - 45,00) respectively. With the use of the technique 2 was 45,00 (35,00 to 60,00) and 40,00 (25,00 - 55,00). Morphological forms in the normal fertile group with technique 1 was 18,00 and the technique 2 was 17,00. In the infertile group with technique 1 was 15,00 and the technique 2, also 15,00. The swelling test in the fertile group with technique 1 was 46,00 and the technique 2 was 41,81. In the infertile group with technique 1 was 47,00 and the technique 2 was 50,00. The results showed no statistically significant difference when comparing the evaluated parameters between the two groups and the use of both techniques.

Keys words: Infertility. Semen. Cryopreservation. Freezing. Sperm recovery.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µm	Micrômetro
BM	Banho-maria
CAPES	Comissão de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior
CASA	<i>Computer assisted sperm analysis</i>
CO ₂	Dióxido de carbono
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EUA	Estados Unidos da América
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
ICSI	Injeção intracitoplasmática de espermatozoides
IUI	Inseminação intrauterina
IQ	Interquartil
LN ₂	Nitrogênio líquido
MET	Microscópio eletrônico de transmissão
mL	Mililitro
Mm	Milímetro
Morfo DC	Morfologia defeito de cabeça
Morfo DCd	Morfologia defeito de cauda
Morfo GC	Morfologia com gota citoplasmática
Morfo N	Morfologia normal
Morfo PI	Morfologia defeito de peça intermediária
N	Normozoospermico
OMS	Organização Mundial da Saúde
pH	Potencial de hidrogênio
RF	Congelamento rápido
TA	Temperatura ambiente
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TE	Transferência de embrião
TESE	<i>Testicular Sperm Extraction</i>

THO	Teste hiposmótico
TRA	Técnica de reprodução assistida
TYB-G	<i>Test yolk buffer com glicerol</i>
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UI	Unidade Internacional
WHO	<i>World Health Organization</i>

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figuras

FIGURA 1 Efeitos da criopreservação sobre a célula quando a mesma é congelada rapidamente.....	20
FIGURA 2 Eventos físicos na célula, conforme a velocidade do congelamento.....	21
FIGURA 3 Espermatozoide humano normal, chamado por MacLeod de espermatozoide de “cabeça oval”	24
FIGURA 4 Desenho da cabeça de um espermatozoide humano visibilizado ao microscópio eletrônico de transmissão.....	25
FIGURA 5 Desenho ao microscópio de transmissão do pescoço e da peça intermediária de um espermatozoide humano, em corte longitudinal.....	26
FIGURA 6 Morfologia do espermatozoide.....	27
FIGURA 7 Fluxograma de inclusão e exclusão dos indivíduos convidados para a pesquisa.....	38
FIGURA 8 Fluxograma de exclusão: fatores que excluíram os indivíduos que aceitaram participar da pesquisa.....	39
FIGURA 9 Preparo da lâmina para confecção do esfregaço de sêmen.....	42
FIGURA 10 Medidas morfológicas comparativas de avaliação dos espermatozoides corados, conforme OMS e segundo critério estrito de Kruger <i>et al.</i> (1988).....	43
FIGURA 11 Esquema das modificações típicas dos espermatozoides submetidos ao teste hiposmótico.....	45
FIGURA 12 Análise da amostra pré-congelamento: concentração, motilidade, morfologia e integridade funcional da membrana espermática.....	46

Gráficos

GRÁFICO 1 Média de idade dos voluntários participantes do estudo.....	51
GRÁFICO 2 Motilidade espermática total pré-congelamento dos indivíduos férteis e inférteis ($p = 0,284$) e após o descongelamento pelas técnicas 1 e 2, das amostras dos indivíduos férteis ($p=0,319$) e inférteis ($p=0,235$).....	53
GRÁFICO 3 Motilidade espermática progressiva pré-congelamento ($p=0,541$) e após o descongelamento pelas técnicas 1 e 2, das amostras dos indivíduos férteis ($p=0,261$) e inférteis ($p=0,306$).....	54
GRÁFICO 4 Porcentagem de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico pré-congelamento ($p=0,713$) e pós-descongelamento pelas técnicas 1 e 2 de indivíduos férteis ($p=0,504$) e inférteis ($p=1,000$).....	55
GRÁFICO 5 Porcentagem de formas espermáticas normais pré-congelamento ($p=0,471$) e pós-descongelamento pelas técnicas 1 e 2 de indivíduos férteis ($p=0,791$) e inférteis ($p=1,000$).....	56

Quadros

QUADRO 1 Motilidade espermática progressiva (A + B) pré e pós-descongelamento do presente estudo e de outros autores.....	60
QUADRO 2 Comparação dos resultados do presente estudo com o de vários autores em relação às formas de espermatozoides normais pré e pós-descongelamento.....	63

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 Contagem (mL) e contagem total do sêmen pré-congelamento..	51
TABELA 2 Diferentes alterações morfológicas do sêmen pré-congelamento.	52
TABELA 3 Diferentes alterações morfológicas do grupo férteis pós- descongelamento.....	52
TABELA 4 Diferentes alterações morfológicas do grupo inférteis pós- descongelamento.....	53

SUMÁRIO¹

1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 História da criopreservação do sêmen humano.....	17
1.2 Fundamentos da criobiologia.....	19
1.2.1 Efeitos do congelamento sobre as células.....	19
1.2.2 Crioprotetores.....	22
1.2.3 Tipos de crioprotetores.....	22
1.2.3.1 Mecanismo de ação.....	23
1.3 Fundamentos da criobiologia na criopreservação de espermatozoides..	23
1.3.1 O espermatozoide humano.....	23
1.3.1.1 Cabeça do espermatozoide.....	24
1.3.1.2 Pescoço ou colo do espermatozoide.....	25
1.3.1.3 A cauda do espermatozoide.....	26
1.3.1.4 Peça intermediária da cauda.....	26
1.3.1.5 Peça principal da cauda.....	27
1.3.1.6 Peça final da cauda.....	27
1.3.1.7 A membrana espermática.....	28
1.3.2 Efeitos da criopreservação sobre a qualidade espermática.....	28
1.3.2.1 Protocolos de criopreservação.....	29
1.3.2.2 Protocolos de descongelamento.....	29
1.3.2.3 Avaliação espermática pós-descongelamento.....	30
1.4 A importância e indicações da criopreservação de sêmen.....	30
1.5 Resultados do uso de sêmen criopreservado na técnica de reprodução assistida (TRA).....	31
1.6 Os desafios da criopreservação.....	33
1.7 Justificativas.....	34
2 OBJETIVOS.....	36

¹ Este trabalho foi revisado de acordo com as novas regras ortográficas.

2.1 Objetivo geral.....	36
2.2 Objetivo específico.....	36
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1 Participantes do estudo.....	37
3.2 Coleta do sêmen.....	39
3.3 Análise do sêmen.....	40
3.3.1 Determinação da motilidade.....	40
3.3.2 Determinação da concentração.....	40
3.3.3 Determinação da morfologia.....	41
3.3.4 Valores de referência do espermograma (WHO, 1999).....	44
3.4 Teste hiposmótico.....	44
3.5 Protocolo de criopreservação.....	45
3.5.1 Técnica de criopreservação.....	46
3.5.2 Crioprotetor.....	47
3.5.3 Etapa do processamento.....	47
3.5.4 Etapa do acondicionamento.....	48
3.5.5 Etapa do resfriamento.....	48
3.5.6 Etapa do congelamento.....	48
3.5.7 Etapa de armazenamento.....	48
3.6 Descongelamento e avaliação espermática.....	49
3.7 Análise estatística.....	49
3.8 Cálculo amostral.....	50
4 RESULTADOS.....	51
4.1 Efeitos da técnica de descongelamento sobre a motilidade espermática dos homens férteis e inférteis.....	51
4.2 Efeitos das técnicas de descongelamento sobre a morfologia dos espermatozoides dos homens férteis e inférteis.....	56
4.3 Efeitos das técnicas de descongelamento sobre a integridade das membranas dos espermatozoides dos homens férteis e inférteis.....	57
5 DISCUSSÃO.....	58
5.1 Técnicas de descongelamento <i>versus</i> motilidade.....	59

5.2 Técnicas de descongelamento <i>versus</i> morfologia espermática.....	62
5.3 Técnicas de descongelamento <i>versus</i> integridade das membranas.....	64
6 CONCLUSÃO.....	66
REFERÊNCIAS.....	67
APÊNDICES E ANEXO.....	71

1 INTRODUÇÃO

1.1 História da criopreservação do sêmen humano

O interesse na criopreservação e armazenamento de sêmen data do século XVIII, quando, em 1776, Lazaro Spallanzani observou que em temperaturas frias os espermatozoides humanos tornavam-se lentos, chegando ao estado de completa inativação. Esse quadro se revertia com o aumento da temperatura (WALTERS, 2009; ZHMAKIN, 2009).

Em 1866, Montegazza concebeu a possibilidade de um banco de sêmen humano, ao sugerir que homens mortos em batalhas poderiam ter herdeiros legais a partir da utilização do sêmen congelado e estocado em casa (HOSSAIM; NAGAMAN, 2008).

No ano de 1930, o botânico Stiles teorizou a sobrevivência de espermatozoides *in vitro*. Em 1938, Jahnel, em seus estudos, percebeu que espermatozoides humanos sobreviviam comparavelmente por longos períodos quando resfriados em dióxido de carbono sólido (CO₂), sob temperatura de -79°C (ZHMAKIN, 2009).

No final de 1930 até o início de 1940, muitos pesquisadores observaram que espermatozoides sobreviveram sob congelamento em temperaturas abaixo de 160°C negativos.

Em 1949, Polge *et al.* (*apud* ZHMAKIN, 2009) relataram o primeiro uso do glicerol como crioprotetor. Essa descoberta iniciou um rápido desenvolvimento das técnicas de criopreservação e de soluções crioprotetoras.

Bunge *et al.* (1954, *apud* HOSSAIM; NAGAMAN, 2008) descreveram a primeira gravidez humana bem-sucedida com o uso de espermatozoide criopreservado. Essa criopreservação relacionada com as descobertas anteriores e as gravidezes subsequentes bem-sucedidas levaram gradualmente à aplicação clínica de espermatozoide humano congelado e ao estabelecimento do banco de sêmen (KLIESCH, *et al.*, 2009; WALTERS, 2009; HOSSAIM; NAGAMAN, 2008).

De 1962 a 1963, o vapor de Nitrogênio líquido foi usado para criopreservar amostras de sêmen. Sherman (1963, *apud* PACEY; TOMLINSON, 2009) descobriu

que o armazenamento de espermatozoide humano no Nitrogênio líquido (LN₂) em temperatura de -196°C foi superior ao armazenamento sob -75°C. Nenhuma perda da motilidade foi observada quando os espermatozoides foram estocados em LN₂ por um ano; no entanto, houve declínio na motilidade após estocagem sob -75°C (KLIESCH, *et al*, 2009; WALTERS, 2009).

Sherman (1978, *apud* HOSSAIM; NAGAMAN, 2008) e David e Lansac (1980, HOSSAIM; NAGAMAN, 2008) foram os pioneiros na defesa do uso de sêmen criopreservado para o tratamento da infertilidade (HOSSAIM; NAGAMAN, 2008).

Nos últimos 30 anos, diversos melhoramentos nos protocolos de congelamento de sêmen têm ocorrido. O armazenamento em Nitrogênio líquido (-196°C) tornou-se o método padrão e diluidores contendo crioprotetores compõem o meio de congelamento. Técnicas de criopreservação para um ou poucos espermatozoides foram introduzidas, como, por exemplo, a criopreservação espermática na zona pelúcida (ABDELHAFEZ *et al.*, 2009; YE *et al.*, 2009). A criopreservação de espermatozoides humanos por meio da vitrificação tem sido pesquisada e desponta como alternativa promissora (HOSSAIM; NAGAMAN, 2008; ISACHENKO, *et al*, 2007), apesar de alguns estudos, tais como o de Peirouvi *et al.* (2007), mostrarem limitações quanto ao uso dessa técnica.

Com a introdução da injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), a criopreservação de espermatozoides foi estendida para tecidos testicular e do epidídimo obtidos por técnicas cirúrgicas (KLIESCH, *et al*, 2009).

Indivíduos masculinos com neoplasias (adolescentes na pós-puberdade, jovens e adultos) podem atualmente realizar a criopreservação seminal e, assim, preservar suas capacidades reprodutivas antes de serem submetidos a cirurgias ou a procedimentos de radioquimioterapias (SKRZYPEK; KRAUSE, 2007; TROTTMANN *et al.*, 2007). Pesquisas com boas perspectivas têm sido feitas para estabelecer a criopreservação de tecido testicular imaturo para o caso de meninos que ainda não produzem espermatozoides e que também manifestam doenças oncológicas, podendo, assim, ter opção de preservação da fertilidade (ANDERSON, 2008; SONG *et al.*, 2009; WYNS *et al.*, 2010). Pacientes com lesões medulares também têm se beneficiado das técnicas de congelamento e têm alcançado, em muitos casos, a tão desejada paternidade (SILVA *et al.*, 2009).

No entanto, apesar de todos esses avanços e perspectivas em relação à criopreservação de sêmen, a sobrevivência espermática pós-descongelamento ainda permanece insatisfatória (OZKAVUKCU *et al.*, 2008; PUNYATANASAKCHAI *et al.*, 2008; VUTYAVANAICH; PIROMLERTAMORN; NUNTA, 2009). Como a criopreservação de sêmen é cada vez mais uma importante área da Medicina reprodutiva, ampliar o conhecimento nesse campo e aperfeiçoar as técnicas se fazem necessários por meio de mais pesquisas e estudos.

1.2 Fundamentos da criobiologia

1.2.1 Efeitos do congelamento sobre as células

Durante o processo da criopreservação, as membranas celulares são submetidas a vários estresses, incluindo:

- Mudanças de volume associadas ao encolhimento e distensão da membrana, em resposta à solução crioprotetora hiperosmótica (SARAGUSTY *et al.*, 2009);
- efeitos da toxicidade do crioprotetor;
- mudança da temperatura e conseqüente injúria do resfriamento;
- mudanças na composição das membranas fosfolipídicas em resposta à diminuição da temperatura;
- desidratação induzida pelo congelamento;
- estresses mecânicos induzidos pela formação de gelo extracelular, bem como pelas interações célula-célula e célula-contêiner;
- efeitos elétricos e mecânicos resultantes da incorporação preferencial de algumas espécies iônicas nos meios intra e extracelulares;
- efeitos da concentração elevada do soluto e formação do gelo intracelular, os quais são dependentes da taxa de resfriamento;
- peroxidação lipídica induzida pela criopreservação e perda da atividade enzimática superóxido dismutase;
- recristalização, a qual é dependente da taxa de aquecimento.

A teoria atualmente aceita sugere que o processo da criopreservação produz danos funcionais e morfológicos nas células, por estar associado a consideráveis mudanças osmóticas, ou seja, durante o congelamento, as células se tornam desidratadas e, durante o descongelamento, como ocorre o reequilíbrio da água, elas são submetidas a um desafio hipotônico. A fase de transição da água para gelo é o evento mais crítico no tocante à sobrevivência celular, pois existe uma região crítica de temperatura dentro da qual as células são irreversivelmente danificadas se os microcristais de gelo permanecerem dentro delas por mais que alguns segundos (PETRUNKINA, 2007).

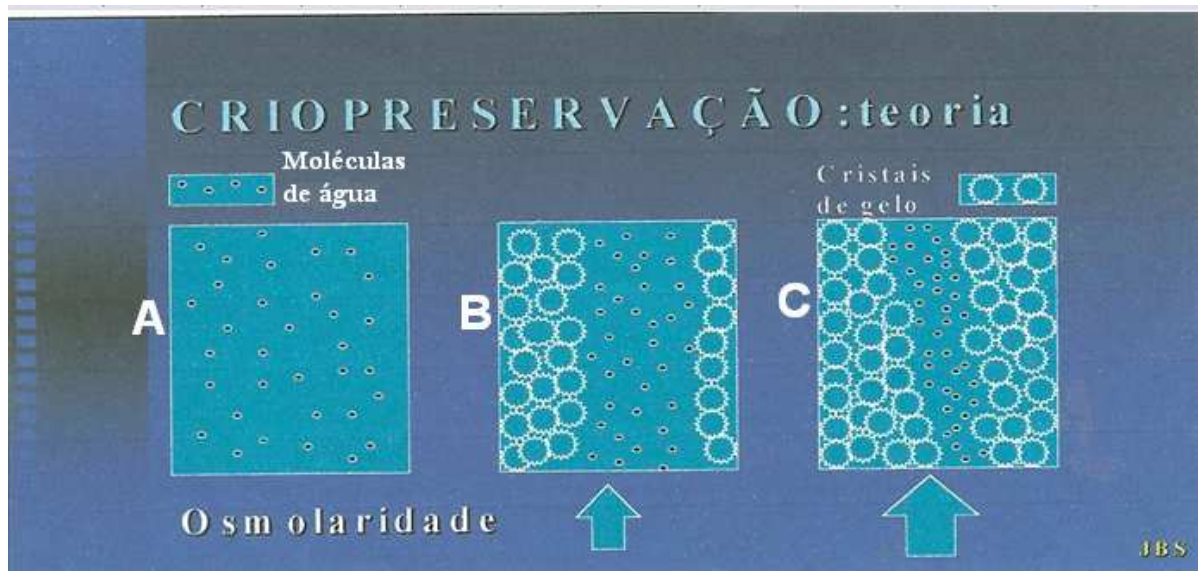


FIGURA 1 - Efeitos da criopreservação sobre a célula quando a mesma é congelada rapidamente.

Observa-se crescente aumento da osmolaridade (setas). Como não há tempo suficiente para a perda de água, ocorre a formação de cristais de gelo dentro da célula.

Fonte: adaptado de Soares e Borges (1999).

De acordo com essa teoria, quando o processo de congelamento é muito lento, há o congelamento da água extracelular, com o conseqüente aumento da concentração de soluto, colocando a célula momentaneamente em um meio hipertônico e determinando perda rápida da água, o que leva à desidratação celular. Por outro lado, quando a célula é congelada rapidamente, não há tempo suficiente para a perda de água, promovendo-se, com isso, a formação de cristais de gelo dentro da célula.

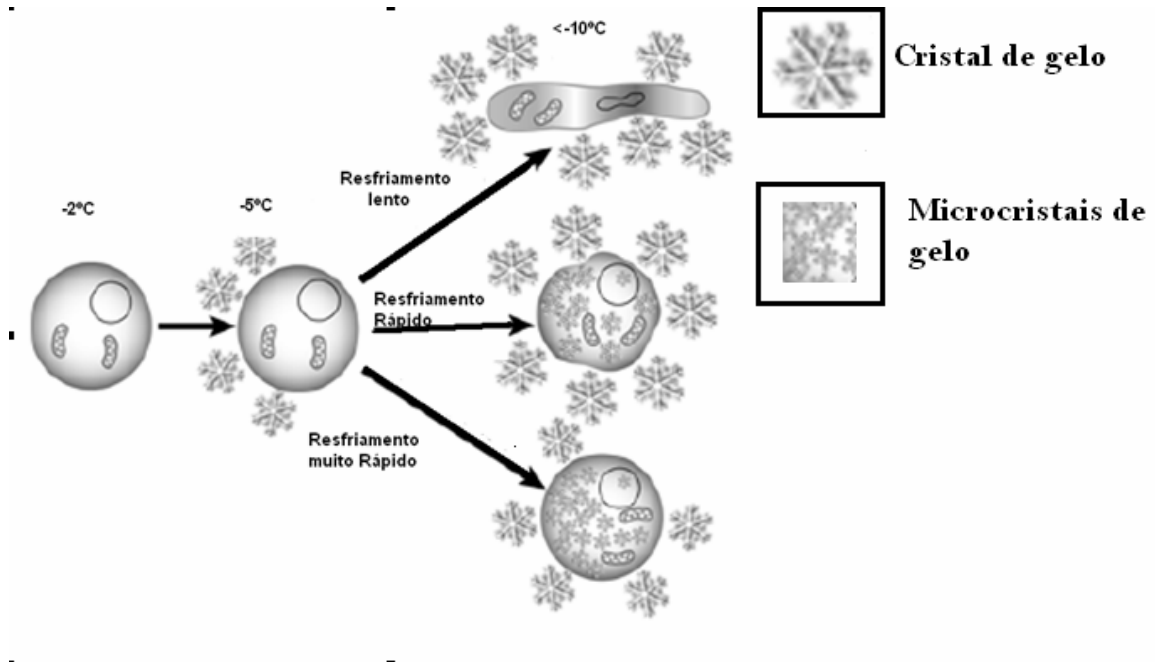


FIGURA 2 - Eventos físicos na célula, conforme a velocidade do congelamento.

Notar os diferentes tamanhos dos cristais de gelo nas diferentes taxas de resfriamento. O resfriamento lento provoca a desidratação da célula e apenas gelo extracelular é formado. O resfriamento rápido deixa pouco tempo para a desidratação, produzindo danos e distensão da célula, devido à formação de cristais de gelo intracelular. O resfriamento muito rápido geralmente não permite a desidratação e formação de cristais de gelo intracelular. Entretanto, se formados, são pequenos e relativamente inócuos.

Fonte: Mazur (1977).

Ainda conforme essa teoria, o descongelamento das células também precisa ser realizado corretamente, porque a taxa de aquecimento influencia a sobrevivência das células. A temperatura de aquecimento utilizada no descongelamento depende diretamente da curva de congelamento, ou seja, quando o congelamento acontece utilizando uma curva moderada, o aquecimento deverá ser com temperatura moderada. Quando as células são congeladas rapidamente, o aquecimento deverá ser muito rápido. Isto se torna necessário para evitar o fenômeno conhecido como recristalização, que consiste na reorganização dos microcristais de gelo intracelular formados durante o congelamento em cristais maiores durante o descongelamento, resultando em injúria letal. A recristalização acontece principalmente quando as células são congeladas rapidamente e aquecidas lentamente (PETRUNKINA, 2007).

No entanto, vários estudos recentes têm sugerido que outro mecanismo além da formação de gelo intracelular seja a causa das injúrias produzidas pelo resfriamento e congelamento a velocidades muito lentas usadas na criopreservação das células (SARAGUSTY *et al.*, 2009).

Saragusty *et al.* (2009) afirmaram que há um terceiro componente grandemente ignorado, que também é responsável por danificar as células durante o processo da criopreservação - o dano mecânico. Esses pesquisadores observaram que fatores biofísicos provocaram danos nas células durante a criopreservação e concluíram que a área da superfície na qual elas são expostas e o volume do contêiner contribuem para o dano mecânico causado nas células espermáticas durante o congelamento. Além disso, a pressão criada dentro do contêiner também foi ressaltada como mais um dos fatores que contribuem para o dano celular durante a criopreservação.

1.2.2 Crioprotetores

Os crioprotetores são substâncias que devem ser adicionadas ao meio de congelamento e são essenciais para minimizar ou evitar a formação de cristais de gelo intracelular, reduzir o estresse osmótico, interagir com íons e macromoléculas, reduzir o ponto de congelamento da água e servir como tampão, ajustando as alterações de potencial de Hidrogênio (pH) (BAUST *et al.*, 2009; MEDEIROS *et al.*, 2002; KLIESCH, *et al.*, 2009).

1.2.3 Tipos de crioprotetores

Os agentes crioprotetores que diminuem o dano celular são geralmente divididos em duas classes gerais relacionadas à sua habilidade em mover-se através da membrana celular. Podem ser classificados em permeáveis, tais como o metanol, glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO), etilenoglicol, 1-2 propanediol e acetamida, e não-permeáveis, tais como açúcares, lipoproteínas da gema de ovo e proteínas de alto peso molecular (BAUST *et al.*, 2009; LABORATÓRIO DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA, 2006; ; KLIESCH, *et al.*, 2009).

1.2.3.1 Mecanismo de ação dos crioprotetores

O mecanismo de ação desses compostos é diferente. A crioproteção feita pelos agentes permeáveis pode ser explicada por suas propriedades coligativas: eles penetram na célula de forma uniforme, provocando a desidratação celular por substituição da água intracelular, evitando-se, assim, o aumento da concentração de solutos e a formação de cristais de gelo. Atuam diminuindo o ponto de congelamento da água e prevenindo a exposição das células à alta concentração de soluto (eletrólitos) e ligam-se a esses eletrólitos. São mais efetivos quando as velocidades de congelamento são baixas (LABORATÓRIO DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA, 2006; PETRUNKINA, 2007).

Os crioprotetores não-permeáveis, por sua vez, situam-se recobrando a membrana plasmática e induzem a formação de cristais de gelo ao redor da mesma. Procuram desidratar as células, permitindo que elas sejam resfriadas rapidamente antes de sofrerem alguma injúria letal devido ao efeito da solução dentro do sistema. São mais efetivos em congelamentos rápidos, iniciando a saída de água das células por desidratação osmótica celular (LABORATÓRIO DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA, 2006).

1.3 Fundamentos da criobiologia na criopreservação de espermatozoides

1.3.1 O espermatozoide humano

Os espermatozoides são células altamente especializadas e condensadas, que não crescem nem se dividem. Ao microscópio ótico, o espermatozoide consiste de uma cabeça, que contém o material hereditário paterno (ácido desoxirribonucleico - DNA), e a cauda, a qual é responsável pela sua motilidade. Entretanto, quando se emprega o microscópio eletrônico de transmissão (MET), a cauda pode ser dividida em: peça intermediária, peça principal e peça final. A pequena região unindo a cabeça à cauda tem o nome de colo ou pescoço do espermatozoide (HOOGENDIJK; KRUGER; MENKVELD, 2007).

O comprimento de um espermatozoide humano gira em torno de 59 a 64 μm (MORAES, 2007).

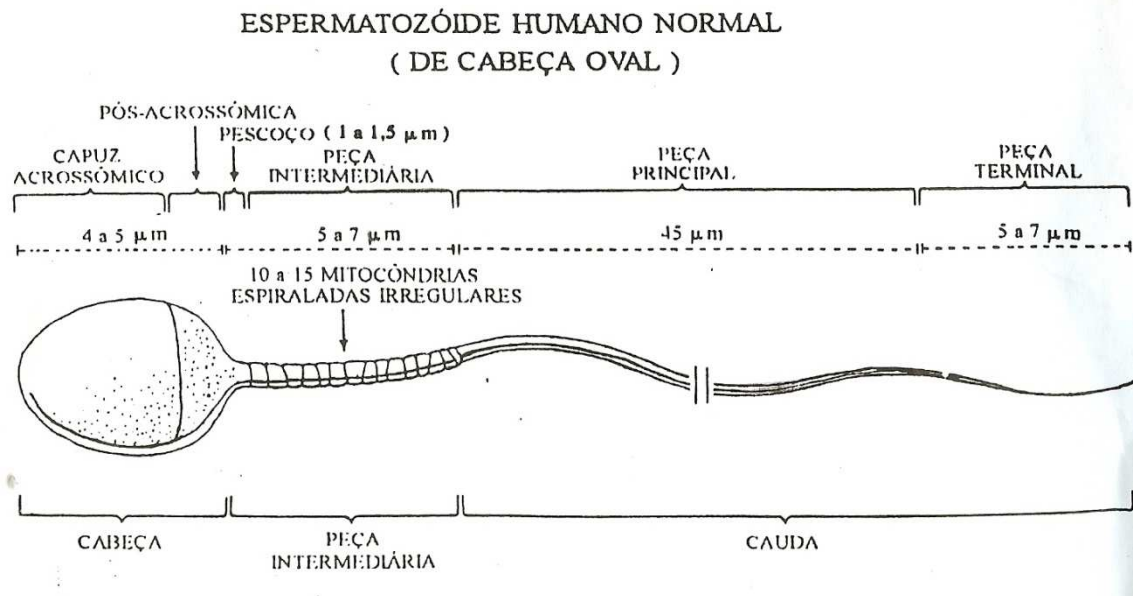


FIGURA 3 – Espermatozoide humano normal, chamado por MacLeod de espermatozoide de “cabeça oval”.

Fonte: Moraes (2007, p. 137).

1.3.1.1 Cabeça do espermatozoide

A cabeça possui comprimento de 4,0 a 5,5 μm e largura de 2,5 a 3,5 μm . É preenchida quase exclusivamente por um núcleo, que acompanha o mesmo formato (HOOGENDIJK; KRUGER ; MENKVELD, 2007; MORAES, 2007).

O acrossoma contém várias enzimas proteolíticas, tais como hialuronidase, colagenase, neuramidase, fosfolipase, acrosina e outras. As enzimas hialuronidase e acrosina estão envolvidas na capacitação espermática e reação acrossômica. Quando liberadas, permitem que o espermatozoide penetre o óvulo, rompendo as barreiras externas do gameta feminino (MORAES, 2007).

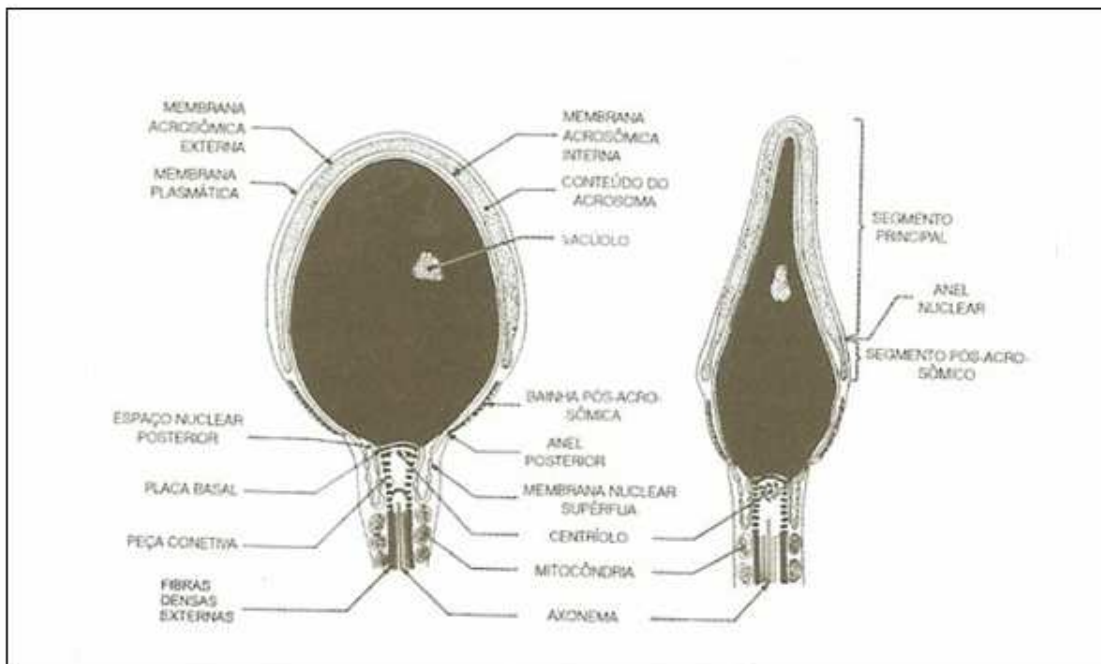


FIGURA 4 – Desenho da cabeça de um espermatozoide humano visibilizado ao microscópio eletrônico de transmissão.

Fonte: Moraes (2007, p. 138).

1.3.1.2 Pescoço ou colo do espermatozoide

Está situado na região da junção entre a cabeça e a cauda do espermatozoide, medindo 1,0 a 1,5 μm de comprimento.

Duas estruturas são visibilizadas no MET: um centríolo chamado centríolo proximal e a peça conectiva ou peça de união.

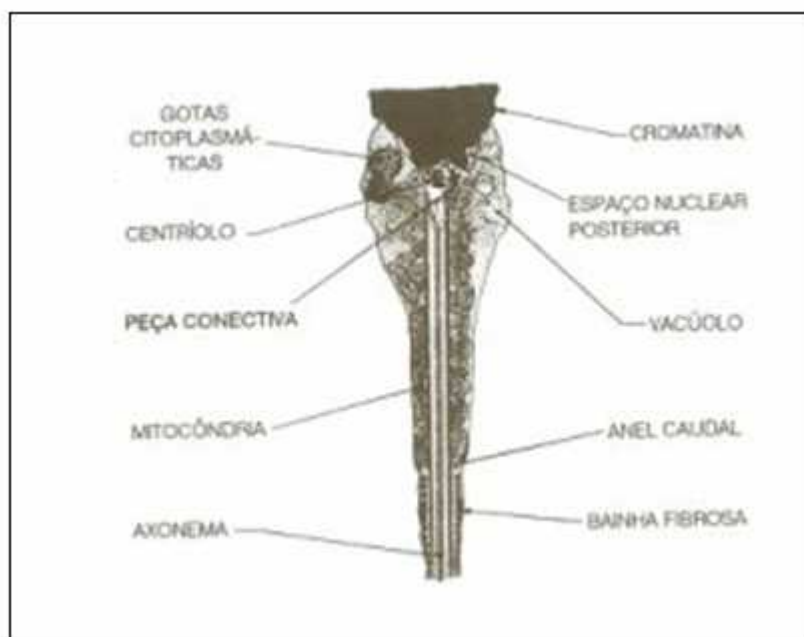


FIGURA 5 – Desenho ao microscópio de transmissão do pescoço e da peça intermediária de um espermatozoide humano, em corte longitudinal.

Fonte: Moraes (2007, p. 140).

1.3.1.3 A cauda do espermatozoide

A cauda pode ser subdividida em três partes distintas, ou seja, peças intermediária, principal e final. A cauda fornece grande parte da energia propulsora do espermatozoide.

1.3.1.4 Peça intermediária da cauda

Possui comprimento de 5 a 7 μm e espessura de 1 μm .

A peça intermediária possui uma porção citoplasmática e uma bainha mitocondrial rica em lípidos, que consiste de várias mitocôndrias em espiral em torno do filamento axial, de forma helicoidal. O núcleo central axial de 11 fibrilas é cercado por um anel externo adicional de nove fibrilas mais grosseiras. As mitocôndrias individuais são enroladas em torno dessas fibrilas exteriores na forma de espiral, para formar a bainha mitocondrial, que contém as enzimas envolvidas

no metabolismo oxidativo do espermatozoide (HOOGENDIJK; KRUGER ; MENKVELD, 2007).

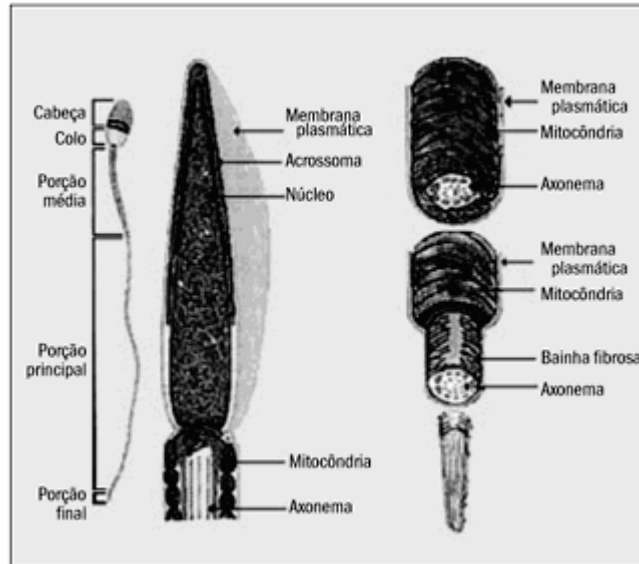


FIGURA 6 – Morfologia do espermatozoide.

A. microscopia ótica; B. microscopia eletrônica.

Fonte: McKinnon e Voss (1993).

1.3.1.5 Peça principal da cauda

Seu comprimento mede aproximadamente 45 μm e tem espessura de 0,5 μm na porção mais superior, afinando-se em direção à peça terminal.

1.3.1.6 Peça final da cauda

Após término abrupto da bainha fibrosa, surge a peça final, com 5 a 7 μm de comprimento e $< 1 \mu\text{m}$ de diâmetro. O diâmetro é pequeno, devido à ausência das fibras exteriores, bainha e desvanecimento distal dos microtúbulos.

1.3.1.7 A membrana espermática

O espermatozoide humano tem alta concentração de ácidos graxos poli-insaturados em sua membrana e pouca proteção adequada com antioxidante. Ácidos graxos poli-insaturados são necessários para eventos de fusão da membrana associados à fertilização (SCHÜFFNER *et al.*, 2008).

O conteúdo fosfolipídico da membrana diminui após a criopreservação, sendo mais pronunciadas as perdas da fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina. Os fosfolipídeos, que normalmente se localizam na porção interna da membrana plasmática, movem-se para a porção externa durante os processos de criopreservação e descongelamento (SCHÜFFNER *et al.*, 2008).

1.3.2 Efeitos da criopreservação sobre a qualidade espermática

Durante o congelamento, os espermatozoides são expostos a estresse físico e químico, a mudanças na composição lipídica da membrana plasmática, redução do tamanho da cabeça e externalização da fosfatidilserina. Outros fatores que contribuem para essas mudanças são o grau de maturação espermática e o tipo de crioprotetor usado (CALAMERA *et al.*, 2008).

A criopreservação pode causar danos estruturais e modificações funcionais dos espermatozoides. Danos na viabilidade, motilidade, velocidade e potencial de fertilização dos espermatozoides são parcialmente devidos a distúrbios da integridade da membrana plasmática e a outros fatores ainda não definidos (SCHÜFFNER *et al.*, 2008).

A morfologia, motilidade e vitalidade espermática diminuem significativamente após o descongelamento, ao passo que a criopreservação aumenta os danos no DNA espermático (CALAMERA *et al.*, 2008; DOHLE *et al.*, 2008; OZKAVUKCU *et al.*, 2008; PUNYATANASAKCHAI *et al.*, 2008; THOMSON *et al.*, 2009).

Após a criopreservação, a motilidade dos espermatozoides é a primeira variável a ser afetada, sendo que após o descongelamento é significativamente reduzida para cerca de 50% do seu valor pré-congelamento, com considerável flutuação entre as amostras (; KLIESCH, *et al.*, 2009; ISACHENKO, *et al.*, 2007).

1.3.2.1 Protocolos de criopreservação

Várias técnicas têm sido desenvolvidas para tentar reduzir os danos causados pelo congelamento e descongelamento. Existem muitas variações quanto a esses protocolos, mas, no geral, envolvem o método rápido: a amostra é colocada na fase de vapor por 10 minutos antes de ser imersa do Nitrogênio líquido a -196°C ; e método lento: a amostra é gradualmente resfriada na fase de vapor por aproximadamente 40 minutos. Usando máquina de congelamento automática programável, a taxa de resfriamento fica entre 1 e $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (DOHLE *et al.*, 2008).

O espermatozoide humano, com pouco volume, superfície ampla e pequena quantidade de água intracelular, permite alta taxa de congelamento, que pode variar de 10 a 100°C por minuto. Dois tipos de congelamento são utilizados: lento e rápido.

O congelamento rápido normalmente é realizado em duas fases:

- a) colocar o sêmen em suspensão em vapor de Nitrogênio líquido:
- b) colocá-lo em Nitrogênio líquido, armazenando-o sob temperatura de 196° negativos.

O congelamento lento é um método no qual a amostra é gradualmente resfriada na fase de vapor por cerca de 40 minutos (DOHLE *et al.*, 2008).

Há etapas básicas que devem ser realizadas, independentemente de qual seja o protocolo aplicado. Essas etapas compreendem: a) acondicionamento; b) resfriamento; c) armazenamento.

1.3.2.2 Protocolos de descongelamento

As amostras congeladas podem ser descongeladas de diversas maneiras: lentamente, sob temperatura ambiente por 30 a 60 minutos, ou rapidamente, sob 37°C por cinco a 10 minutos antes da amostra estar pronta para remoção do crioprotetor (HOSSAIM; NAGAMAN, 2008).

De modo geral, o descongelamento é realizado levando-se em consideração a taxa de congelamento, ou seja, se o congelamento foi realizado de maneira rápida, assim deve ser procedido o descongelamento, e vice-versa (KLIESCH, *et al*, 2009; SNOECK, 2003).

1.3.2.3 Avaliação espermática pós-descongelamento

Alguns parâmetros do sêmen criopreservado podem ser avaliados após o descongelamento da amostra. Os principais são:

- Motilidade espermática:
 - a) método manual
 - b) análise computadorizada (*Computer assisted sperm analysis - CASA*)
- Morfologia espermática;
- membrana do acrossoma;
- teste hiposmótico.

O teste hiposmótico (THO), conhecido por *swelling test*, desenvolvido por Jeyendran *et al.* (1986), permite avaliar a integridade funcional da membrana plasmática dos espermatozoides e, conseqüentemente, a preservação da viabilidade dos mesmos.

O valor de referência para esse teste é de 60% ou mais de espermatozoides com cauda inchada.

1.4 A importância e indicações da criopreservação de sêmen

A criopreservação de sêmen humano representa uma técnica atualmente muito utilizada em procedimentos de reprodução assistida, cuja finalidade é armazenar espermatozoides e preservar a fertilidade do homem (; KLIESCH, *et al*, 2009; PUNYATANASAKCHAI *et al.*, 2008; VUTYAVANAICH; PIROMLERTAMORN; NUNTA, 2009).

Esse procedimento é indicado para homens com câncer, antes de receberem doses citotóxicas de quimioterapia, radioterapia ou alguma intervenção

cirúrgica que possa provocar falência testicular (SKRZYPEK; KRAUZE, 2007; TROTTMANN *et al.*, 2007). O tratamento de algumas doenças não-malignas, tais como diabetes e disfunções autoimunes, também pode levar ao dano testicular e a criopreservação deve ser recomendada. Em programas de doação de sêmen para inseminação, a criopreservação é necessária por permitir tempo de *screening* dos doadores para agentes infecciosos, tais como vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) e vírus da hepatite B, antes do sêmen criopreservado ser liberado para uso clínico.

A criopreservação do sêmen também é indicada em casos de recuperação cirúrgica de espermatozoides provenientes do epidídimo ou testículo, para eventual uso em técnicas de reprodução assistida de alta complexidade (como ICSI) e para evitar a necessidade de repetição de biópsia ou aspiração. Também é útil para armazenar espermatozoides obtidos durante reconstrução microcirúrgica do trato genital masculino (vasovasostomia e vasoepididimostomia), como uma provável garantia de resguardar-se a fertilidade futura do homem (MCLAUGHLIN; PACEY, 2009; HOSSAIM; NAGAMAN, 2008), bem como antes de vasectomia (PARAS *et al.*, 2008; VUTYAVANAICH; PIROMLERTAMORN; NUNTA, 2009).

1.5 Resultados do uso de sêmen criopreservado na técnica de reprodução assistida (TRA)

Em um estudo clínico retrospectivo, Ishikawa *et al.* (2009) relataram que homens com azoospermia obstrutiva e não-obstrutiva puderam ter a sua fertilidade preservada após congelamento e descongelamento de espermatozoides recuperados dos túbulos seminíferos e com o uso da ICSI. Em seu trabalho, foram analisados 184 ciclos de *testicular sperm extraction* (TESE)-ICSI com transferência de embriões (TE) em homens que apresentaram azoospermia obstrutiva e 75 ciclos com azoospermia não-obstrutiva usando espermatozoides testiculares criopreservados que foram coletados por meio de biópsia testicular.

Observou-se que a taxa geral de embriões transferidos e a taxa de gravidez por ciclo foram mais baixas no grupo de azoospermia não-obstrutiva do que naqueles com espermatogênese normal e com azoospermia obstrutiva, mas a taxa de gravidez por ciclo não foi significativamente diferente entre os pacientes

azoospermicos não-obstrutivos e azoospermicos obstrutivos. Com o uso de espermatozoides testiculares, não houve diferença quanto à fertilização ou taxa de gravidez clínica após a criopreservação (ISHIKAWA *et al.*, 2009).

Alguns trabalhos mostram que taxas ótimas de fertilização e gravidez podem ser obtidas com o uso de espermatozoides frescos e congelados recuperados por TESE, quando espermatozoides móveis são identificados (KONC; KANYÓ; CSEH, 2008).

O estudo desenvolvido por Konc, Kanýo e Cseh (2008) enfatizou que, comparando os resultados de ICSI com o uso de espermatozoide testicular móvel/imóvel, fresco/congelado, não houve diferenças nas taxas de fertilização. No entanto, diferenças foram encontradas na implantação e formação do embrião. Os autores concluíram que espermatozoide testicular imóvel pode fertilizar com sucesso oócitos maduros, resultando em gravidez normal. Uma vez que a criopreservação de tecido testicular é bem-sucedido com ciclos de TESE-ICSI-TE, se apenas espermatozoides testiculares imóveis estiverem disponíveis, eles devem ser injetados, já que embriões transferíveis, gravidezes e nascidos vivos podem ser gerados a partir deles.

Várias pesquisas têm reportado o uso de sêmen criopreservado de pacientes com câncer associado às TRAs e taxas de gravidez. Hourvitz *et al.* (2008) investigaram a eficácia da ICSI usando sêmen criopreservado de homens diagnosticados com neoplasias malignas que tiveram suas amostras congeladas antes de iniciarem o tratamento para combater o câncer. Foi apresentado o resultado de 118 homens que sobreviveram ao câncer e se submeteram a 169 ciclos de fertilização *in vitro* (FIV)-ICSI usando sêmen que fora criopreservado no pré-tratamento. A taxa de gravidez clínica referida foi de 56,8% e ocorreram 96 gravidezes que resultaram em 126 crianças nascidas e 11 abortamentos espontâneos.

Em uma minirrevisão sobre reprodução assistida e uso de sêmen criopreservado, Baumann *et al.* (2007) salientaram que a probabilidade de se obter gravidez com sêmen fresco em inseminação intrauterina (IIU) foi três vezes mais do que com a utilização de sêmen criopreservado. Um estudo sobre inseminação artificial com sêmen de doador, comparando sêmen fresco com sêmen congelado, ressaltou que a taxa de sucesso em termos de gravidez após IIU foi de 18,9% com o uso de sêmen fresco.

Nos casos de ICSI, as diferenças das taxas de gravidez entre o uso de sêmen fresco e de sêmen criopreservado não foram significativas (BAUMANN *et al.*, 2007).

1.6 Os desafios da criopreservação

O espermatozoide humano representa o primeiro tipo celular que foi criopreservado com êxito utilizando-se soluções crioprotetoras. Contudo, sabe-se hoje que grande parte do sucesso da técnica de criopreservação depende da temperatura de armazenamento, composição dos crioprotetores, velocidade de criopreservação e resfriamento (ZHMAKIN, 2009).

A otimização dos diluentes crioprotetores e protocolos de congelamento para o sêmen humano permanece um desafio para a Biologia reprodutiva. Buscando melhorar a criopreservação de sêmen humano, linhas de pesquisa têm introduzido novos agentes crioprotetores, novos protocolos de resfriamento, vitrificação e avaliação das técnicas de lavado dos espermatozoides pós-descongelados, para restaurar a fluidez da membrana lipídica. O entendimento desses processos influenciará o formato dos protocolos de criopreservação para sêmen humano das próximas gerações. De particular importância se destaca a detecção de danos subletais, tais como a fragmentação de DNA, principalmente quando os espermatozoides de homens inférteis são os mais vulneráveis às injúrias durante o processo da criopreservação. O maior desafio atualmente é a introdução de modificações adequadas que garantam a segurança da prole, mantendo a eficácia dos protocolos de criopreservação e armazenamento (BAUMANN *et al.*, 2007).

1.7 Justificativas

A qualidade espermática de amostras criopreservadas ainda é considerada insatisfatória devido à baixa taxa de recuperação de espermatozoides viáveis após os processos de congelamento e descongelamento.

A recuperação da motilidade é relativamente baixa, com menos de 60% deles permanecendo móveis após o descongelamento. Tentativas visando melhorar a criopreservação do sêmen têm sido feitas por vários meios, tais como o uso de diferentes agentes crioprotetores e mudanças nas taxas de resfriamento. Entretanto, o espermatozoide humano apresenta comportamento criobiológico não-usual; e melhoras em sua sobrevivência não têm sido alcançadas pelos procedimentos convencionais (VUTYAVANAICH; PIROMLERTAMORN; NUNTA, 2009).

No entanto, várias pesquisas têm sido publicadas referentes à criopreservação de sêmen animal, apresentando bons resultados quanto à viabilidade dos espermatozoides pós-descongelamento (BARBAS; MASCARENHAS, 2008; GARCIA *et al.*, 2009; OLIVEIRA, 2003; OSORIO, 2006; SNOECK, 2003).

A maioria dos protocolos de descongelamento de sêmen equino, bovino, canino, etc. emprega taxas de aquecimento elevadas (acima de 50°C) em que se observam taxas de recuperação da motilidade espermática em torno de 60% (BARBAS; MASCARENHAS, 2008; GARCIA *et al.*, 2009). Esse fato, somado à necessidade de aperfeiçoarem-se os protocolos de congelamento e descongelamento de sêmen humano, despertou o interesse de verificar de forma inédita como se comportariam os espermatozoides humanos submetidos a esse tipo de procedimento. Nossa hipótese foi: se os espermatozoides de vários animais se recuperam tão bem após empregar esse tipo de descongelamento, não seria o caso de suceder o mesmo com espermatozoides humanos? Portanto, resolveu-se aqui investigar se o uso de curvas de aquecimento mais elevadas seriam ou não menos lesivas aos espermatozoides humanos quando comparadas com o descongelamento convencional; e se seria viável introduzir essa técnica na rotina dos procedimentos de criopreservação de sêmen humano em reprodução assistida.

Na tentativa de se conseguir melhor qualidade do sêmen humano criopreservado, o presente estudo teve como objetivo comparar duas técnicas de descongelamento em amostras de homens normozoospermicos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Comparar a viabilidade dos espermatozoides recuperados de sêmen humano normozoospermico após criopreservação com meio de congelamento TYB-G, utilizando-se duas técnicas distintas de descongelamento.

2.2 Objetivo específico

Avaliar os efeitos de duas técnicas de descongelamento sobre os espermatozoides em relação aos parâmetros da:

- a) Motilidade;
- b) morfologia;
- c) membrana plasmática.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este é um estudo experimental, prospectivo, duplo-cego, que foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP), parecer nº ETIC 348/08 (ANEXO) e pela Câmara Departamental do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina da UFMG.

Esta pesquisa foi desenvolvida no período de 25/09/2009 a 04/11/2009, no Laboratório de Reprodução Humana Prof. Aroldo Fernando Camargos, do Hospital das Clínicas da UFMG.

3.1 Participantes do estudo

Foram incluídos 38 homens que forneceram suas amostras de sêmen. Desses, 21 eram parceiros de casais em propedêutica para infertilidade no serviço de Reprodução Humana (grupo infértil) e coletaram uma amostra cada; 13 voluntários comprovadamente férteis, pais de pelo menos um filho (grupo fértil) coletaram uma amostra cada; e os outros quatro, também férteis, coletaram duas amostras cada, perfazendo, assim, 21 amostras de indivíduos férteis e 21 de inférteis, num total de 42 amostras.

Foram convidados para participar deste estudo 70 homens, mas quatro se recusaram a assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) e preencher o questionário, por isto foram excluídos. Outros 28 foram excluídos: 21 devido a alterações na amostra fornecida quanto ao espermograma (20 pertenciam ao grupo dos inférteis e um ao grupo dos férteis) e sete por queda da motilidade da amostra, ficando esse parâmetro abaixo da normalidade pouco antes da realização do congelamento. Os 38 participantes deste estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE A) e preencheram um questionário de história reprodutiva (APÊNDICE B). Foram excluídos os indivíduos que se recusaram a assinar o TCLE e/ou forneceram amostras de sêmen com parâmetros fora dos padrões definidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e foram incluídos todos aqueles que se encaixaram nessas exigências.

Foram incluídas somente as amostras que após avaliação do espermograma foram classificadas como normozoospermicas conforme os critérios da OMS (n=42) e excluídas as de volume seminal < 2 mL ou qualquer parâmetro do sêmen alterado (n=38) (FIG. 7 e 8).

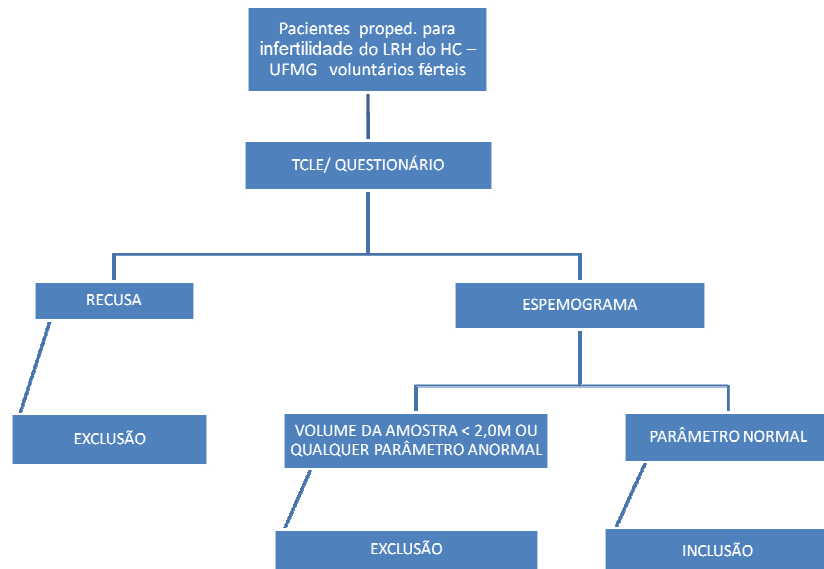


FIGURA 7 - Fluxograma de inclusão e exclusão dos indivíduos convidados para a pesquisa.

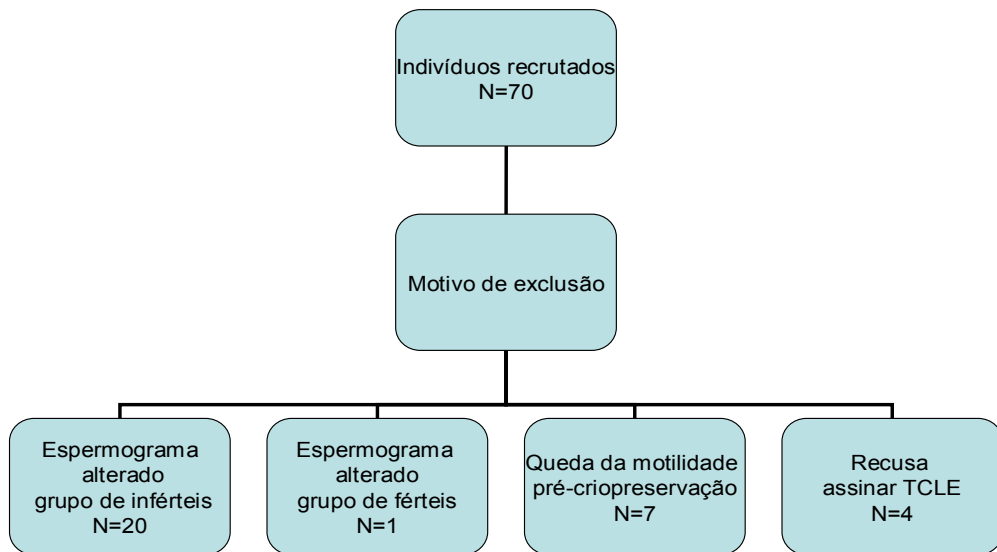


FIGURA 8 - Fluxograma de exclusão: fatores que excluíram os indivíduos que aceitaram participar da pesquisa.

Cada amostra de sêmen foi analisada quanto à concentração, motilidade, morfologia e integridade funcional da membrana espermática, antes do congelamento.

3.2 Coleta do sêmen

A amostra de sêmen de cada participante foi obtida por masturbação em coletor estéril com boca larga e atóxica aos espermatozoides, após período de abstinência sexual ou última ejaculação dois a cinco dias antes da coleta. As amostras foram manipuladas até 60 minutos após a ejaculação.

Uma vez coletado, o sêmen foi identificado e mantido a 37°C numa placa aquecida até que ocorresse a liquefação total.

3.3 Análise do sêmen

O espermograma foi realizado conforme critérios da Organização Mundial da Saúde (OMS) e selecionadas apenas as amostras normozoospérmicas para o congelamento.

Essa análise consistiu na avaliação básica dos parâmetros macroscópicos (liquefação, volume, cor, viscosidade, pH) e aspectos microscópicos (motilidade, concentração e morfologia).

3.3.1 Determinação da motilidade

A motilidade foi realizada colocando-se uma gota de sêmen entre lâmina e lamínula e sob um microscópio óptico de marca Carl Zeiss®, avaliou-se a percentagem de motilidade total e percentagem de motilidade progressiva (tipo A +B), conforme protocolo da OMS.

A motilidade dos espermatozoides é classificada como:

Grau A: espermatozoides com motilidade rápida e progressiva.

Grau B: espermatozoides com motilidade lenta e progressiva.

Grau C: espermatozoides com motilidade não-progressiva.

Grau D: espermatozoides imóveis.

Uma amostra de sêmen normal deve apresentar 50% ou mais de espermatozoides com graus a e b ou no mínimo 25% com grau A.

3.3.2 Determinação da concentração

Conforme os critérios da OMS, a contagem é considerada normal quando há um número igual ou superior a 20 milhões de espermatozoides por mililitro (mL).

Neste estudo, após as devidas diluições das alíquotas do sêmen, todas as contagens foram feitas na câmara de Neubauer.

3.3.3 Determinação da morfologia

a) Preparo das lâminas

Antes do uso, todas as lâminas foram mergulhadas em solução de detergente neutro Indalabor para a retirada de gordura. Depois, foram mergulhadas em outro recipiente com água para remoção do detergente. Posteriormente, foram polidas e secas uma a uma, usando-se uma compressa.

b) Confeção do esfregaço

Os esfregaços foram preparados em duplicata. O procedimento consistiu em depositar uma gota de sêmen de aproximadamente 15 μm sobre a extremidade de uma lâmina. A seguir, pressionada por uma segunda lâmina formando um ângulo em torno de 30°C, ela foi espalhada em toda a superfície dessa lâmina. Após, realizou-se a secagem ao ar livre.■

c) Técnica de coloração

Várias técnicas de coloração podem ser utilizadas, tais como a de Papanicolau, coloração de *Shorr*, coloração rápida de *Diff-Quik* (WHO, 1999), *Giemsa*, coloração de *Bryan-Leishman*, coloração pela hematoxicilina e o método de *Spermac* (HOOGENDIJK; KRUGER ; MENKVELD, 2007).

Optou-se neste trabalho pela técnica de coloração pela hematoxicilina, que consistiu no seguinte: as lâminas com esfregaço foram fixadas durante cinco minutos em um recipiente contendo metanol. A seguir, foram retiradas do metanol e imediatamente mergulhadas totalmente em outro recipiente contendo solução de hematoxicilina, também por cinco minutos. Foram, então, secas em ar ambiente.

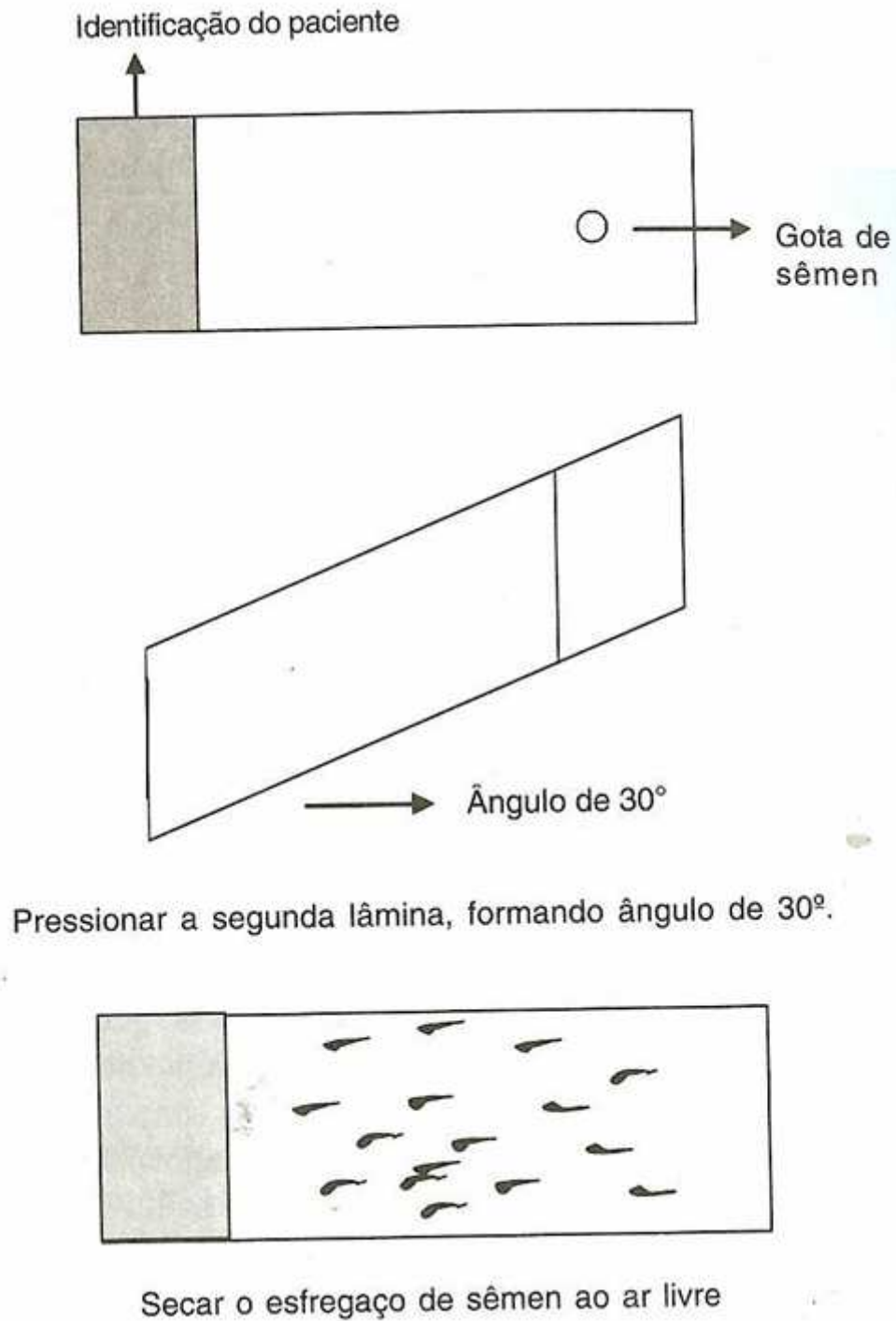


FIGURA 9 – Preparo da lâmina para confecção do esfregaço de sêmen.

Fonte: Wonchockier (2004).

d) Avaliação da morfologia pelo critério estrito

Uma vez secas, as lâminas coradas foram analisadas pelo critério estrito de Kruger (KRUGER *et al.*, 1988), no microscópio óptico Carl Zeiss®, dotado de ocular

milimetrada em objetiva de imersão sob óleo, com aumento de 1.000 vezes, onde se mediram as formas de 200 espermatozoides avaliados ao acaso. Os critérios de normalidade, segundo Kruger *et al.* (1988), considerados nesta avaliação foram: cabeça lisa e oval medindo entre 5 e 6 μm de comprimento e 2,5 a 3,5 μm de diâmetro; acrossoma cobrindo 40 a 70% da cabeça do espermatozoide; não podiam existir defeitos na peça intermediária e na cauda. A peça intermediária deveria ter menos de 1 μm de largura e até uma vez e meia o comprimento da cabeça do espermatozoide.

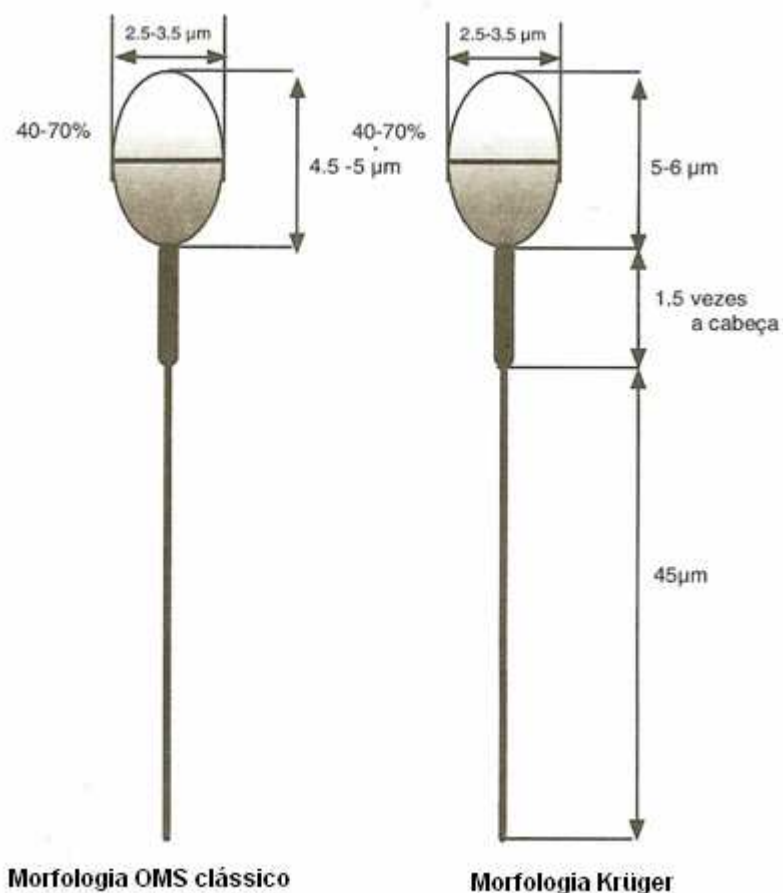


FIGURA 10 - Medidas morfológicas comparativas de avaliação dos espermatozoides corados, conforme OMS e segundo critério estrito de Kruger *et al.* (1988).

Fonte: Wonchockier (2004).

No critério estrito, o valor de referência considerado normal é de pelo menos 14% de espermatozoides com as características descritas anteriormente (NEVES, 2002).

Inúmeros trabalhos comprovaram a importância da morfologia estrita (formas ovais perfeitas) no prognóstico da fertilização *in vitro* (KRUGER *et al.*, 1988): com menos de 4% de formas normais, o prognóstico é ruim; de 4 a 14%, é bom; acima de 14%, é excelente.

3.3.4 Valores de referência do espermograma (WHO, 1999)

- **Volume:** 2,0 mL ou mais;
- **liquefação:** menos de 60 minutos ;
- **cor:** branco opalescente ou amarelo claro ;
- **pH:** 7,2 ou mais;
- **concentração:** 20 milhões de espermatozoides/mL ou mais;
- **concentração total:** 40 milhões de espermatozoides por ejaculado ou mais;
- **motilidade:** 50% ou mais de espermatozoides móveis (grau A+B) ou 25% ou mais com progressão rápida (grau A);
- **morfologia:** 14% ou mais de formas normais (critério estrito de Kruger *et al.*, 1988);
- **vitalidade:** 50% ou mais de espermatozoides vivos.

3.4 Teste hiposmótico

Neste estudo, conforme protocolo da OMS, usou-se a solução hiposmótica constituída de 0,735 g de citrato de sódio e 1,351 g de frutose dissolvidos em 100 mL de água destilada. Alíquotas de 1,0 mL dessa solução foram colocadas em tubos de *ependorf*® de 1,5 mL e congeladas a - 20°C em *freezer*.

A realização do teste consistiu em primeiramente descongelar um tubo de *ependorf* com a solução para cada amostra de sêmen que foi avaliada. A seguir, foram aquecidos por cinco minutos dentro da estufa de dióxido de Carbono (CO₂) Nuare® a 37°C. Após esse período, misturou-se 0,1 mL de sêmen em 1,0 mL da solução hiposmótica no tubo de *ependorf*® previamente aquecido, tendo sido

todos devidamente identificados. Essa mistura foi incubada em estufa de CO₂ Nuare® a 37°C por uma hora.

Após esse tempo, os tubos foram retirados da estufa, homogeneizados e uma pequena gota da mistura colocada entre lâmina e lamínula e observada sob microscópio óptico Carl Zeiss® com aumento de 400x.

Um número de 100 espermatozoides foi analisado em cada amostra. A porcentagem de espermatozoides apresentando as alterações típicas foi calculada (FIG. 11).

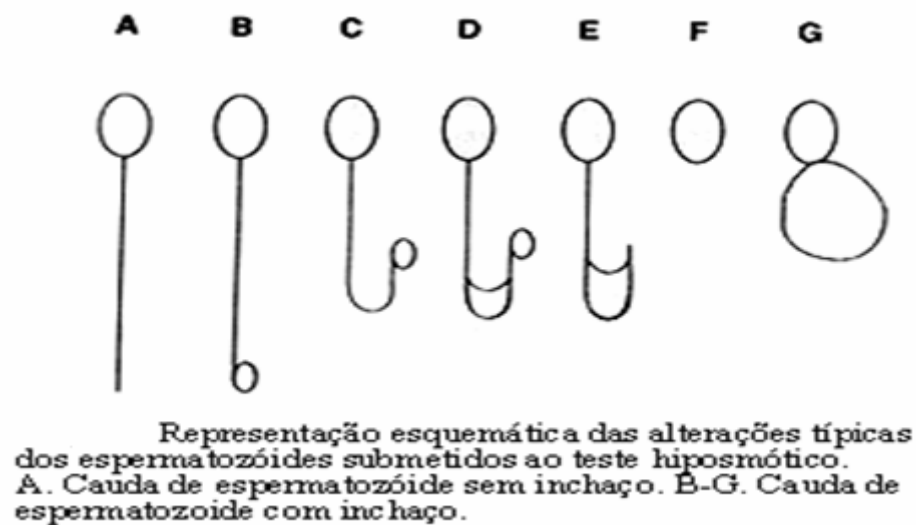


FIGURA 11 – Esquema das modificações típicas dos espermatozoides submetidos ao teste hiposmótico.

A. espermatozoide sem modificação (cauda sem inchaço). B-G. várias maneiras do edema se apresentar na cauda espermática.

Valor considerado normal: $\geq 60\%$ de formas reativas (caudas inchadas).

Fonte: Franco Júnior (1997).

3.5 Protocolo de criopreservação

3.5.1 Técnica de criopreservação

A sequência de procedimentos realizados para o congelamento e descongelamento das amostras de sêmen está apresentada no fluxograma da FIG. 12.

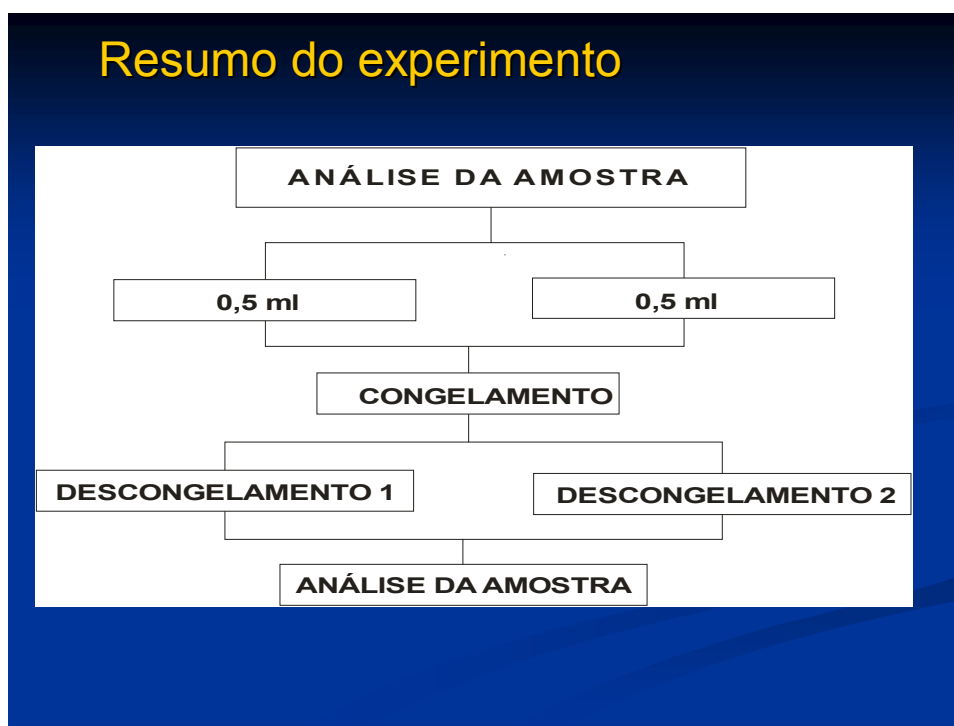


FIGURA 12 - Análise da amostra pré-congelamento: concentração, motilidade, morfologia e integridade funcional da membrana espermática.

CONGELAMENTO = meio de congelamento TYB-G Irvine®.

DESCONGELAMENTO 1 = temperatura ambiente 25 minutos.

DESCONGELAMENTO 2 = Banho-maria 75°C 20 segundos e, a seguir, imersão em banho-maria 37°C três minutos.

ANÁLISE DA AMOSTRA PÓS-DESCONGELAMENTO = motilidade, morfologia e integridade funcional da membrana espermática.

Após a realização do espermograma, separou-se 1,0 mL da amostra de cada indivíduo dividindo-as em duas alíquotas de 0,5 mL cada, colocando-as

separadamente em tubos de poliestireno de 15 mL (FALCON®, San Diego, Estados Unidos da América - EUA).

A temperatura de descongelamento em banho-maria a 75°C por 20 segundos seguida por imersão em banho-maria a 37°C por três minutos foi escolhida após um pré-experimento que testou essa temperatura com três outras temperaturas diferentes de aquecimento: imersão em banho-maria a 60°C por 50 segundos; imersão em banho-maria a 75°C por 10 segundos seguido de imersão em banho-maria a 37°C por um minuto; e imersão em banho-maria a 75°C seguido de imersão em banho-maria a 37°C por três minutos. Como não houve diferença significativa nos resultados pós-descongelamento com as três temperatura e também baseou-se numa tese de doutorado que descongelou sêmen equino sob temperatura de 75°C, optou-se por empregar a técnica de descongelamento 2 para efeito de comparação neste trabalho (SNOECK, 2003).

Neste trabalho realizou-se um protocolo de congelamento rápido, conforme as etapas descritas a seguir:

3.5.2 Crioprotetor

O crioprotetor mais utilizado para espermatozoides é o glicerol. Concentrações entre 5 e 10% de glicerol no volume final para congelamento permitem proteção adequada, sendo as concentrações mais utilizadas entre 6 e 7%. Os diluentes são utilizados resultando em maior criosobrevida do que somente com glicerol. Os diluentes contendo gema de ovo, tampões, citrato e sacarose são os mais indicados. Atualmente, a solução comercialmente disponível que apresenta essas características é o TYB-G® com glicerol (TYB-G® da Irvine Scientific, Santa Ana, EUA) associado à gema de ovo (20%), 11 mM de dextrose e 1% de penicilina-estreptomicina (NEVES, 2002).

Portanto, utilizou-se como agente crioprotetor na criopreservação de todas as amostras o TYB-G®.

Os frascos de congelamento mantiveram-se armazenados em *freezer* a -20°C e foram descongelados sob temperatura ambiente, antes de serem utilizados, por aproximadamente 30 minutos.

3.5.3 Etapa do processamento

Acrescentou-se lentamente ao volume de 0,5 mL de sêmen em cada tubo de fundo cônico graduado, Falcon®, igual volume do meio de congelamento, sob homogeneização constante (proporção 1:1).

3.5.4 Etapa do acondicionamento

A mistura final obtida de 1,0 mL foi distribuída, cada uma, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur para dois criotubos (*Techno Plastic Products*® capacidade de 1,2 mL). Esses criotubos foram identificados por números sequenciais em duplicata para cada amostra dos indivíduos (1a – 1b até 42a - 42b).

Avaliou-se a motilidade seminal após a diluição com o meio de congelamento.

3.5.5 Etapa do resfriamento

Os criotubos foram fixados em *racks* metálicos e deixados horizontalmente no vapor de Nitrogênio à distância de 10 cm da superfície líquida do mesmo, contidos numa caixa de isopor durante 10 minutos.

3.5.6 Etapa do congelamento

Após o período de resfriamento, cada criotubo foi solto imediatamente dentro da caixa de isopor contendo Nitrogênio líquido. A seguir, foram colocados em compartimentos próprios dentro de gavetas dos canisteres e mergulhados imediatamente no bujão de Nitrogênio líquido sob temperatura de -196°C.

3.5.7 Etapa de armazenamento

Os criotubos contendo as amostras permaneceram armazenados no Nitrogênio líquido por pelo menos 14 e não mais que 45 dias.

3.6 Descongelamento e avaliação espermática

Após o período de armazenamento, as duas alíquotas de cada amostra foram descongeladas pelo pesquisador 2 por duas técnicas distintas, conforme protocolo a seguir:

- Técnica 1: consistiu em remover um dos pares dos criotubos do botijão de Nitrogênio líquido e mantê-los sob temperatura ambiente por 25 minutos, até o momento da avaliação.
- Técnica 2: consistiu em remover os outros pares de criotubos correspondentes às mesmas amostras do botijão de Nitrogênio líquido e mergulhá-los com o auxílio de uma pinça metálica no banho-maria (FANEN® modelo 100, São Paulo, Brasil) a 75°C por 20 segundos e, a seguir, imersão em outro banho-maria a 37°C por três minutos.

As temperaturas dos banhos-maria foram aferidas constantemente por meio de termômetros de marca de mercúrio Incoterm®, São Paulo, Brasil.

Após o descongelamento, foram realizadas análises em cada amostra, pelo pesquisador 1, quanto à motilidade e à integridade funcional da membrana espermática (teste hiposmótico), conforme protocolo da OMS e morfologia estrita pelo critério de Kruger *et al.* (1988), conforme descrito anteriormente.

O pesquisador 1, no momento em que realizava as avaliações de cada amostra, não tinha conhecimento sobre qual das duas técnicas de descongelamento tinha sido empregada. Essas informações foram anotadas e mantidas em sigilo pelo pesquisador 2, sendo reveladas apenas ao final da pesquisa.

Por outro lado, o pesquisador 2 também não teve conhecimento dos resultados obtidos referentes às avaliações realizadas pelo pesquisador 1 enquanto o estudo esteve em andamento.

3.7 Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm desvio-padrão para variáveis paramétricas e analisadas pelo teste t de *Student*. Os dados com variáveis não-paramétricas e não-pareadas foram expressos como mediana (intervalo interquartil) e analisados pelo teste de *Mann-Whitney*. Para a comparação entre os valores e cada parâmetro pré e pós-descongelamento, foi utilizado o teste de *Wilcoxon*. O nível de significância foi estabelecido como $p < 0,05$.

3.8 Cálculo amostral

Comparação de médias de dois grupos independentes, considerando:

Relação controle / experimento = 1

Desvio-padrão = 10%

Diferença mínima a ser detectada = 20%

Poder estatístico = 99% Erro = 0,001

Erro = 0,001

→ Tamanho mínimo da amostra = 19 sujeitos

4 RESULTADOS

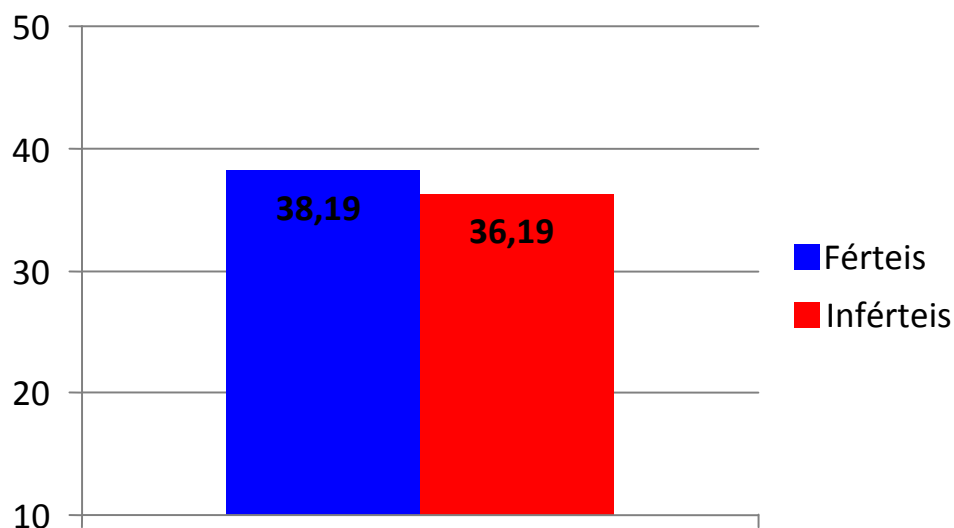


GRÁFICO 1 – Média de idade dos voluntários participantes do estudo.

Não foi observada diferença estatística significativa entre os parâmetros analisados, $p > 0,05$, teste t de *Student*.

TABELA 1

Contagem (mL) e contagem total do sêmen pré-congelamento

	Contagem (mL)	Contagem (total)
Férteis	89,05 \pm 76,42	234,20 \pm 195,45
Inférteis	83,95 \pm 63,78	269,68 \pm 173,48

Dados expressos em média \pm desvio-padrão. Não foi observada diferença estatística significativa entre os parâmetros analisados, $p > 0,05$, teste t de *Student*.

TABELA 2

Diferentes alterações morfológicas do sêmen pré-congelamento

	Morf. DC	Morf. PI	Morf.GC	Morf. DCd
Férteis	55,00 (50,00-60,00)	11,00 (9,00-12,00)	4,00 (3,00-5,00)	8,00 (6,00-12,00)
Inférteis	54,00 (52,00-55,00)	13,00 (12,00-15,00)	4,00 (3,00-5,00)	9,00 (6,00-10,00)

Dados expressos em mediana (interquartil - IQ). Não foi observada diferença estatística significativa entre os parâmetros analisados, $p > 0,05$, teste de *Mann-Whitney*.

Morfo N = morfologia normal; morfo DC = morfologia defeito de cabeça; morfo PI = morfologia defeito de peça intermediária; morfo GC = morfologia com gota citoplasmática; morfo DCd = morfologia defeito de cauda.

TABELA 3

Diferentes alterações morfológicas do grupo férteis pós-descongelamento

	Morf.DC	Morf.PI	Morf.GC	Morf.DCd
Técnica 1	60,00 (56,00-61,00)	10,00 (8,00-16,00)	3,00 (3,00-4,00)	10,00 (7,00-10,00)
Técnica 2	61,00 (57,00-62,00)	10,00 (9,00-12,00)	3,00 (3,00-4,00)	9,00 (7,00-12,00)

Dados expressos em mediana (IQ). Não foi observada diferença estatística significativa entre os parâmetros analisados, $p > 0,05$, teste de *Mann-Whitney*.

Morfo N = morfologia normal; morfo DC = morfologia defeito de cabeça; morfo PI = morfologia defeito de peça intermediária; morfo GC = morfologia com gota citoplasmática; morfo DCd = morfologia defeito de cauda.

TABELA 4

Diferentes alterações morfológicas do grupo inférteis pós-descongelamento

	Morf.DC	Morf.PI	Morf.GC	Morf.DCd
Técnica 1	60,00 (50,00-63,00)	11,00 (8,00-14,00)	3,00 (3,00-4,00)	9,00 (8,00-11,00)
Técnica 2	57,00 (53,00-65,00)	12,00 (10,00-15,00)	3,00 (2,00-4,00)	10,00 (7,00-14,00)
Valor p	1,000	0,260	0,448	1,000

Da dos expressos em mediana (IQ). Não foi observada diferença estatística significativa entre os parâmetros analisados, $p > 0,05$, teste de Mann-Whitney.

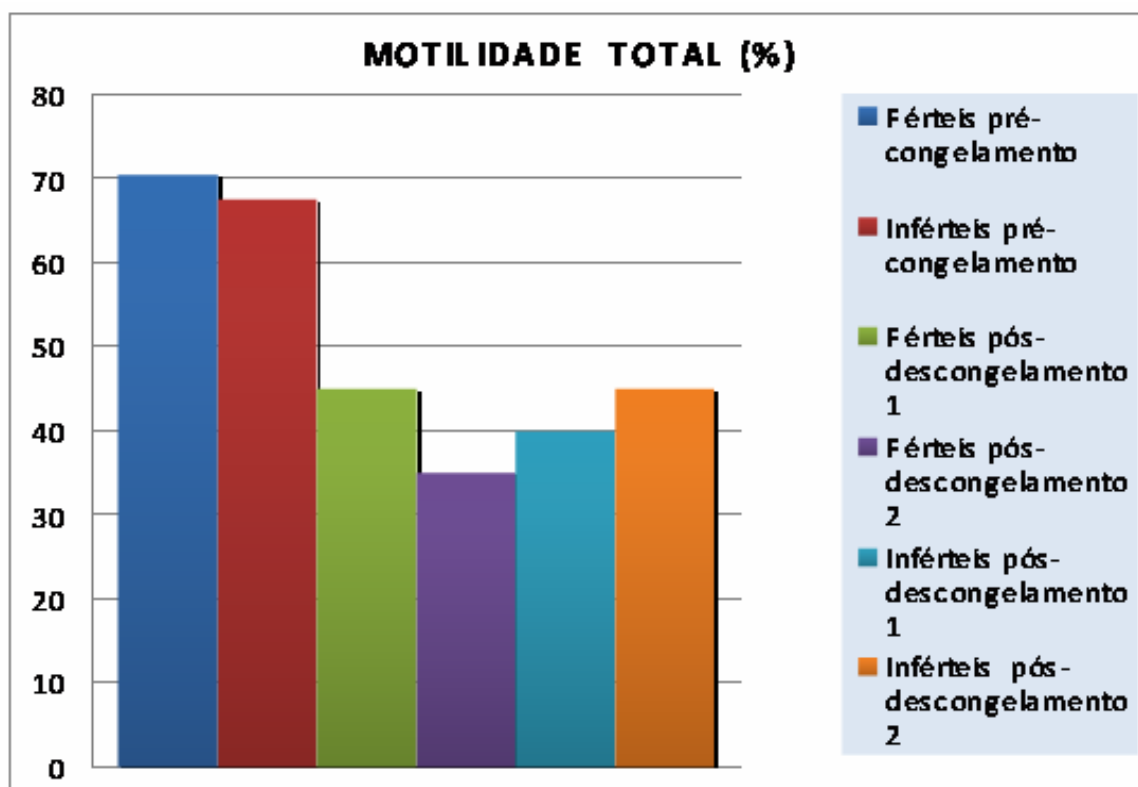


GRÁFICO 2 - Motilidade espermática total pré-congelamento dos indivíduos férteis e inférteis ($p=0,284$) e após o descongelamento pelas técnicas 1 e 2, das amostras dos indivíduos férteis ($p=0,319$) e inférteis ($p=0,235$).

O eixo X representa os valores expressos em porcentagem (%) e o eixo y representa os grupos dos indivíduos férteis e inférteis. Não foi observada diferença estatística significativa entre os parâmetros analisados, $p > 0,05$, teste de *Mann-Whitney*.

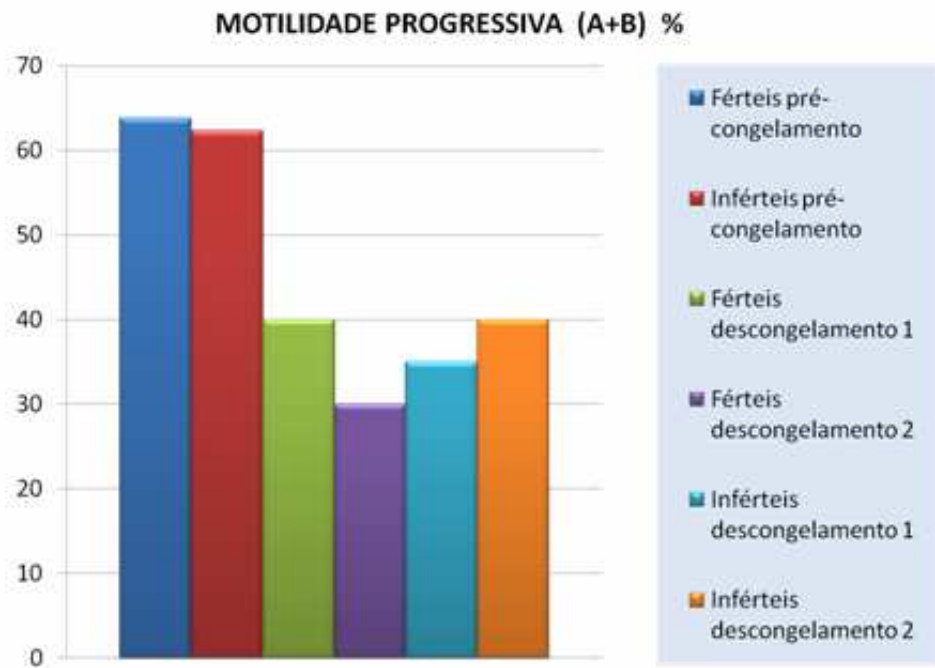


GRÁFICO 3 - Motilidade espermática progressiva pré-congelamento ($p=0,541$) e após o descongelamento pelas técnicas 1 e 2, das amostras dos indivíduos férteis ($p=0,261$) e inférteis ($p=0,306$).

O eixo x representa os valores expressos em porcentagem (%) e o eixo y representa os grupos dos indivíduos férteis e inférteis. Não foi observada diferença estatística significativa entre os parâmetros analisados, $p>0,05$, teste de *Mann-Whitney*.

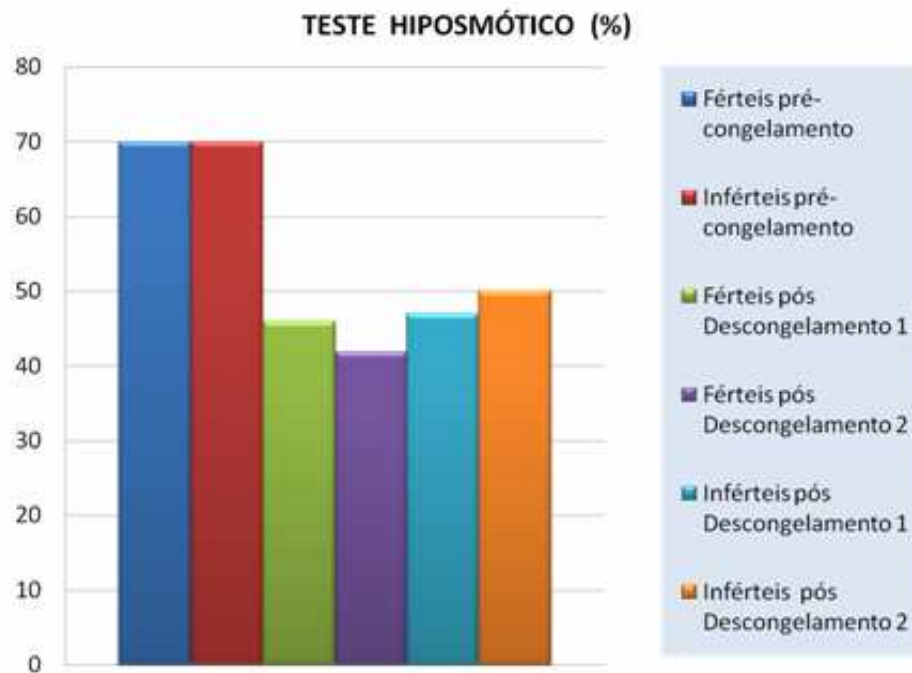


GRÁFICO 4 - Porcentagem de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico pré-congelamento ($p=0,713$) e pós-descongelamento pelas técnicas 1 e 2 de indivíduos férteis ($p=0,504$) e inférteis ($p=1,000$).

O eixo x representa os valores expressos em porcentagem (%) e o eixo y representa os grupos dos indivíduos férteis e inférteis. Não foi observada diferença estatística significativa entre os parâmetros analisados, $p>0,05$, teste de *Mann-Whitney*.

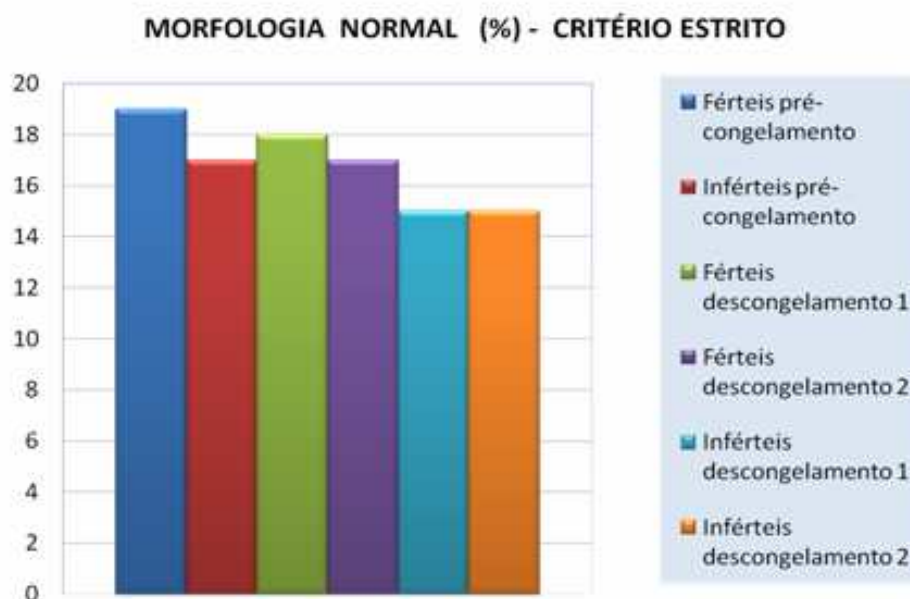


GRÁFICO 5 - Porcentagem de formas espermáticas normais pré-congelamento ($p=0,471$) e pós-descongelamento pelas técnicas 1 e 2 de indivíduos férteis ($p=0,791$) e inférteis ($p=1,000$).

O eixo x representa os valores expressos em porcentagem (%) e o eixo y representa os grupos dos indivíduos férteis e inférteis. Não foi observada diferença estatística significativa entre os parâmetros analisados, $p>0,05$, teste de *Mann-Whitney*.

4.1 Efeitos da técnica de descongelamento sobre a motilidade espermática dos homens férteis e inférteis

A motilidade espermática total e progressiva (A + B), após o descongelamento pelas técnicas 1 e 2, tanto no grupo fértil como infértil, diminuiu significativamente quando comparada com os valores pré-congelamento ($p<0,001$). No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa quando comparadas as técnicas de descongelamento entre si ($p>0,05$) (GRÁF. 2 e 3).

4.2 Efeitos das técnicas de descongelamento sobre a morfologia dos espermatozoides dos homens férteis e inférteis

O valor em porcentagem de espermatozoides com morfologia normal após o descongelamento pelas técnicas 1 e 2, nos grupos fértil e infértil, não foi significativamente diferente quando comparado com os valores pré-congelamento, assim como não houve diferença estatisticamente significativa quando comparadas as duas técnicas entre si ($p > 0,05$) (GRÁF. 5).

Os demais defeitos morfológicos também não apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparadas as duas técnicas entre si ($p > 0,05$).

Não houve aumento dos defeitos morfológicos da cabeça e de gota citoplasmática com o uso das técnicas de descongelamento 1 e 2, nos grupos fértil e infértil, quando comparados com os valores pré-congelamento ($p > 0,05$). Os defeitos na peça intermediária e na cauda não foram estatisticamente significativos quando comparados com os valores pré-congelamento em ambas as técnicas de descongelamento utilizadas ($p > 0,05$) (TAB. 2, 3 e 4).

4.3 Efeitos das técnicas de descongelamento sobre a integridade das membranas dos espermatozoides dos homens férteis e inférteis

Houve significativa diminuição nos valores percentuais dos espermatozoides reativos ao teste hiposmótico após o descongelamento pelas técnicas 1 e 2, nos grupos fértil e infértil, quando comparados com os valores pré-congelamento ($p < 0,001$). Entretanto, não houve diferença estatística significativa quando comparadas as técnicas de descongelamento entre si ($p > 0,05$).

Dessa forma, os resultados obtidos permitem sugerir que a técnica 2 de descongelamento seria viável, porque é executada em menos tempo, comparada com a técnica tradicional (três minutos e 20 segundos vs. 25 minutos, respectivamente).

5 DISCUSSÃO

A prática da criopreservação de sêmen humano é um procedimento amplamente realizado nos laboratórios que lidam com as técnicas de reprodução assistida. Mas, apesar de vários aspectos que envolvem as técnicas de criopreservação do sêmen terem melhorado ao longo das últimas décadas (WALTERS, 2009), a viabilidade espermática pós-descongelamento ainda permanece insatisfatória.

Sabe-se que a qualidade do sêmen humano é significativamente afetada durante a criopreservação (CALAMERA *et al.*, 2008). Os criodanos são ainda um fenômeno geral e qualquer que seja a técnica aplicada, é aceito que alguns efeitos deletérios ocorrem. Essas crioinjúrias incluem a diminuição da motilidade, perda da fluidez e integridade da membrana plasmática, estresse oxidativo levando à peroxidação lipídica, fragmentação do DNA, modificações do citoesqueleto e danos das organelas, acrossomo e mitocôndrias da célula espermática (PARAS *et al.*, 2008).

Atualmente, diversos protocolos de criopreservação têm sido desenvolvidos visando amenizar os danos provocados nos espermatozoides durante o congelamento. Esses protocolos, em sua maioria, utilizam temperaturas de descongelamento que variam de 20 a 37°C. As altas temperaturas de aquecimento, que comumente têm sido testadas e empregadas com bons resultados nos protocolos de descongelamento em sêmen de animais (BARBAS; MASCARENHAS, 2008; GARCIA *et al.*, 2009; OLIVEIRA, 2003; OSORIO, 2006; SNOECK, 2003), não têm sido usadas com espermatozoides humanos.

No intuito de somar esforços na busca de aperfeiçoamento dos protocolos de criopreservação do sêmen humano, este trabalho foi desenvolvido para avaliar e comparar a viabilidade dos espermatozoides humanos após descongelamento sob temperatura de 37 e 75°C, por meio dos parâmetros da motilidade, morfologia e integridade das membranas espermáticas.

5.1 Técnicas de descongelamento *versus* motilidade

Neste estudo, em ambas as técnicas de descongelamento as motilidades espermáticas total (%) e progressiva (A+B) diminuíram nos grupos fértil e infértil em relação aos valores pré-congelamento ($p < 0,001$). Entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa na comparação entre as técnicas ($p > 0,05$).

Várias pesquisas ressaltaram a queda da motilidade espermática após o descongelamento. Ngamwuttiwong e Kunathikom (2007) e Dejarkom e Kunathikom (2007) observaram alterações na qualidade espermática, entre elas a redução da motilidade em amostras de sêmen normozoospermicos criopreservados pela técnica do vapor de Nitrogênio líquido. Nesses trabalhos, a motilidade espermática antes do congelamento, avaliada de acordo com o manual de laboratório da OMS, visibilizada por meio de um microscópio óptico com contraste de fase e após contagem de pelo menos 100 espermatozoides móveis em vários campos escolhidos aleatoriamente, foi de $52,6 \pm 1,9$ e pós-descongelamento, usando a mesma técnica, foi de $23,2 \pm 10,6$ e $24,1 \pm 10,9$.

No estudo prospectivo conduzido por Calamera *et al.* (2008), a motilidade dos espermatozoides descongelados em banho-maria a 20, 37, 38, 39 e 40°C decresceu significativamente.

Ozkavukcu *et al.* (2008) enfatizaram que a criopreservação resultou em significativa redução nos parâmetros da motilidade espermática. Os espermatozoides com motilidade progressiva rápida (tipo A) antes do congelamento apresentaram valor médio de 29% e, após o descongelamento, o valor médio foi de 12% ($p < 0,05$). Os espermatozoides progressivos lentos (tipo B) diminuíram de 34 para 13% após a criopreservação ($p < 0,01$). A motilidade total (tipo A + B) diminuiu de 63 para 30% ($p < 0,01$).

Verza Jr., Feijó e Esteves (2009), ao estudarem a resistência dos espermatozoides humanos às crioinjúrias em ciclos repetidos de congelamento e descongelamento, usando o método rápido do vapor de Nitrogênio líquido, também registraram a queda progressiva e acentuada da motilidade dos espermatozoides a cada descongelamento.

QUADRO 1 - Motilidade espermática progressiva (A + B) pré e pós-descongelamento do presente estudo e de outros autores

Autores	Motilidade pré (A+B)	Motilidade pós (A+B)	Técnica de descongelamento	p
Presente estudo - férteis	63,81(%)	40 (%) Técnica 1	TA	<0,001
Presente estudo - inférteis	62,38 (%)	35 (%) Técnica 1	TA	<0,001
Presente estudo - férteis	63,81 (%)	30 (%) Técnica 2	BM 75°C, 20 seg.+ BM 37°C 3 min	<0,001
Presente estudo - inférteis	62,38 (%)	40 (%) Técnica 2	BM 75°C, 20 seg + BM 37°C 3 min	<0,001
Dejarkom e Kunathinkom (2007)	52,6 (%)	24,1 (%)	TA 10 min + estufa 37°C 10 min	=0,001
Ngamwuttiwong e Kunathinkom (2007)	52,6 (%)	23,2 (%)	TA 10 min + estufa aquecida 10 min	<0,001
Calamera <i>et al.</i> (2008)	74,4 (%)	48,6 (%) 37°C	BM 37°C	<0,05
Ozkavukcu <i>et al.</i> (2008)	63 (%)	30 (%)	TA 1 min + BM 37°C	<0,01
Verza JR., Feijó e Esteves (2009)	64,7 (%) (N)	50,6 (%) (normozoospermico)	TA 5 min + incubadora 37°C 20 min	<0,01

Todos eles apresentaram diminuição desse parâmetro após o descongelamento. BM = banho-maria; TA = temperatura ambiente; N- normozoospermico.

Vários outros autores descreveram os efeitos da criopreservação sobre a motilidade espermática e todos concluíram que houve diminuição significativa desse parâmetro (PARAS *et al.*, 2008; PUNYATANASAKCHAI *et al.*, 2008; VUTYAVANAICH; PIROMLERTAMORN; NUNTA, 2009).

A perda da motilidade do espermatozoide humano após a criopreservação é aceita como sendo causada por vários fatores, incluindo a integridade diminuída das membranas e devido aos criodanos das membranas nos compartimentos intracelulares, os quais afetam a síntese e o metabolismo energético. Alguns estudos pioneiros mostraram que a perda da motilidade foi provocada pela adição e remoção dos agentes crioprotetores, os quais causam o encolhimento e distensão da célula espermática além de seu limite de tolerância osmótica (PACEY; TOMLINSON, 2009).

Defeitos mitocondriais após a criopreservação também têm sido mencionados como responsáveis pela perda da motilidade. O estudo de

Ozkavukcu *et al.* (2008) referiu que a ultraestrutura da mitocôndria e membranas plasmáticas foi alterada juntamente com a diminuição dos espermatozoides e que a destruição das mitocôndrias geralmente ocorre em consequência dos danos disseminados na célula espermática.

Também tem sido reportado que a criopreservação dos espermatozoides humanos está associada à perda de fluidez da membrana plasmática e que o aumento da taxa de recuperação da motilidade está relacionada ao aumento da fluidez da membrana nas amostras frescas (CALAMERA *et al.*, 2008).

No presente estudo, um achado importante em relação à motilidade refere-se às amostras seminais submetidas ao descongelamento realizado pela técnica 2. Essa população espermática, tanto do grupo fértil como infértil, suportou bem a alta curva inicial de aquecimento (75°C por 20 segundos), demonstrado pelo fato de que as alterações espermáticas nessas amostras não foram superiores às amostras descongeladas pela técnica 1 ($p > 0,05$).

Apesar de temperaturas elevadas de descongelamento serem utilizadas rotineiramente com bom resultados em sêmens de animais (BARBAS; MASCARENHAS, 2009; BUENO *et al.*, 2001), poucos trabalhos têm sido desenvolvidos com descongelamento de sêmen humano por meio de protocolos desse tipo. Calamera *et al.* (2008) afirmaram que o uso de altas temperaturas durante o descongelamento deve ser rigorosamente controlado em termos de magnitude e duração, para evitarem-se danos às células.

A presente investigação salientou que a elevada curva de temperatura de descongelamento testada por meio da técnica 2 obteve resultados em relação à motilidade comparáveis ao descongelamento realizado sob temperatura ambiente.

Uma possível explicação para a mesma recuperação da motilidade espermática com a técnica de descongelamento 2 pode ser o fato de que as temperaturas elevadas impedem a ocorrência do fenômeno da recristalização, processo que ocorre quando cristais microscópicos de gelo formam outros maiores durante o descongelamento, que provocam danos físicos às células (SNOECK, 2003). Uma curva de aquecimento rápido evita a recristalização, permitindo, ainda, a restauração do equilíbrio intra e extracelular mais rapidamente que a curva de descongelamento lento (SNOECK, 2003). Os espermatozoides que são submetidos à taxa de congelamento lento devem também ser aquecidos lentamente durante o descongelamento, enquanto os espermatozoides que têm sido congelados

rapidamente devem ser descongelados rapidamente (KLIESCH, *et al*, 2009; HOSSAIM; NAGAMAN, 2008).

O princípio do congelamento e descongelamento rápidos é o que fundamenta o protocolo utilizado pela técnica de descongelamento 2 e, portanto, permite sugerir que esse fato possibilitou a recuperação da motilidade espermática, semelhantemente ao das amostras descongeladas pela técnica 1.

5.2 Técnicas de descongelamento *versus* morfologia espermática

Neste estudo, os valores percentuais dos espermatozoides morfologicamente normais pós-descongelamento não apresentaram alterações estatisticamente significativas em relação aos valores pré-congelamento no grupo fértil e infértil ($p=0,090$). Também não houve diferença estatística significativa quando se comparou o resultado das técnicas de descongelamento 1 e 2 entre si ($p>0,05$).

Os valores encontrados nesta pesquisa, referentes às formas normais dos espermatozoides pós-descongelamento, assemelharam-se aos resultados de Ngamwuttiwong e Kunathinkom (2007), que utilizaram a avaliação das formas dos espermatozoides conforme critério estrito de Kruger *et al.* (1988). Os valores com morfologia normal após a criopreservação não foram diferentes daqueles de antes do procedimento ($21,4\pm 4,3$ vs $24,2\pm 23,9$; $p=0,606$). Vutyavanaich, Piromlertamorn e Nunta (2009), cujo trabalho comparou métodos de congelamento rápido *versus* congelamento lento programado na criopreservação de sêmen humano, concluíram que os valores em média percentual dos espermatozoides morfologicamente normais não foram estatisticamente significativos após processo de congelamento e descongelamento em relação ao controle e nos dois protocolos utilizados ($p=0,7891$).

Há, entretanto, autores que exibem resultados que contrastam com os do presente experimento em relação à morfologia espermática normal pós-descongelamento comparado com valores pré-congelamento.

Em um estudo experimental de avaliação das crioinjúrias produzidas nos espermatozoides congelados de acordo com o método computadorizado controlado, Dejarkom e Kunathinkom (2007) realçaram valores diminuídos em todos

os parâmetros avaliados pós-descongelamento e, entre eles, a morfologia normal ($p=0,007$).

QUADRO 2

Comparação dos resultados do presente estudo com o de vários autores em relação às formas de espermatozoides normais pré e pós-descongelamento

Autores	Pré normal	Pós normal	Técnica	p
Presente estudo - férteis	19	18 (T1)	Hematoxilina/ Morfologia estrita	=0,090
Presente estudo - inférteis	17	15 (T1)	Hematoxilina/ Morfologia estrita	=0,090
Presente estudo - férteis	19	17 (T2)	Hematoxilina/ morfologia estrita	=0,090
Presente estudo - inférteis	17	15 (T2)	Hematoxilina/ morfologia estrita	=0,090
Dejarkom e Kunathikom (2007)	21,4	18	Critério estrito	=0,007
Ngamwuttiwong e Kunathikom (2007)	21,4	24,2	Critério estrito Kruger	=0,606
Vutyavanich, Piromlertamorn e Nunta (2009)	16,03	14,9 (SPF)	Diff-Quick/ critério estrito	>0,05
Vutyavanich, Piromlertamorn e Nunta (2009)	16,03	14,43 (RF)	Diff-Quick/ critério estrito	>0,05

T1- Técnica de descongelamento1; T2 – Técnica de descongelamento 2; SPF- Congelamento lento programado; RF – congelamento rápido .

Os resultados obtidos por Ozkavukcu *et al.* (2008) e Punyatanasakchai *et al.* (2008) também mostraram diminuição das formas morfológicas normais pós-descongelamento.

Uma explicação possível para estes resultados contrastantes em relação a esses outros trabalhos pode estar no fato de que nesses estudos a metodologia foi diferente da do presente trabalho, ou seja, Dejarkom e Kunathikom (2007) não fizeram referência ao corante e método usado antes da leitura das lâminas pelo critério estrito de Kruger *et al.* (1988). Punyatanasakchai *et al.* (2008) usaram coloração com eosina e azul de metileno e não mencionaram se houve fixação prévia das lâminas. No estudo de Ozkavukcu *et al.* (2008), as lâminas foram fixadas

em etanol antes do método de coloração de Papanicolau modificado ser realizado. Graves *et al.* (2005) afirmam que existe uma potencial variação na determinação da morfologia dos espermatozoides com as técnicas de coloração utilizadas e diferentes protocolos de coloração produzem diferentes tamanhos de cabeças espermáticas. Em um trabalho experimental que consistiu na comparação entre três técnicas de coloração morfológica para espermatozoides, Henkel *et al.* (2008) preconizaram que não é recomendado qualquer método rápido de coloração para a avaliação da morfologia dos espermatozoides humanos.

Outro fator que deve ser considerado é o tipo e uso de diferentes concentrações do agente crioprotetor. É sabido que existem crioprotetores que são mais deletérios aos espermatozoides do que outros, bem como quando se encontram em concentrações mais elevadas no meio de congelamento (OZKAVUKCU *et al.*, 2008; PARAS *et al.*, 2009; WIDIASIH *et al.*, 2009).

No presente trabalho, não se verificou diferença estatisticamente significativa em relação aos demais defeitos da morfologia espermática quando comparadas as duas técnicas de descongelamento entre si ($p > 0,05$).

Não houve aumento significativo na porcentagem de anormalidades espermáticas referentes à cabeça e gota citoplasmática após o descongelamento em relação aos valores pré-congelamento ($p > 0,05$). No entanto, a peça intermediária e a cauda não apresentaram diferenças estatísticas significativas ($p = 0,090$ e $p = 0,694$, respectivamente).

5.3 Técnicas de descongelamento *versus* integridade das membranas

O teste hiposmótico (THO) avalia se as membranas intactas são funcionais. Baseia-se no comportamento dos espermatozoides quando submetidos a um meio hiposmótico. Para equilibrar os meios extra e intracelular, ocorre influxo de água através da membrana, provocando edema, principalmente na região da cauda, manifestada na forma de vários tipos de enrolamento da mesma. Essas alterações podem ser facilmente visibilizadas pelo microscópio ótico (MISRO; CHAKI, 2008; OLIVEIRA, 2003).

Os resultados obtidos no presente trabalho revelam lesões na membrana plasmática dos espermatozoides, demonstradas pela porcentagem de células

espermáticas reativas ao teste hiposmótico pós-descongelamento que apresentou diminuição em relação aos valores pré-congelamento nos grupos férteis e inférteis e com o uso das técnicas de descongelamento 1 e 2 ($p < 0,001$). No entanto, quando comparados os dados entre as duas técnicas de descongelamento e grupos, não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

A queda na porcentagem de espermatozoides reativos ao THO após o descongelamento detectados no presente experimento é corroborada por outro estudo, no qual, após o descongelamento, a integridade das membranas dos espermatozoides foi significativamente reduzida (VUTYAVANAICH; PIROMLERTAMORN; NUNTA, 2009).

Essa redução na porcentagem de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico após o descongelamento já era esperada, pois se sabe que, no processo de criopreservação, ocorre mudança brusca de osmolaridade para os espermatozoides entre o sêmen fresco e criopreservado nos diluidores de congelamento, o que induz acentuada redução na porcentagem de células com membrana funcionalmente íntegra. O próprio meio de congelamento (hiperosmótico) pode acarretar ruptura de membrana, pois o estresse osmótico pode induzir, além de alterações na estruturas das membranas, mudanças nas estruturas microtubulares da cauda (SNOECK, 2003).

Os resultados obtidos no presente estudo acentuam que, apesar da redução na porcentagem de espermatozoides reativos ao THO, ambas as técnicas de descongelamento foram estatisticamente semelhantes em termos de danos na integridade da membrana plasmática.

6 CONCLUSÃO

As técnicas de descongelamento rápida e lenta mostraram a mesma recuperação de espermatozoides.

REFERÊNCIAS

- ABDELHAFEZ, F. *et al.* Techniques for cryopreservation of individual or small numbers of human spermatozoa: a systematic review. **Hum Reprod Up**, v. 15, n. 2, pp. 153 -164, 2009.
- ANDERSON, R. A. Fertility preservation techniques: laboratory and clinical progress and current issues. *Society for Reproduction and Fertility*, v. 136, p. 667-669, 2008
- BARBAS, J. P.; MASCARENHAS, R.D. Springer Science+Business Media B. V., 2008.
- BAUMANN, K. *et al.* Assisted reproduction using cryopreserved sperm: a mini review. **J Reproduk Endokrinol**, v. 4, n. 2, p. 97-100, 2007.
- BAUST, J. *et al.* Changing paradigms in biopreservation. **Biopreserv Biobank**, v. 7, n. 1, 2009.
- BUENO, R *et al.* Qualidade espermática do sêmen criopreservado de cães. II- Efeito de protocolo de resfriamento. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v. 53, n. 3, Belo Horizonte, jun. 2001.
- CALAMERA, J. C. *et al.* Effect of thawing temperature on the motility recovery of cryopreserved human spermatozoa. **Fertil Steril**, v. 5, p. 5, Dec. 2008.
- DEJARKOM, S; KUNATHINKOM, S. Evaluation of cryo-injury of sperm chromatin according to computer rate freezing method part 2. **J Med Assoc Thai**, v. 90, n. 5, p. 852-856, 2007.
- DOHLE, G. *et al.* Guidelines on male infertility. **Eur Assoc Urol**, 2008.
- FRANCO JÚNIOR, J.G. *et al.* **Reprodução assistida**. Rio de Janeiro: Revinter. 1997.
- GARCIA, J. C. *et al.* Thawing boar semen in the presence of seminal plasma: Effects on sperm quality and fertility. **An Reprod Sci**, 2009.
- GRAVES, J. E. *et al.* Developing techniques for determining sperm morphology in today's andrology laboratory. **J Assist Reprod Gen**, v. 22, n. 5, May 2005.
- HOOGENDIJK, C. F. ; KRUGER, T. F. ; MENKVELD, R. Anatomy and molecular morphology of spermatozoon. In : KRUGER, T. F.; OEHNINGER, S.C. (Ed.). **Male infertility diagnosis and treatment**. Londres: Informa, 2007.
- HOSSAIM, A; NAGAMAN, M. Cryopreservation of male gametes. In: RIZK, B. R. *et al.* **Book infertility and assisted reproduction**. Cambridge: Cambridge University Press, 2008.

HENKEL, R. *et al.* Comparison of three staining methods for the morphological evaluation of human spermatozoa. **Fertil Steril**, v. 89, n. 2, Feb. 2008.

HOURVITZ, A. *et al.* Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) using cryopreserved sperm from men with malignant neoplasm yields high pregnancy rates. **Fertil Steril**, v. 90, n. 3, Sep. 2008.

ISACHENKO, E., *et al.* Cryoprotectant-free vitrification of spermatozoa. In: TUCKER, M.; LIEBERMANN, J. **Vitrification in assisted reproduction**; a user's manual and trouble-shooting guide. Londres: Informa Healthcare, 2007.

ISHIKAWA, T. *et al.* Fertilization and pregnancy using cryopreserved testicular sperm for intracytoplasmic sperm injection with azoospermia. **Fertil Steril**, v. 92, n. 1, Jul. 2009.

JEYENDRAN, R. S. *et al.* Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **J Reprod Fertil**, v. 70, p. 219-28, 1986.

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**, v.141, p. 39-43, 2008.

KLIESCH, S., *et al.* In: NIESCHLAG, E.; BEHRE, H. M.; NIESCHLAG, S (ed.). **Andrology**. London, New York: Springer Heidelberg Dordrecht; 2009.

KRUGER, T. F. *et al.* Predictive value of abnormal sperm morphology in vitro fertilization. **Fertil Steril**, v. 49, p. 112-117, 1988.

LABORATÓRIO DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA. **Manual de procedimentos**. Red Latinoamericana De Reproducción Asistida, 2006.

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

McKINNON, A. O.; VOSS, J. L. (Eds.) **Equine reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993; p. 769-789.

MCLAUGHLIN, E. A.; PACEY, A. A. Cryopreservation and storage of spermatozoa. In: GARDNER, D. K. *et al.* **Textbook of assisted reproductive technologies laboratory and clinical perspectives**. Londres: Informa, 2009.

MEDEIROS, A. S. L. *et al.* Cryopreservation of stallion sperm using different amides. **Theriogenology**, v. 58, p. 273-276, 2002.

MISRO, M. M.; CHAKI, S. P. Development of a rapid, sensitive, and reproducible laboratory test kit for the assessment of plasma membrane integrity of human sperm. **Fertil Steril**, v. 89, n. 1, Jan. 2008.

MORAES, G. E. S. **Espermocitologia**: Espermocitograma em critério estrito. 2. ed. rev. atual. Caxias do Sul: EDUCS, 2007.

NEVES, P. A.; NETTO JUNIOR, N. R.. **Infertilidade masculina**. São Paulo: Atheneu. 2002.

NGAMWUTTIWONG, T; KUNATHINKOM, S. Evaluation of cryoinjury of sperm chromatin according to liquid Nitrogen vapour method (I), **J Med Assoc Thai**, v. 90, n. 2, p. 224-228, 2007.

OLIVEIRA, E. C. S. **Efeito de diferentes diluidores sobre a criopreservação do sêmen canino**. 2003, 60f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Programa de Pós-Graduação da Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

OSORIO J. P. **Efeito da adição fracionada de dimetil formamida e das curvas de congelamento na viabilidade *in vitro* pós-descongelamento do espermatozoide equino**. 2006. 61f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Programa de Pós-Graduação da Escola de Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

OZKAVUKCU, S. *et al.* Effects of cryopreservation on sperm parameters and ultrastructural morphology of human spermatozoa. **J Assist Reprod Genet**, v. 25, n. 8, p. 403-11, Aug. 2008.

PARAS, L. *et al.* Cryopreservation techniques: comparison of test yolk buffer versus SpermCryo and vapour *versus* computerized freezing. **J Compilat**, v. 40, p. 18-22, 2008.

PEIROUVI, T. *et al.* Vitriification induced apoptosis in spermatozoa from fertile and subfertile men. **Iran J Reprod Med**, v. 5, n. 3, pp: 117-120, Summer 2007.

PETRUNKINA, A. Fundamental aspects of gamete cryobiology. **J Reproduk Endokrinol**, v. 4, n. 2, p. 78-91, 2007.

PUNYATANASAKCHAI, P. *et al.* Comparison of cryopreserved human sperm in vapor and liquid phases of liquid nitrogen: effect on motility parameters, morphology, and sperm function. **Fertil Steril**, v. 90, n. 5, p. 1978-82, Nov. 2008.

SARAGUSTY, J. *et al.* Do physical forces contribute to cryodamage? **Boitechol and Bioengin**, v. 104, n. 4, Nov. 2009.

SCHÜFFNER, A. *et al.* Apoptose e peroxidação lipídica antes e após criopreservação. **Reprod Clim**, v. 23, n. 4, p. 176-84, 2008.

SILVA, B. *et al.* Is sperm cryopreservation an option for fertility preservation in patients with spinal cord injury: induced anejaculation? **Fertil Steril**, 2009.

SKRZYPEK, J.; KRAUSE, W. Sperm cryopreservation in cancer patients. **Reproduct Med Endokrinol**, v. 2, 2007.

SNOECK, P. P. N. **Aspectos da criopreservação de sêmen equino**: composição do meio diluidor, curvas de congelamento e fertilidade. 2003 69f. Tese (Doutorado em veterinária). Escola de Veterinária Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SOARES, J. B.; BORGES, E. **Curso prático de criopreservação de gametas e pré-embriões**. Curso prático de micromanipulação de gametas (ICSI). São Paulo; 1999.

SONG, Y. *et al.* The future potential of cryopreservation for assisted reproduction. **Cryobiology**, 2009.

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

TROTSMANN, M. *et al.* Semen quality in men with malignant diseases before and after therapy and the role of cryopreservation. **Eur Assoc Urol**, v. 52, p. 355-367, 2007.

VERZA JÚNIOR, S.; FEIJO, C.M.; ESTEVES, S.C. Resistance of human spermatozoa to cryoinjury in repeated cycles of thaw-refreezing. **Clinical Urology**, v.35, n. 5, p. 581-591, Sep-Oct, 2009.

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

WALTERS, E. M. The history of sperm cryopreservation. In: PACEY, A. A.; TOMLINSON, M. J. (Ed.). **Sperm banking**; theory and practice. Cambridge: Cambridge University Press, 2009.

WIDIASIH, D. *et al.* Multistep and single-step treatment of human spermatozoa with cryoprotectants. **Fertil Steril**, v. 92, n. 1, July 2009.

WONCHOCKIER, R. (Cord.). **I Consenso Brasileiro de Embriologia em Medicina Reprodutiva**. São Paulo: PRONUCLEO, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction**. Cambridge: 4th edn. University Press, 1999.

WYNS C. *et al.* Options for fertility preservation in prepubertal boys. **Hum Reprod Up**, v. 00, n. 0, p. 1-17, 2010.

YE, Y. *et al.* Evaluation of human sperm function after being cryopreserved within the zona pellucida. **Fertil Steril**, v. 92, n. 3, Sep. 2009.

ZHMAKIN, A. **Fundamentals of Cryobiology**. Berlin, Heidelberg: Springer; 2009.

APÊNDICES E ANEXO

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado a participar, como voluntário, de um projeto de pesquisa que estamos desenvolvendo no Laboratório de Reprodução Humana Prof. Dr. Aroldo Fernando Camargos do Hospital das Clínicas da UFMG, cujo título é **“COMPARAÇÃO ENTRE DUAS TÉCNICAS DE DESCONGELAMENTO DE SÊMEN HUMANO NORMOZOOSPÉRMICO: ESTUDO DUPLO-CEGO PROSPECTIVO”**, de responsabilidade do pesquisador, Prof. Dr. Aroldo Fernando Camargos.

Esta pesquisa tem por finalidade melhorar 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 pela masturbação em um frasco estéril para realização do espermograma. Após realizar essa análise, será utilizada apenas parte da amostra do seu ejaculado, o qual será congelado e armazenado em botijão contendo Nitrogênio líquido sob temperatura de -196°C durante o período de 14 a 45 dias. Ao fim desse tempo, o sêmen será descongelado e avaliado, sendo posteriormente descartado. O resultado do seu exame não será modificado ou prejudicado devido a esses procedimentos.

Seu sêmen não será utilizado, em hipótese alguma, para gerar gravidez. 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 essas 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 nenhuma compensação financeira adicional será disponível. Você dispõe de total liberdade para esclarecer-se sobre qualquer dúvida que possa surgir durante a pesquisa. Sua participação neste estudo é inteiramente voluntária e você poderá recusar-se a participar ou abandonar a pesquisa 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 _____.

Marco Aurélio Fernandes Vieira (pesquisador)

Telefones: 3409-9264 - 9613-0087

Aroldo Fernando Camargos (pesquisador principal)

Telefones: 3409-9264 - 8892-7138

Simone França Nery (pesquisadora)

Telefones: 3409-9264 - 8851-5083

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. Antônio Carlos, 6.627 – Unidade Administrativa II, 2º Andar, sala 2005 -
Pampulha, Belo Horizonte – MG. Fone: (31) 3409-4592.

APÊNDICE B - QUESTIONÁRIO DE HISTÓRIA REPRODUTIVA

Por favor, preencha este questionário antes de ser atendido pelo seu médico. Todas as informações obtidas a partir deste questionário permanecerão em sigilo e apenas poderão ser utilizadas após a sua permissão por escrito. Preencha corretamente todas as questões, pois elas serão relevantes.

Data:

Nome:

Data de nascimento:

Encaminhado pelo Dr.:

Data:

Nome da parceira:

Data de nascimento:

Questões (responda sim ou não)

Você tem filhos ou gravidez que resultou em aborto com a sua atual parceira? sim () não ()

Se a resposta foi não, passe para a questão 2. Se a resposta foi sim, responda:

1- Durante quanto tempo vocês tentaram ter filhos até a ocorrência da gravidez? _____ meses.

Idade das crianças:

Data de nascimento:

Se ocorreu abortamento:

Durante quanto tempo vocês tentaram ter filhos até a ocorrência da gravidez? _____ meses.

Quantos abortamentos ocorreram?

2- Durante quanto tempo você teve relações sexuais desprotegidas (sem a utilização de métodos anticoncepcionais) com a sua parceira atual sem a ocorrência de gravidez? _____ meses

Qual a média de relações sexuais semanais com a sua parceira? _____

Sua ejaculação é dolorosa? sim () não ()

Qual a cor do seu sêmen (esperma)?

branco () amarelo () marrom () vermelho ()

O volume do seu sêmen (quantidade) atualmente é menor do que quando você era mais jovem?

Sim () não ()

Sua micção (urina) é dolorosa após o sexo? Sim () não ()
 A sua urina fica turva (esbranquiçada) após o sexo? Sim () não ()
 Você tem problema com sua ereção (potencia sexual)? Sim () não ()
 Se a resposta foi sim, com que frequência?
 Em algumas vezes () Na maioria das vezes () Sempre ()

3- Você teve filhos ou gravidez com outras parceiras? Sim () não ()
 Se a resposta foi sim, durante quanto tempo vocês tentaram ter filhos até a ocorrência da gravidez? _____ meses.
 Quantos filhos? _____
 Primeira gravidez _____ meses
 Segunda gravidez _____ meses
 Terceira gravidez _____ meses
 Ocorreu gravidez com abortamento com outras parceiras? Sim () não ()
 Primeira gravidez _____ meses
 Segunda gravidez _____ meses
 Terceira gravidez _____ meses
 Data da gravidez
 Primeira gravidez _____ / _____
 Segunda gravidez _____ / _____
 Terceira gravidez _____ / _____

4- História urológica

Quando você nasceu você tinha:

dois testículos () um testículo () nenhum dos testículos no escroto (saco) ()

Com qual idade os pelos começaram a crescer no seu corpo? _____ anos

Você fez alguma cirurgia no:

pênis () escroto (saco) () testículo () rim ()
 bexiga () próstata () abdome () hérnia ()

Qual o tipo de cirurgia? _____ data _____ / _____ / _____

Alguma vez foi introduzido um cateter (tubo) pelo seu pênis até a bexiga?

Sim () não ()

Você já foi acometido por alguma dessas doenças?

gonorreia () sífilis () uretrites () infecções na bexiga ()
 infecções na próstata () infecções no testículo () infecções no pênis ()

Em caso de resposta afirmativa, qual o tipo de infecção? _____ data
 _____ / _____ / _____

Houve tratamento? Sim () não () Qual tipo?

Cirurgia () uso de medicamentos com prescrição médica ()
 uso de medicamentos sem prescrição médica ()

Você está tomando ou tomou nos últimos seis meses alguma medicação?

Sim () não () Qual(is)?

Início do tratamento _____ / _____ término do tratamento _____ / _____

Preparo de esperma? (Beneficiamento) Data _____ / _____ / _____

Inseminação intrauterina sim () não ()

Fertilização *in vitro* (FIV) sim () não ()

Injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) sim () não ()

Se a resposta foi sim: local: _____ Número de tentativas _____ Data
 _____ / _____ / _____

Você fuma cigarros? sim () não ()

Se a resposta foi sim, qual o número de cigarros/dia _____
Há quantos anos _____
Você faz uso de bebidas alcoólicas? Sim () não ()
Se a resposta foi sim:
cervejas por dia ____ vinho por dia ____ aguardente por dia ____
licor por dia _____ Há quantos anos _____
Você usa drogas? sim () não ()
Se a resposta foi sim: maconha () cocaína () outros tipos: _____
Qual é a sua ocupação (tipo de trabalho)? _____
Há quantos anos _____
Trabalho anterior _____

ANEXO – PARECER ÉTICO

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

Parecer nº. ETIC 348/08

**Interessado(a): Prof. Aroldo Fernando Camargos
Departamento de Ginecologia e Obstetrícia
Faculdade de Medicina - UFMG**

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 14 de outubro de 2008, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado "**Comparação entre duas técnicas de descongelamento de sêmen humano normozoospérmico: estudo duplo-cego prospectivo**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

**Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG**