

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**DESENVOLVIMENTO DE UM CRIOPROTETOR CONTENDO GOMA
ÁGAR PARA A CONSERVAÇÃO DE SÊMEN HUMANO**

FERNANDA GUIMARÃES VALVERDE

ARACAJU
FEVEREIRO – 2016

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**DESENVOLVIMENTO DE UM CRIOPROTETOR CONTENDO GOMA
ÁGAR PARA A CONSERVAÇÃO DE SÊMEN HUMANO**

Dissertação de Mestrado submetida à banca
examinadora para obtenção do título de
Mestre em Saúde e Ambiente, na área de
concentração Saúde e Ambiente.

FERNANDA GUIMARÃES VALVERDE

Orientadora
Profa. Dra. Isabel Bezerra Lima Verde

ARACAJU
FEVEREIRO – 2016

V215p

Valverde, Fernanda Guimarães

Potencial crioprotetor da goma ágar para a conservação do sêmen humano / Fernanda Guimarães Valverde ; orientação [de] Profª. Drª Isabel Bezerra Lima Verde. – Aracaju: UNIT, 2016.

62 p.; il.

Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) - Universidade Tiradentes, 2016.

Inclui bibliografia.

1. Espermatozoides. 2. Criopreservação. 3. Sêmen. I. Lima-Verde, Isabel Bezerra (orient.). I. Verde, Isabel Bezerra Lima. (orient.) II. Universidade Tiradentes. III. Título.

CDU: 665.941:575

DESENVOLVIMENTO DE UM CRIOPROTETOR CONTENDO GOMA ÁGAR PARA A CONSERVAÇÃO DE SÊMEN HUMANO

Fernanda Guimarães Valverde

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À BANCA EXAMINADORA PARA A
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM SAÚDE E AMBIENTE, NA ÁREA DE
CONCENTRAÇÃO SAÚDE E AMBIENTE.

Aprovada por:

Profa. Dra. Isabel Bezerra Lima Verde
Orientadora

Dra. Valesca Barreto Luz
EMBRAPA Tabuleiros Costeiros

Prof. Dr. Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque
Júnior
Universidade Tiradentes

Profa. Dra. Francine Ferreira Padilha
Universidade Tiradentes
(Suplente)

ARACAJU
FEVEREIRO – 2016

DEDICATÓRIA

A todos os professores que fazem da sua profissão uma luta diária em busca de um ideal: educação para todos.

Aos alunos que se dedicam em busca de conhecimento almejando uma melhor qualidade de vida.

A minha família e amigos, fonte de inspiração, coragem e força.

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO

LISTA DE FIGURAS

LISTAS DE SIGLAS E ABREVIACÕES

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO

2 JUSTIFICATIVA

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

3.1 Objetivo Específico

4 CAPÍTULO I – REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Importância das técnicas de Reprodução Humana Assistida

4.2 Criopreservação seminal

4.3 Crioprotetores

4.4 Goma ágar

4.5 Técnicas de Análise Seminal

4.5.1 Motilidade

4.5.2 Integridade Espermática

5. CAPÍTULO II - MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Ética

5.2 Seleção das amostras

5.3 Análise seminal

5.3.1 Análise seminal de rotina

5.3.2 Análise da integridade espermática

5.4 Protocolo experimental

5.4.1 Grupos experimentais

5.4.2 Preparo dos meios de criopreservação

5.4.3 Adição dos meios de criopreservação ao sêmen

6. REFERÊNCIAS

7. CAPÍTULO III – RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 Artigo 1

8. ANEXOS

ANEXO 1

ANEXO 2

ANEXO 3

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação intitulada “**Desenvolvimento de um crioprotetor contendo goma ágar para a conservação de sêmen humano**”, se insere interdisciplinarmente na linha de pesquisa do Programa Stricto Sensu em Saúde e Ambiente: “Ambiente, Desenvolvimento e Saúde”.

A pesquisa está dividida em:

- Introdução contextualizada.
- Objetivos do estudo.
- Fundamentação teórica, onde são abordados os temas: Importância das Técnicas de Reprodução Humana Assistida; Criopreservação Seminal; Crioprotetores; Goma Ágar; Técnicas de Análise Seminal; Motilidade e Integridade Espermática.
- A metodologia, que trata de todo o delineamento da pesquisa.
- Resultados e Discussão, onde é exposto um artigo científico resultante da produção da pesquisa.
- Conclusão, onde são apontados os resultados e as expectativas de contribuição desde trabalho, bem como as sugestões para estudos futuros.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Estrutura química da goma ágar
- Figura 2 Fluxograma do protocolo utilizado no estudo
- Figura 1 Protocolo experimental utilizado no estudo
- Figura 2 Análise comparativa entre os parâmetros de motilidade total; motilidade progressiva, % de espermatozóides viáveis e % de espermatozóides com morfologia normal.
- Figura 3 Análise comparativa da integridade espermática em relação a avaliação da integridade da membrana plasmática, acrossomal e atividade mitocondrial nos diferentes grupos experimentais.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

AC	Acrossomal
AM	Atividade Mitocondrial
DCF	Diacetato de Carboxifluoresceína
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EROs	Espécie Reativa de Oxigênio
FITC	Isocianato de Fluoresceína
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
GA	Goma Ágar
GEYC	Glycerol Egg-Yolk Citrate
IA	Inseminação Artificial
ICSI	Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóides
IUI	Inseminação Intrauterina
IP	Iodeto de Propídio
JC-1	Iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina
MP	Membrana Plasmática
OMS	Organização Mundial de Saúde
PGD	Diagnóstico Genético Pré- Implantacional
pH	Pontes de Hidrogênio
PNA	<i>Psium sativum</i> Agglutinin
PSA	Peanut Agglutinin
RHA	Reprodução Humana Assistida
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TYB	Test Yolk Buffer

DESENVOLVIMENTO DE UM CRIOPROTETOR CONTENDO GOMA ÁGAR PARA A CONSERVAÇÃO DE SÊMEN HUMANO

RESUMO

A infertilidade masculina está diretamente relacionada com a qualidade espermática e a dificuldade de tratamento ligado a infertilidade conjugal tem incentivado a procura e as pesquisas sobre a técnica de criopreservação seminal. Para preservar a funcionalidade espermática os espermatozoides são criopreservados em baixas temperaturas, entretanto, este processo pode ocasionar injúrias na célula. Na tentativa de minimizar esses danos, diversos crioprotetores têm sido desenvolvidos. Este trabalho tem como objetivo avaliar o efeito da adição da goma ágar (GA) na solução crioprotetoras, sobre a conservação de sêmen humano. Este estudo foi realizado em clínica especializada em reprodução humana assistida, em conjunto com a Universidade Tiradentes – UNIT (Aracaju/SE – Brasil). Os pacientes que preencheram os critérios de inclusão, voluntariamente, assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e foram convidados a participar da pesquisa, mediante esclarecimento dos termos e concordando com os procedimentos a serem realizados. Foram selecionadas 33 amostras seminais normais, coletadas e analisadas no período de Julho a Outubro de 2015. A análise seminal de rotina (tempo de liquefação, aferição do volume e do pH, viscosidade, motilidade, vitalidade e morfologia) foi realizada nas amostras a fresco e criopreservadas. Nas amostras criopreservadas também foi avaliada a integridade espermática (avaliação da integridade da membrana plasmática e acrossomal e da atividade mitocondrial) a partir do uso de sondas fluorescentes. As amostras foram divididas em seis grupos: (i) GEYC + GA 0,05%; (ii) GEYC + GA 0,10%; (iii) GEYC + GA 0,15%; (iv) GEYC + GA 0,2%; (v) TYB e (vi) GEYC. A adição dos meios crioprotetores às amostras seminais foi realizada de acordo com protocolos previamente estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde. Para dados estatísticos foram utilizados os testes de Shapiro-Wilk, ANOVA e Tukey com um nível de significância de 5%. Nos parâmetros de motilidade total e progressiva e percentual de espermatozoides viáveis, todos os grupos criopreservados contendo GA apresentaram resultados similares aos grupos controle v e vi ($p>0,05$). Nesses mesmos parâmetros as amostras a fresco apresentaram resultados significativamente superiores ($p<0,05$) quando comparadas aos demais grupos. Na análise morfológica somente o grupo contendo GA 0,05% apresentou resultados semelhantes ($p>0,05$) ao grupo a fresco. Em relação a integridade espermática todos os grupos criopreservados contendo GA apresentaram resultados semelhantes aos grupos controles v e vi ($p>0,05$). Desta forma, a GA na concentração de 0,05% apresenta-se como uma substância com potencial crioprotetor para espermatozoides humanos, pois foi capaz de manter a morfologia espermática normal após a criopreservação. O grupo contendo GA 0,05% apresentou-se como um potencial crioprotetor para espermatozoides humanos.

Palavras-Chaves: Ágar; Espermatozoides; Criopreservação; Sêmen.

A CRYOPROTECTANT CONTAINING DEVELOPMENT GUM AGAR FOR HUMAN SPERM CONSERVATION

ABSTRACT

Male infertility is directly related to sperm quality and the difficulty of treatment linked to marital infertility has encouraged the search and research on the seminal cryopreservation technique. Male infertility is directly related to sperm quality and the difficulty of treatment linked to marital infertility has encouraged the search and research on the seminal cryopreservation technique. To preserve the functionality sperm are cryopreserved at low temperatures, however, this process can lead to injuries in the cell. In an attempt to minimize such damage, several cryoprotectants have been developed. This work aims to evaluate the effect of adding the agar gum (GA) in cryoprotectant solution on the human semen conservation. This study was conducted in clinic specializing in assisted human reproduction, in conjunction with the University Tiradentes - UNIT (Aracaju / SE - Brazil). Patients who met the inclusion criteria voluntarily signed an Informed Consent and Informed (IC) and were invited to participate in the research by clarifying the terms and agreeing with the procedures to be performed. We selected 33 normal semen samples were collected and analyzed during the period from July to October 2015. A routine semen analysis (liquefaction time, measuring the volume and pH, viscosity, motility, vitality and morphology) was performed on the samples to cool and cryopreserved. In the cryopreserved samples was also evaluated sperm integrity (integrity assessment of the plasma and acrosomal membrane and mitochondrial activity) from the use of fluorescent probes. The samples were divided into six groups: (i) GEYC + GA 0.05%; (ii) GEYC + GA 0.10%; (iii) GEYC + GA 0.15%; (iv) GEYC + 0.2% GA; (v) TYB (vi) GEYC. The addition of cryoprotective media to semen samples was carried out according to protocols previously established by the World Health Organization. For statistical data were used Shapiro-Wilk test, ANOVA and Tukey's test at 5% significance level. The parameters of total and progressive motility and percentage of viable sperm, all cryopreserved groups containing GA showed similar results to v and control groups seen ($p > 0.05$). These same parameters as the samples to cool showed significantly better results ($p < 0.05$) when compared to the other groups. In the morphological analysis only the group containing GA 0.05% showed similar results ($p > 0.05$) to the group fresh. Regarding sperm integrity all cryopreserved groups containing GA showed similar results to the control groups v and vi ($p > 0.05$). Thus, the concentration of GA in 0.05% presents itself as a substance with the potential cryoprotectant to human sperm, it was able to maintain normal morphology after cryopreservation. The group containing GA 0.05% presented himself as a potential cryoprotectant for human spermatozoa.

Key Words: Agar; Spermatozoa; Cryopreservation; Semen.

1.INTRODUÇÃO

A infertilidade masculina está diretamente ligada com a qualidade dos espermatozóides, incluindo qualquer fator que provoque alteração no processo da espermatogênese, ocasionando redução da motilidade e viabilidade destas células (SHUFARO; SCHENKER, 2010). A dificuldade de tratamento relacionados a infertilidade masculina tem incentivado a procura e as pesquisas sobre a criopreservação de sêmen. Esta técnica associada à reprodução humana assistida (RHA) proporciona à maioria dos pacientes a oportunidade de gerar filhos, exercendo assim papel essencial na manutenção da fertilidade (TSAKMAKIDIS, 2010).

A criopreservação seminal permite submeter células espermáticas a temperaturas abaixo do ponto de congelamento da água e tem como premissa a preservação da composição e da viabilidade das células por tempo indefinido, inibindo de forma reversível o metabolismo celular (GASTAL, 2012). Esta técnica tornou-se uma ferramenta importante para a melhoria e para o desenvolvimento das técnicas de reprodução humana assistida, sendo considerada a maneira mais valiosa e atualizada de conservação da função reprodutiva em homens submetidos a tratamentos gonadotóxicos (TSAKMAKIDIS, 2010).

Os espermatozóides humanos toleram uma ampla faixa de temperatura entre o resfriamento e o aquecimento (SILVA *et al.*, 2015), devido ao seu baixo teor de água (cerca de 50%) (DI SANTO *et al.*, 2012). Entretanto a criopreservação promove efeitos danosos sobre a funcionalidade dos espermatozóides humanos, especificamente na motilidade, no qual estima-se que somente 50% dos espermatozóides móveis sobrevivem ao processo de congelamento e descongelamento (DI SANTO *et al.*, 2012). Além disso, este processo pode ocasionar lesões irreversíveis aos espermatozóides como alterações metabólicas na membrana plasmática e no acrossomo (MORRIS *et al.*, 2012). Entretanto, as células espermáticas após o processo de criopreservação devem manter boa motilidade e integridade da membrana para que tenham a capacidade de penetração no oócito (HOLT e VAN LOOK, 2004; GARAND *et al.*, 2010).

Para minimizar, prevenir e/ou eliminar as injúrias provocadas pela criopreservação utilizam-se substâncias crioprotetoras (CLARKE *et al.*, 2006; DI SANTO *et al.*, 2012). Estes agentes têm a função de evitar a formação de cristais grandes de gelo intracelular, reduzir o estresse osmótico por meio da reposição de água necessária para manutenção do volume celular, reduzir o ponto de congelamento da água, assim como servir de tampão para ajustes de possíveis alterações do pH (BITTENCOURT *et al.*, 2013; DI SANTO *et al.*, 2012). Alguns açúcares, agentes geleificantes e gomas já foram utilizados para uma melhor proteção da motilidade, viabilidade e funcionalidade da célula espermática, demonstrando efeito favorável na preservação desta célula (JAFAROGHILI *et al.*, 2011; TONIETO *et al.*, 2010; VANNI *et al.*, 2008).

Uma alternativa para o melhoramento da técnica é a utilização, no meio de criopreservação, de polissacarídeos naturais e atóxicos, que sejam preparados através de matérias primas renováveis e que possuam características que permitam a preservação de sêmen humano após a conservação em baixas temperaturas. Nesse contexto podemos destacar a goma ágar (GA), obtida pela extração de algas vermelhas, pertencentes à família *Rhodophyta* da espécie *Graciliaceae* e *Gelidiaceae* é comercialmente importante por sua propriedade geleificante, viscosificante, além de permitir a redução da formação de cristais de gelo. Possui alto potencial econômico, pois é utilizada em inúmeras áreas, como: base para culturas microbiológicas, meio de separação em cromatografia de coluna e eletroforese e na indústria de alimentos, como espessantes e geleificantes (SOUSA *et al.*, 2013), e ainda possui aplicações na área médica e farmacológica (ZHANG *et al.*, 2015).

2.JUSTIFICATIVA

A criopreservação seminal visa manter a funcionalidade de espermatozoides submetidos a temperaturas baixas, durante o congelamento ou resfriamento destes. Entretanto, esta técnica seguida de descongelamento pode provocar danos irreversíveis a estas células, resultando na redução da motilidade espermática e consequentemente causando redução do potencial fertilizante.

Desta forma, faz-se necessário desenvolver um produto que minimize os danos provocados pela criopreservação seminal. A realização de novos estudos nesta área tem como objetivo a otimização dos processos de criopreservação, fazendo com que os pacientes tenham diversidade de tratamento com uso de tecnologias diferenciadas.

A GA é um polissacarídeo com características que podem diminuir os efeitos adversos do processo de congelamento e descongelamento das amostras. Devido à inexistência de estudos que mostrem os efeitos da adição da GA à solução crioprotetora para conservação de espermatozoides, este trabalho tem como foco promover a inserção de um novo produto ao meio de criopreservação que, seja capaz de manter a funcionalidade da célula espermática após o congelamento. Para tanto, foi avaliado o efeito desta goma na criopreservação de sêmen humano utilizando a análise seminal de rotina e sondas fluorescentes.

3.OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Avaliar o efeito da adição da goma ágar em solução crioprotetora sobre a conservação de sêmen humano.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a adição da goma ágar em quatro concentrações distintas: GA 0,2%; GA 0,15%, GA 0,10% e GA 0,05% como substância crioprotetora na criopreservação de sêmen humano sobre os parâmetros de motilidade, vitalidade e morfologia espermática, bem como integridade de membrana plasmática e acrossomal e atividade mitocondrial
- Determinar a concentração ideal da goma ágar na solução crioprotetoras.

4. CAPÍTULO I: REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Importância das Técnicas de Reprodução Humana Assistida (RHA)

As primeiras pesquisas com a inseminação artificial na espécie humana ocorreram por volta de 1790, porém foi no final do século XIX que os estudiosos no assunto concluíram que a fertilização ocorre através da união entre o óvulo e o espermatozóide (MACHADO, 2010). Na década de 1970 ocorreram várias descobertas importantes com relação ao tema da fertilização artificial. Em 1978 na Inglaterra ocorreu o nascimento de Louise Brown, o primeiro bebê gerado através de fertilização *in vitro*. Após este acontecimento, na década de 1980, a ocorrência de nascimentos de bebês através de técnicas artificiais tornou-se um procedimento normal, com o aparecimento de diversas clínicas especializadas espalhadas ao redor do mundo (BRAGA; BORGES, 2010).

Para a maioria dos tipos de esterilidades existentes, existem técnicas de reprodução assistida. Nas situações em que o homem não produz espermatozoides ou seu número é insuficiente, há a opção de se recorrer ao banco de doadores de sêmen. Em casos onde a mulher tem ausência de óvulos, pode ocorrer a doação destes por parte de outra mulher e após a doação estes serão fecundados *in vitro*. Existe também a possibilidade da doação de embriões para casais estéreis, bem como os casos onde é possível recorrer à maternidade de substituição em situações onde o útero não tem condições de prosseguir com a gestação completa de um embrião previamente formado (CIPRIANO *et al.*, 2010).

Existe uma estimativa que 80 milhões de pessoas no mundo sejam inférteis, representando uma prevalência em torno de 13% a 15% dos casais em idade reprodutiva. Porém, esses números variam entre os países de acordo com o grau de desenvolvimento, bem como ao acesso ao tratamento (MILARDI *et al.*, 2012).

A aplicação das técnicas de RHA para tratar a infertilidade masculina é considerada a melhor opção de concepção, e a qualidade do sêmen é um fator significativo para o êxito das técnicas de RHA (TREFF *et al.*, 2011)

A infertilidade afeta cerca de 15% dos casais em idade reprodutiva, o que significa que mais de 80 milhões de casais em todo o mundo apresentam problemas relacionados com a função reprodutiva (LOURENÇO, 2012). No entanto, a infertilidade masculina é responsável

por 30% dos casos de casais que não conseguem ter filhos, sendo que as causas masculinas associadas a femininas representam 20% dos casos. Os problemas de infertilidade masculina estão presentes em 50% dos casos, o que faz desta circunstância um alvo para pesquisas no mundo (MYTHILI *et al.*, 2014).

Em homens com características seminais anormais e etiologia desconhecida este pode estar relacionado a fatores ocupacionais, como trabalho em altas temperaturas e/ou exposição ao uso de pesticidas e ambientais como estresse e poluição. As alterações seminais também podem ocorrer por defeitos genéticos, insuficiência fisiológica e endócrina, processos infecciosos, patologia a nível testicular, doenças metastáticas e síndromes (O'FLYNN *et al.*, 2010; TAVILANI *et al.*, 2011).

Além disso, existem indicações crescentes que o estilo de vida tem importância no estudo da fertilidade, podendo ser incluídos neste contexto fatores que podem reduzir o desempenho reprodutivo masculino tal como: obesidade, sedentarismo, fumo, dieta não balanceada, tensão psicológica, consumo de cafeína e álcool, dependência química e exposição a poluentes (MAGNUSDOTTIR *et al.*, 2005; HOMAN; DAVIES; NORMAN, 2007). O estresse oxidativo seminal, provocado pelas espécies reativas de oxigênio (EROs) pode ser resultante, dentre outras fontes, da poluição ambiental e está envolvido em vários fatores de infertilidade masculino que muitas vezes são constatados como sendo infertilidade sem causa aparente (AYDEMIR; ONARAN; KIZILER, 2007).

Em um contexto mais amplo, fatores biológicos que provocam infertilidade em homens e mulheres são muito variados e podem englobar, diagnósticos tais como: desordens ovulatórias, doença tubária, endometriose, anormalidades cromossômicas, fatores imunológicos, falhas na produção ou fragmentação do DNA de espermatozóides, doenças infecciosas, sexualmente transmissíveis que causam lesões do trato reprodutivo, idade avançada e infertilidade sem causa aparente (HOMAN; DAVIES; NORMAN, 2007).

Assim, as técnicas de Reprodução Humana Assistida têm como objetivo minimizar os problemas relacionados com a infertilidade e a esterilidade e propiciar o nascimento de bebês saudáveis. Dentre estas técnicas, podem ser destacadas a Inseminação Artificial (IA), a Fertilização *In Vitro* (FIV), a Injeção Intracitoplásmica de Espermatozóides (ICSI), o Diagnóstico Genético Pré-Implantacional (PGD) e a Criopreservação de gametas e embriões (OMS, 2010).

4.2 Criopreservação Seminal

A criopreservação pode ser definida como um conjunto de técnicas que permite a manutenção de uma variedade de tipos celulares e micro-organismos em condições de baixas temperaturas. É uma área com elevado potencial para o desenvolvimento de pesquisas (COSTA, 2010). Essa técnica permite que o espermatozóide seja submetido a baixas (-20 °C

a -80 °C em freezer) e a ultra-baixas temperaturas (-196 °C em nitrogênio líquido). No último caso, o processo ocorre na fase líquida ou de vapor do nitrogênio (-80°C), pois, o nitrogênio líquido proporciona a estocagem do material a temperatura constante, enquanto o freezer mecânico possui a desvantagem de variações na temperatura comprometendo a qualidade do material estocado (JUNGWIRTH *et al.*, 2008).

A técnica de criopreservação requer que as amostras de sêmen sejam submetidas ao resfriamento gradual e controladas, com o objetivo de preservar a sua função, para que ocorra a posterior fecundação do oócito (HOLT, 2000). De acordo com Kumar *et al.* (2003), o controle na diminuição gradual da temperatura reduz a possibilidade da perda de viabilidade celular, através da redução da formação de cristais de gelo no interior da célula.

A conservação de sêmen em baixas temperaturas permite sua utilização após um período longo e indeterminado. Entretanto, este procedimento pode gerar um grande estresse ao espermatozóide impondo condições muito desfavoráveis à manutenção de sua viabilidade (SILVA *et al.*, 2015).

Com relação à conservação de espermatozoides o termo choque térmico pode ser definido como alterações ocorridas na célula espermática quando esta é submetida à refrigeração rápida, saindo da temperatura corpórea ($\pm 38^{\circ}\text{C}$) para temperaturas próximas a 5°C . À medida que a temperatura se aproxima de 0°C , a atividade metabólica celular e a viabilidade das células diminui. Logo, a criopreservação reduz o metabolismo celular (BARBAS; MASCARENHAS, 2009). Este fenômeno pode resultar na diminuição irreversível da motilidade espermática em mudanças bioquímicas e funcionais destes gametas, incluindo redução da taxa de glicólise, respiração celular e frutólise, aumento da lise do DNA e liberação de material intracelular (WATSON, 2000).

A membrana plasmática da célula espermática é rica em fosfolípidos e apresenta-se assimétrica com fosfatidilcolina e esfingomielina localizadas no folheto externo da bicamada lipídica e fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina situadas no folheto interno. No processo de criopreservação, a membrana plasmática do espermatozóide passa por modificações para se adequar às mudanças de temperatura ocorrendo o movimento de translocação dos lipídeos, com externalização da fosfatidilserina (SILVA *et al.*, 2009). Entretanto, os mecanismos relacionados com esta troca dos lipídeos entre os folhetos internos e externos da membrana plasmática tais como a fosforilação da tirosina e efluxo de colesterol, observados nos espermatozoides criopreservados, são diferentes daqueles verificados no processo fisiológico da capacitação espermática (SILVA; GADELLA, 2006) e nem sempre serão benéficos para a célula espermática.

A técnica de criopreservação do sêmen é amplamente utilizada em várias circunstâncias sendo consideradas as seguintes situações: utilização de sêmen do doador, preservação da fertilidade, minimizar transmissão de doenças infecciosas e tratamento de

infertilidade (OMS, 2010). O sêmen proveniente de doadores conhecidamente saudáveis ou supostamente férteis pode ser armazenado por tempo indeterminado para uso futuro. Estes doadores podem ser selecionados em clínicas ou bancos de sêmen e sua utilização é feita de forma anônima. O sêmen proveniente de doação pode ser utilizado para inseminação IIU, FIV, ICSI em mulheres cujo parceiro é infértil sem espermatozóide vivos ou espermátides alongadas adequadas para ICSI, para prevenir a transmissão de doenças hereditárias ou infecciosas, após abortos recorrentes, e em todas as situações onde a inseminação com o doador tem potencial de resultar em uma gravidez bem sucedida e para mulheres que desejam engravidar, mas não tem um parceiro masculino (OMS, 2010).

Para a preservação da fertilidade, o sêmen pode ser colhido e armazenado antes que o homem passe por situações ou procedimentos que possam comprometer ou dificultar o processo de fertilização pelas vias naturais tais como: vasectomia, tratamento com agentes citotóxicos ou radioterapia e profissões de risco (OMS, 2010).

As técnicas utilizadas na criopreservação de sêmen humano, submetem a amostra a uma diminuição gradual da temperatura até que seja possível conservar as células em ambiente criogênico. Devido aos avanços na tecnologia, esse tipo de procedimento ocasionou o desenvolvimento de métodos eficazes que permitem a manutenção de vários tipos de células em temperaturas bem baixas, incluindo gametas masculinos e femininos, pequenos organismos multicelulares, e em organismos mais complexos, tais como embriões (DI SANTO *et al.*, 2012).

O processo de criopreservação necessita da adição de substâncias crioprotetoras ao meio com o intuito de proteção ao espermatozóides durante às etapas de congelamento e descongelamento, os quais podem causar danos irreversíveis a esta célula (WENG *et al.*, 2011). Ao submeter as células a baixas temperaturas, a mesma pode sofrer injúrias provocadas pela formação de cristais de gelo, ocorrendo danos à integridade celular (FRANCISCATO, 2015). Tais substâncias tem como principal função prevenir a cristalização via redução da atividade da água (COSTA, 2010).

Em espermatozóides humanos, a criopreservação tem mostrado ser um procedimento de bastante utilidade, principalmente em clínicas especializadas para tratamentos de infertilidade, tanto para conclusões de diagnósticos quanto ao fornecimento de amostras para as biotécnicas de reprodução assistida (BUFFONE *et al.*, 2012).

Além da adição de crioprotetores e meios específicos para congelamento, também estão disponíveis várias técnicas de criopreservação que vão desde processos de diminuição lenta de temperatura até processos com alta velocidade como a vitrificação, objetivando reduzir os possíveis danos celulares (BOITRELLE *et al.*, 2012; DI SANTO *et al.*, 2012).

4.3 Crioprotetores

O termo crioprotetor é aplicado a uma série de substâncias que oferecem temporariamente, energia e proteção aos danos provocados pela redução de temperatura bem como manutenção de um ambiente favorável à sobrevivência da célula armazenada (ACIPRESTE, 2014). Os agentes crioprotetores objetivam reduzir o estresse físico e químico proveniente do congelamento e descongelamento das células. As características físico-químicas ideais para um crioprotetor devem compreender baixo peso molecular, alta solubilidade em água e baixa toxicidade celular (LIMA, 2011).

As substâncias crioprotetoras utilizadas no congelamento de sêmen das mais variadas espécies têm a função de evitar ou diminuir a formação de grandes cristais de gelo dentro do espermatozóide, reduzir o estresse osmótico através da manutenção do volume celular, reduzir o ponto de congelamento da água e servir de tampão para manutenção do pH. A utilização de meios crioprotetores favorecem a redução de danos às células espermáticas e otimizam as técnicas de criopreservação de espermatozóides humanos, durante o processo de criopreservação (ETO *et al.*, 2014).

Desta forma uma solução crioprotetora adequada deve conter um crioprotetor não penetrante (crioprotetor externo, leite ou gema de ovo), um crioprotetor penetrante (crioprotetor interno: glicerol, etilenoglicol ou dimetilsulfóxido), um tampão (Tris), um ou mais açúcares (glicose, lactose, rafinose, sacarose e trealose), sais (citrato de sódio, ácido cítrico) e antibióticos (penicilina, estreptomicina). Além disso, esta solução deve ser atóxica para a célula (BARBAS; MASCARENHAS, 2009).

Apesar da ampla utilização, as soluções crioprotetoras bem como os métodos de criopreservação seminal ainda precisam ser aperfeiçoados visando uma melhoria para suas aplicações médicas e preservação da fertilidade. Após, o processo de congelamento e descongelamento, as células espermáticas devem apresentar boa motilidade e manter a integridade das membranas espermáticas para que tenham um maior potencial fertilizante. Qualquer falha relacionada com os aspectos fisiológicos do espermatozóide pode prejudicar sua capacidade de fertilizar o oócito bem como também de suportar o posterior desenvolvimento embrionário (ROSATO; IAFFALDANO, 2013).

Desta forma, faz-se necessária à otimização do processo de criopreservação através da utilização de compostos com potencial crioprotetor que possam provocar menos danos as células espermáticas. Dentre estes compostos, os polissacarídeos, como as gomas, possuem características que as classificam como um aditivo crioprotetor em potencial (GASTAL, 2012).

4.4 Goma Ágar (GA)

As gomas são polissacarídeos que atuam como reserva de energia em alguns vegetais terrestres ou marinhos e podem ser extraídos das raízes, dos tubérculos, dos caules, das sementes e da estrutura celular dos tecidos (JANI *et al.*, 2009). Possuem grande aplicabilidade na indústria alimentícia para espessar e geleificar soluções e controlar o crescimento de cristais de gelo, bem como para aprimorar e padronizar a qualidade dos alimentos processados. O uso destes polissacarídeos como espessantes está associado à capacidade que eles possuem de aumentar a viscosidade de um líquido, resultando em características organolépticas e texturas desejáveis em alimentos. A escolha da goma mais apropriada depende das suas propriedades físicas e químicas, e das condições de processamento, como temperatura e concentração (BUREY *et al.*, 2008).

Definem-se por serem um grupo de polissacarídeos, que são hidratados em água quente ou fria, e que em solvente apropriado geram uma solução viscosa ou gelatinosa e apresentam-se como substâncias incolores, inodoras, insípidas e atóxicas. (ALI; ZIADA ; BLUNDEN, 2009). Possuem estruturas complexas com um grande número de monossacárideos e ligações glicosídicas, a maioria deles com estruturas altamente ramificadas (SIMAS-TOSIN *et al.*, 2010).

As gomas são amplamente utilizadas no setor alimentício, farmacêutico e industrial. Comumente são utilizadas como espessantes, emulsificantes, geleificantes e agentes estabilizantes (PRAJAPATI *et al.*, 2013). Em contato com a água produzem efeito espessante, viscoso e/ou formação de géis. Esta propriedade de espessamento na água é comum a todas as gomas sendo as mais utilizadas para este fim as gomas xantana, guar, arábica, carragenano e ágar (BUREY *et al.*, 2008).

A GA é um polissacarídeo aniônico natural e um importante hidrocolóide industrial. Foi o primeiro a ser usado na indústria alimentícia na forma de géis e em diversas outras aplicações industriais. Foi descoberta em meados do século XVII no Japão e é extraída de diversos gêneros e espécies de algas marinhas vermelhas, da classe Rodophyta, onde ocorre como carboidrato estrutural na parede das células. As principais espécies de valor comercial são as agarófitas dos gêneros Gracilária (Gracilariaceae) (YARNPAKDEE *et al.*, 2015).

A GA está distribuída em três diferentes locais e desempenha funções diferentes nas algas: na parede celular promovendo resistência estrutural; entre as membranas citoplasmáticas, agindo com uma substância protetora; no espaço intracelular, atuando como reserva energética para o vegetal (SOUSA; GONÇALVES, 2015). Esta goma apresenta em sua composição fibras e sais minerais (P, Fe, K, Cl, I), celulose, anidrogalactose e uma pequena quantidade de proteínas (SOUSA *et al.*, 2013).

Proveniente de uma mistura de galactanas esta goma apresenta solubilidade em água. Entretanto, é insolúvel em água fria, porém absorve uma quantidade de água suficiente

para a formação de um gel não-absorvível, não-fermentável e atóxico. A dissolução em água quente é rápida e observa-se a formação de gel. Proporciona alta viscosidade mesmo em baixas concentrações, resistência à degradação em altas temperaturas, estabilidade com a maioria dos sais e alta capacidade de formar géis (SOUSA *et al.*, 2013).

A força de gel do ágar é influenciada pelos fatores de concentração, tempo e pH. O pH afeta notadamente a força de gel do ágar: o decréscimo do pH reduz a força de gel. A viscosidade a temperaturas acima do seu ponto de geleificação é relativamente constante em pH de 4,5 a 9,0 e não é muito afetada pela força iônica dentro da gama de pH de 6,0 a 8,0. Entretanto, iniciada a geleificação, à temperatura constante, a viscosidade aumenta com o tempo. Geralmente, a viscosidade é menor a medida que a força do gel aumenta (LAL; O' CONNOR; EYRES, 2006; SOUSA *et al.*, 2013).

Com relação as suas propriedades físico-químicas a GA (Figura 1) é composta por agarose, um polissacarídeo neutro e comercialmente importante, e agarpectina, um polissacarídeo sulfatado (SOUSA; GONÇALVES, 2015; GIMÉNEZ *et al.*, 2013). O primeiro é um polímero neutro formado por uma molécula linear e livre de sulfatos, é representado por cadeias repetidas de unidades alternadas de β -1,3-D-galactose e α -1,4, 3,6-anidro-L-galactose. A segunda fração possui uma propriedade não geleificante e diferencia-se da agarose por ser um polissacarídeo sulfatado. A presença destes dois polímeros varia de acordo com a espécie da alga (VILLANUEVA *et al.*, 2010).

A GA possui alto potencial econômico sendo empregada em diferentes áreas, como: suporte para culturas bacterianas e meio de separação em cromatografia de coluna e eletroforese, na indústria de alimentos, como espessantes e gelificantes e ainda possuem aplicações na área médica, farmacológica e biológica (SOUSA *et al.*, 2013).

No setor alimentício, atua na conservação dos alimentos, por apresentar características que permite controlar a viscosidade formada em soluções, bem como a redução de danos causados pelo processo de congelamento (VILLANUEVA *et al.*, 2010). Sua principal função é a capacidade de ligar-se à água e formar géis. Essa capacidade é determinada pela agarose, o qual é o componente de maior predominância no ágar e é responsável pela elevada força geleificante, permitindo preservar a integridade do produto (WHABA; HASSAN, 2015).

Acredita-se que a GA possa contribuir na dinâmica de formação de cristais de gelo no meio, devido ao fato que este polissacarídeo possua propriedades como alto potencial de viscosidade, o que limita a formação destas estruturas, emulsificante, baixo peso molecular e atua na interface água/gordura, uma vez que sua estrutura possui um grupo polar e outro apolar, o que limita a difusão de moléculas de água e, portanto, limita também o crescimento de cristais de gelo (LAL; O' CONNOR; EYRES, 2006). Desta forma, a GA pode realizar proteção celular, auxiliando na manutenção principalmente da integridade da membrana

plasmática, favorecendo a preservação da viabilidade dos espermatozóides após o descongelamento.

Suas propriedades, fazem com que esse polissacarídeo se apresente como um potencial aditivo às soluções crioprotetoras de sêmen humano, preservando as células espermáticas (SOUSA; GONÇALVES, 2015).

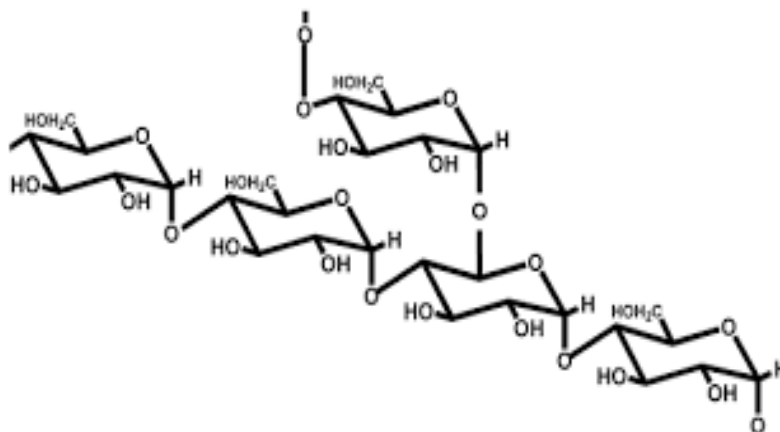


Figura 1: Estrutura química da goma ágar (www.insumos.com.br)

4.5 Técnicas de Análise Seminal

Considerada como um dos primeiros passos, a análise seminal está ligada na avaliação da infertilidade masculina (PENN, 2011). No entanto, a avaliação seminal não garante determinar a avaliação da função espermática e a fertilidade masculina. Este exame de rotina na prática clínica avalia o volume seminal, concentração espermática, pH, motilidade, vitalidade, morfologia e leucócitos (LAMB, 2010)

O espermograma é o teste de opção na averiguação da infertilidade conjugal por ser não invasivo e de fácil execução, mas ainda há muitas variações em relação à metodologia empregada para as análises (ANDRADE-ROCHA, 2008). A partir da análise seminal é possível obter informações necessárias sobre a funcionalidade dos órgãos genitais masculinos e seus possíveis distúrbios (ANDRADE-ROCHA, 2008; ELIASSON, 2010), que permitem direcionar qual o tipo de tratamento clínico e/ou cirúrgico será necessário (SAMPLASKI *et al.*, 2010).

O diagnóstico decisivo de infertilidade masculina ou a diminuição na qualidade espermática são difíceis de serem confirmados pela análise básica do sêmen. De acordo com Organização Mundial de Saúde (OMS, 2010), a análise seminal consiste em procedimentos pré-analíticos onde o paciente deve receber por escrito e de forma legível todas as informações necessárias para a coleta do material seminal. Além das etapas pré-analíticas, a análise seminal também necessita do exame macroscópico e microscópico. Nos exames macroscópicos incluímos a liquefação, que ocorre entre 15-30 minutos, em banho-maria a

37°C, a viscosidade, o aspecto, o volume e o pH. Entre os exames microscópicos podem ser incluídos índices relativos à concentração, motilidade, proporção de espermatozóides vivos e morfologia espermática. Dentro desse contexto é possível complementar o estudo necessário à determinação da qualidade do material.

4.5.1 Motilidade Espermática

A motilidade espermática pode ser avaliada de forma subjetiva com auxílio do microscópio, avaliando-se o percentual (0-100%) de espermatozóides que apresentam atividade cinética, ou seja, avalia a qualidade e a variação de movimento de células vivas em uma amostra de determinada quantidade de sêmen (BUFFONE *et al.*, 2012). Devendo ser avaliada após a liquefação da amostra, na tentativa de evitar efeitos deletérios de desidratação, pH e variação de temperatura (LAGE, 2013).

Após a focalização dos espermatozóides, os primeiros a serem contados devem ser os espermatozóides com motilidade progressiva, seguidos pelos de motilidade não progressiva e em seguida os imóveis (LAGE, 2013). De acordo com Salviano e Souza (2008), os movimentos dos espermatozóides não correspondem a um padrão único, pois há deslocamentos das células para frente (movimento progressivo), em circunferência (movimento circular) ou podem apenas se limitar a oscilar no campo microscópico (movimento oscilatório ou local). Em geral, exames dentro da normalidade devem apresentar o percentual de motilidade progressiva em no mínimo 32% e 40% de motilidade total, ou seja, progressiva e não progressiva (OMS, 2010).

A motilidade progressiva é de grande importância para a viabilidade espermática após o processo de criopreservação e, de acordo com Kumar (2000), este é o aspecto de maior importância para a fertilização, pois possibilita a movimentação da célula masculina até o gameta feminino. Entretanto, estudos desenvolvidos por Borges Júnior *et al.* (2003), mostraram não possuir relação da motilidade progressiva com taxa de gestação em mulheres inseminadas intrauterinamente, considerando a concentração espermática mais importante nos resultados de fertilização do que a motilidade espermática.

4.5.2 Integridade Espermática

A fim de obter tecnologias que comprovem maior reprodutibilidade para avaliar a morfologia e função espermática vários sistemas que utilizam a análise computadorizada de imagens têm sido desenvolvidos e empregados nos últimos anos (MATOS *et al.*, 2008; CELEGHINI *et al.*, 2010). Os programas computadorizados procuram ser mais objetivos às avaliações do que a habilidade humana em identificar padrões de motilidade ou de normalidade espermáticas (MATOS *et al.*, 2008).

Em outra visão, para que as técnicas de RHA possam apresentar melhores resultados, é necessário um estudo mais amplo sobre os vários aspectos relacionados à fisiologia da célula espermática e à melhoria dos testes aplicados para avaliar a viabilidade dos espermatozóides submetidos à criopreservação, uma vez que os danos ocasionados por esse procedimento causam danos às funções celulares, resultando em redução da fertilidade. Assim sendo, técnicas de marcações específicas para as diversas estruturas dos espermatozóides têm sido desenvolvidas (CELEGHINI *et al.*, 2010). Os métodos de coloração aplicando corantes fluorescentes (sondas fluorescentes ou fluorocromos) aumentaram a probabilidade de uma análise mais criteriosa da integridade espermática. As sondas fluorescentes são utilizadas isoladamente ou em combinação para determinar a integridade e a função celular (ARRUDA, 2000).

As sondas fluorescentes têm a habilidade de ligação nos pontos específicos das células espermáticas, diferenciando-se dos corantes, admitindo diagnóstico mais fácil e direto, na dependência de suas particularidades físicas. Ultimamente uma variedade grande de sondas fluorescentes é utilizada isoladamente ou em agregações, devido à avaliação das diversas estruturas espermáticas concomitantemente. Deste modo, o uso de sondas fluorescentes em microscopia de epifluorescência avalia: a integridade de membranas plasmática e acrossomal, o potencial mitocondrial, a translocação de fosfolipídios de membrana, o índice de fragmentação de DNA, a integridade do flagelo, a peroxidação lipídica, reação acrossômica (ARRUDA *et al.*, 2010, GARDES *et al.*, 2010).

Diante deste processo, inúmeros fluorocromos podem ser utilizados, isoladamente ou em associação visando facilitar a visualização das estruturas das células espermáticas determinando sua viabilidade (ZÚCCARI *et al.*, 2008).

Sondas com afinidade por DNA são utilizadas na avaliação da integridade da membrana plasmática, pois uma vez lesada esta estrutura, a substância é capaz de atravessá-la e corar o núcleo, onde se concentra o DNA. Silva e Gadella (2006) listaram diferentes sondas utilizadas com esta finalidade: Hoeschst 33258, Iodeto de Propídio (IP), Etídio Homodimérico, dentre outros. Estas sondas se caracterizam a partir de suas moléculas que se ligam no DNA, somente se a membrana celular for permeável. A sonda IP é impermeável a membranas intactas, entretanto é permeável a membrana lesada e apresenta afinidade pelo DNA corando-o em vermelho (HOSSAIN *et al.*, 2011).

Sondas com Diacetato de Carboxifluoresceína (DCF) são capazes de atravessar a membrana intacta e ligar-se às esterases, indentificando a célula viável. O DCF é um éster não polar, não fluorescente e permeável à membrana plasmática que ao entrar na célula é hidrolisado por esterases inespecíficas, resultando em um composto fluorescente e impermeável à membrana plasmática intacta que o fixa e fluoresce na cor verde (MEDINA *et al.*, 2000).

Em relação à avaliação do acrossomo, Silva e Gadella (2006), identificaram as lecitinas, pois, são capazes de interagir com carboidratos existentes exclusivamente nas glicoproteínas da membrana acrossomal. As mais utilizadas são a *Pisum sativum* Agglutinin (PSA), derivada da ervilha e a Peanut Agglutinin (PNA) derivada do amendoim que ao serem associadas ao Isocianato de Fluoresceína (FITC) promovem a sua visualização ao microscópio de imunofluorescência. PNA é uma lecitina que apresenta especificidade a glicoproteínas da membrana acrossomal e é utilizada para diferenciar acrossomos reagidos de intactos (MEDINA *et al.*, 2000).

Quanto a avaliação da função mitocondrial espermática a sonda fluorescente JC-1 (iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina) é mais eficaz nessa classificação do potencial da membrana mitocondrial e identifica populações de mitocôndrias como diferentes potenciais de membrana através de códigos de cores. Sua cor altera do verde para laranja ou vermelho, de acordo com o aumento do potencial de membrana (REERS *et al.*, 1991). Este tipo de sonda também promove a distinção de dois níveis de função mitocondrial através da intensidade da cor apresentada pela mitocôndria: alto e baixo potencial de atividade mitocondrial (GUTHRIE; WELCH, 2006).

5. CAPÍTULO II: MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Ética

O estudo foi realizado em clínica especializada em reprodução humana assistida, em conjunto com a Universidade Tiradentes – UNIT (Aracaju/SE – Brasil). Este trabalho foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da UNIT e no momento da sua execução, foi disponibilizado um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) onde os pacientes que preencheram os critérios de inclusão e exclusão foram convidados a participar da pesquisa, mediante esclarecimento dos termos deste estudo, concordando com a participação voluntária dos procedimentos a serem realizados.

5.2 Seleção da Amostra

Pacientes que realizaram espermograma no período compreendido entre Julho e Outubro de 2015 e que preencheram os critérios de inclusão como: idade entre 18 e 45 anos, 2 a 7 dias de abstinência ejaculatória e sem distúrbios ejaculatórios, sem anomalia pélvica ou testicular, uma ejaculação na mesma coleta e sem perda seminal, parâmetros seminais normais quanto à qualidade e quantidade espermática foram convidados a participar da pesquisa. Entretanto, aqueles que apresentaram perda de plasma seminal no momento da coleta, análise seminal abaixo ou acima dos valores de referência, presença de distúrbios e/ou alterações ejaculatórias, ocorrência de mais de uma ejaculação no mesmo recipiente no

momento da coleta, pacientes vasectomizados, presença de anomalias pélvicas e/ou testiculares clinicamente significativas não puderam participar da pesquisa.

Após análise seminal de rotina, 33 amostras que apresentaram parâmetros seminais normais (concentração espermática mínima de 15×10^6 espermatozóides/mL, mínimo de 32% de motilidade progressiva) foram incluídos neste estudo.

5.3 Análise Seminal

5.3.1 Análise Seminal de Rotina

A análise seminal de rotina foi realizada no Laboratório de Andrologia da Cemise Vida, em Aracaju-SE, utilizando as amostras de sêmen a fresco e amostras criopreservadas. Esta avaliação foi realizada de acordo com os parâmetros preconizados pela Organização Mundial de Saúde (2010) que inclui tempo de liquefação em placa aquecida a 37°C, aferição de volume pH, viscosidade, concentração espermática, motilidade, vitalidade e morfologia.

A concentração espermática foi estimada através da câmara de Makler no qual contou-se o número de espermatozóides em 30 quadrantes e o resultado foi dividido por três para se ter a concentração em 10^6 /mL. A motilidade foi verificada por essa técnica, na qual os espermatozóides foram classificados em três categorias: motilidade progressiva (espermatozóides com movimentos ativos, lineares ou em círculos grandes, independentemente da sua velocidade), motilidade não progressiva (todos os outros padrões de motilidade com ausência de progressão) e imóvel (sem movimento). A vitalidade (% de espermatozóides viáveis) foi avaliada utilizando o corante eosina que é impermeável à membrana plasmática das células viáveis e cora somente espermatozóides não viáveis. A morfologia espermática (% de espermatozóides morfologicamente normais) foi avaliada através do critério estrito de Kruger *et al.*, (1987) utilizando microscópio óptico equipado com régua de Kruger em uma das oculares. Foram considerados normais os espermatozóides que apresentaram cabeça lisa e oval com eixo longo entre 5 e 6 μ m e eixo curto entre 2,5 e 3,5 μ m, acrossomos cobrindo de 40 a 70% do volume da cabeça, peça intermediária com até 1 μ m de largura e comprimento de até uma vez e meia o comprimento da cabeça e ausência de anomalia na cauda.

5.3.2 Análise da Integridade Espermática

Após a criopreservação, foram realizadas as análises da funcionalidade espermática através da utilização de sondas fluorescentes, avaliando membranas citoplasmáticas e acrossomal e atividade mitocondrial. Para esta análise, utilizou-se um microscópio de epifluorescência (Nikon Eclipse 50i) equipado com filtro B2A com excitação de 400-570nm e emissão de 460-610nm, um espelho dicróico de 505nm e um filtro de barreira de 520nm com magnificação de 400x.

Para avaliar a integridade da membrana citoplasmática, foi utilizado iodeto de propídio (IP) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) e diacetato de carboxifluoresceína (DIC) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). A integridade do acrossomo foi avaliada a partir do uso da aglutinina de amendoim (PNA – Peannut Agglutinin) conjugada com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). A sonda fluorescente usada para avaliar a atividade mitocondrial foi a JC-1 (iodeto de 5,5',6,6'tetracloro-1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), um corante catiônico lipofílico.

O protocolo para a utilização de sondas fluorescentes foi adaptado pela metodologia proposta por Celeghini *et al.* (2007). Sucintamente, 50 µL das amostras seminais foram colocadas em um eppendorf e 50 µL de PBS foram adicionados. Em seguida, 5 µL de DCF foram depositados e a amostra foi incubada por 10 minutos em banho-maria a 37°C. Após este período, 2 µL de IP e 50 µL de solução de PNA (20 µL de PNA + 150 µL de PBS) foram adicionados e uma nova incubação foi feita por 8 minutos em banho-maria a 37°C. Então, 10 µL de JC-1 foram adicionados e a amostra foi submetida a temperatura ambiente por 10 minutos. Após este preparo, 5 µL da amostra foi depositada em lâmina/lamínula e 100 espermatozóides foram avaliados imediatamente em microscópio de epifluorescência de acordo com o padrão de coloração.

5.4. Protocolo Experimental

5.4.1 Grupos Experimentais

O protocolo experimental que foi utilizado neste estudo está representado na Figura 2. As amostras provenientes de cada paciente foram divididas em seis alíquotas. Seis diferentes meios de cultura foram utilizados para a criopreservação das amostras seminais:

- (I) TYB: meio comercialmente disponível usado como controle;
- (II) GEYC: meio preparado de acordo com o Manual Laboratorial para Exame e Processamento de Sêmen Humano (OMS, 2010);
- (III) GA 0,05: GEYC + 0,05% de goma ágar;
- (IV) GA 0,10: GEYC + 0,10% de goma ágar;
- (V) GA 0,15: GEYC + 0,15% de goma ágar;
- (VI) GA 0,20: GEYC + 0,20% de goma ágar.

A determinação das concentrações da GA adicionadas ao meio GEYC foi baseada em testes prévios.

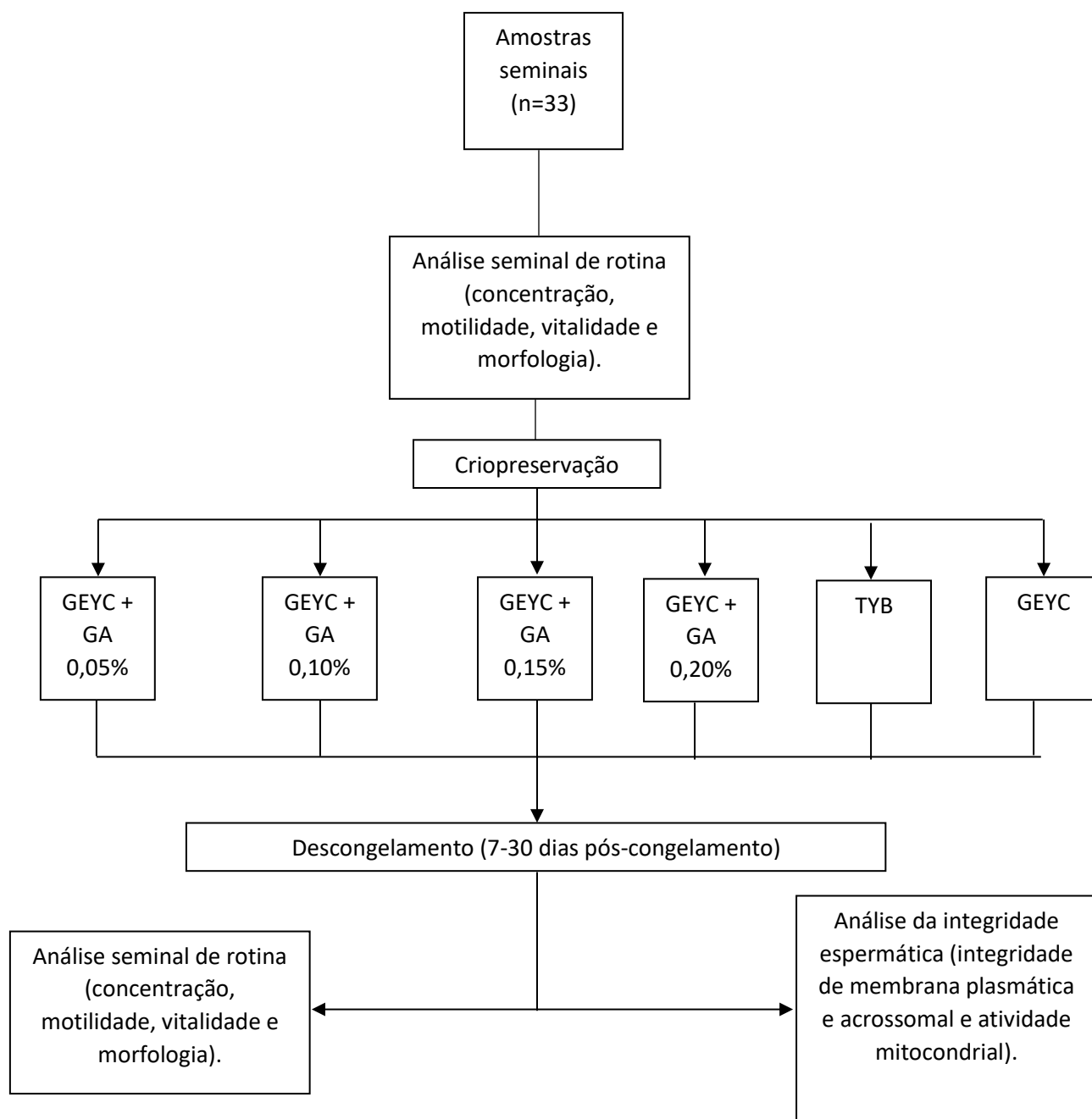


Figura 2– Fluxograma do protocolo utilizado no estudo.

5.4.2 Preparos dos Meios de Criopreservação

Os meios de criopreservação TYB e GEYC são reconhecidos como padrão ouro na literatura (ZHU *et al.*, 2014). O meio TYB é amplamente utilizado em protocolos de criopreservação, sendo um meio comercial de referência. O meio GEYC é composto por glicose, citrato de sódio, glicerol, glicina e gema de ovo e foi preparado previamente para a realização deste experimento, conforme o manual da OMS (2010), seguindo o seguinte protocolo: em 65 mL de água estéril purificada foram adicionados 1,5 g de glicose e 1,3 g de

citrato de sódio tribásico dihidratado. Em seguida, foram adicionados 15 mL de glicerol. Após homogeneização, foram colocados 1,3 g de glicina e quando dissolvido, a solução foi filtrada utilizando um filtro de 0,45 µm. Em seguida, foram colocados 20 mL de gema de ovo fresco e, em seguida, a suspensão foi colocada em banho-maria a 56°C durante 40 minutos. O pH da solução foi verificado e ajustado na faixa de 6,8-7,2. Após o preparo do GEYC, a GA foi adicionada, de acordo com o grupo experimental, nas seguintes concentrações: 0,05%, 0,10% e 0,15% e 0,20%. Para a definição destes grupos foram realizados testes prévios.

5.4.3 Adição dos Meios de Criopreservação ao Sêmen

A adição dos meios crioprotetores às amostras seminais foram realizadas de acordo com protocolos previamente estabelecidos (OMS, 2010).

O protocolo de adição do meio TYB às amostras seminais foram realizadas de acordo com instruções do fabricante do produto (Irvine Scientific). Resumidamente, o meio TYB foi descongelado à temperatura ambiente e aquecido a 37°C e, após determinação do volume seminal, o meio foi misturado com o sêmen gota a gota na proporção 1;1 (v/v). Em seguida, a mistura foi refrigerada em geladeira entre 2 e 5°C por 90 minutos para permitir um resfriamento lento a 0,5°C/min. Na sequência, a mistura foi submetida a -20°C por 30 minutos, e, então em vapor de nitrogênio líquido (-80°C) por 30 minutos antes de ser colocada diretamente no nitrogênio líquido (-196°C).

O protocolo de adição às amostras seminais do meio GEYC e dos meios contendo GEYC +GA em diferentes proporções foi de acordo com o protocolo estabelecido pela OMS (OMS, 2010). Para tanto, foi feito o descongelamento do crioprotetor à temperatura ambiente e seu aquecimento a 37°C e, após a determinação do volume seminal, foi adicionado na proporção (1:1, v/v) gradualmente em 5 adições com mistura suave por aproximadamente 10 minutos. Após a adição do crioprotetor, a mistura foi incubada a 30-35°C por 5 minutos em banho-maria. Em seguida, a mistura foi colocada a -20°C por 30 minutos, e, então em vapor de nitrogênio líquido (-80°C) por 30 minutos antes de ser colocada diretamente no nitrogênio líquido (-196°C).

As amostras criopreservadas foram descongeladas em um intervalo de 7 a 30 dias após o processo. Neste contexto, as alíquotas de sêmen de cada grupo experimental foram submetidas à temperatura ambiente por 10 minutos e depois aquecidas a 37°C por 5 minutos. Após, esse período as amostras foram avaliadas da mesma forma que as amostras a fresco, utilizando como parâmetros concentração, motilidade, vitalidade, morfologia e integridade espermática.

5.5 Análise Estatística

Foi utilizada análise descritiva, incluindo média e desvio padrão, para avaliar dados numéricos. Para dados concludentes foi testado a normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Para a análise comparativa entre as amostras a fresco e grupos criopreservados, bem como entre estes últimos entre si foi utilizado a ANOVA seguida do Teste de Tukey. As análises dos dados foram realizadas utilizando os softwares estatísticos GraphPad Prisma 5.0. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

6. REFERÊNCIAS

ACIPRESTE, A.C. Avaliação da eficiência de crioprotetores permeantes e não permeantes no descongelamento rápido e lento do sêmen canino. *Ciênc. Anim. Bras.* 2014; 15(1): 107-114.

ALI, B.H.; ZIADA, A.; BLUNDEN, G. Biological effects of gum arabic: a review of some recente research. *Food and Chemical Toxicology* 2009; 47(1): 1-8.

ANDRADE-ROCHA, F.T. O exame de sêmen da infertilidade masculina: V- Exame Micorbiológico. *RBC* 2008; 40(1): 49-56.

ARRUDA, R.P. *Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozóide eqüino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA)* [Tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2000.

AYDEMIR, B.; ONARAN, I.; KIZILER, A.R. Increased oxidative damage of sperm and seminal plasma in men with idiopathic infertility is higher in patients with glutathione S-transferase Mu-1 null genotype. *Asian Journal Andrology* 2007; 9(1): 108-115.

BARBAS, J.P.; MASCARENHAS, R.D. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue Bank* 2009; 10(1): 49-62.

BITTENCOURT, R.F.; OBA, E.; RIBEIRO FILHO, A.L.; CHALHOUB, M.; AZEVEDO, H.C; BICUDO, S.D. Avanços na criopreservação do sêmen ovino I: diluidores e crioprotetores. *Ciênc. Anim. Bras.* 2013; 14(4): 522-536.

BOITRELLE, F.; ALBERT, M.; THEILLAC, C.; FERFOURI, F.; BERGERE, M.; VIALARD, F. *et al.* Cryopreservation of human spermatozoa decreases the number of motile normal spermatozoa, induces nuclear vacuolization and chromatin decondensation. *Journal of Andrology* 2012; 33(6): 1371-1378.

BORGES JÚNIOR, E.; ROSSI, L.M.; ROCHA, C.C. Importância dos parâmetros seminais nos resultados de inseminação intra-uterina. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetícia* 2003; 25(4): 243-248.

BRAGA, D.P.A.F; BORGES JUNIOR, E. Técnica de alta complexidade: ICSI. In: DZIK A.; PEREIRA D.H.M.; CAVAGNA M.; AMARAL W.N. *Tratado de Reprodução Assistida* 2010; Cap.6, Ed 1.

BUFFONE, M.G.; CALAMERA, J.C.; BRUGO-OLMEDO, S.; DE VICENTIIS, S.; CALAMERA, M.M.; STOREY, B.T. *et al.* Superoxide dismutase content in sperm correlates with motility recovery after thawing of cryopreserved human spermatozoa. *Fertility and Sterility* 2012; 97(2): 293-298.

BUREY P.; BHANDARI B.R.; HOWES T.; GIDLEY M. Hydrocolloid gel particles formation, characterization and application. *Critical Reviews in Food. Science Nutrition Hydrocolloid* 2008; 48(5): 361–377.

CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C.F. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma acrossomal and mitochondrial membranes. *Reproduction in Domestic Animal* 2007; 42(5): 479-488.

CELEGHINI, E.C.C.; ANDRADE, A.F.C.; RAPHAEL, C.F.; NASCIMENTO, J.; TICIANELLI, J.S.; DE ARRUDA, R.P. Damage Assessment of the Equine Sperm Membranes by Fluorimetric Technique. *Brazilian Archives Biology and Technology* 2010; 53(6): 1285-1292.

CIPRIANO, V.T.F.; MIORANZA, A.; FREITAS, G.C.; LOBO, R.B. Evaluation of seminal parameters in the indication of in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection in the treatment of the male factor fertility problem. *Reprodução & Climatério* 2010; 25(3): 104-109.

CIPRIANO, V.T.F.; FREITAS, G.C. O impacto da criopreservação seminal na qualidade seminal. *Reprodução & Climatério* 2013; 28(3): 112-116.

CLARKE, G.N.; LIU, Y.; BAKER, G. Recovery of human sperm motility and ability to interact with the human zona pellucida after more than 28 years of storage in liquid nitrogen. *Fertility and Sterility* 2006; 86(3): 721-722.

COSTA, E.C. *Conservação de amostras do vírus da Raiva mediante diferentes protocolos de criopreservação* [Tese]. Ceará: Universidade Estadual do Ceará; 2010.

DI SANTO, M.; TAROZZE, N.; NADALINI, M.; BOINI, A. Human sperm cryopreservation: update on techniques, effect on DNA integrity, and implications for ART. *Advances in Urology* 2012.

ELIASSON, R. Semen analysis with regard to sperm number, sperm morphology and functional aspects. *Asian Journal of Andrology* 2010; 12(1): 26-32.

ETO, T.; TAKAHASHI, R.; KAMISAKO, T.; HIOKI, K.; SOTOMARU, Y.A. Study on cryoprotectant solution suitable for vitrification of rat two-cell stage embryos. *Cryobiology* 2014; 68(1): 147-151.

FRANCISCATO, D.A. *Características físicas e morfológicas do semen de Bos Taurus e Bos indicus antes e após a criopreservação* [Dissertação]. São Paulo: Universidade Estadual Paulista –UNESP; 2015

GASTAL, G.D.A. *Xantana como aditivo crioprotetor externo para congelamento de sêmen ovino* [Dissertação]. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas; 2012

GIMÉNEZ, B.; LÓPEZ DE LACEY, A.; PÉREZ-SANTÍN, E.; LÓPEZ-CABALLERO, M.E.; MONTERO, P. Release of active compounds from agar and agar-gelatin films with green tea extract. *Food Hydrocolloids* 2013; 30(1): 264-271.

GUTHRIE, H.D.; WELCH, G.R. Determination of intracellular reactive oxygen species and high mitochondrial membrane potential in percoll- treated viable boar sperm using fluorescence-activated flow cytometry. *Journal of Animal Science* 2006, 84(8): 2089-2100.

HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science* 2000; 62(1-3): 03-22.

HOLT, W.V.; VAN LOOK, K.J.W. Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory tests of semen quality. *Reproduction* 2004; 127(5): 527-535.

HOMAN, G.F.; DAVIES, M.; NORMAN, R. The impact of lifestyle factors on reproductive performance in the general population and those undergoing infertility treatment: a review. *Human Reproduction Update* 2007; 13(3): 209-223.

HOSSAIN, M.S.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M.; NAGY, S.; SIQUEIRA, A.P.P.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Flow cytometry for the assessment of animal sperm integrity and functionality: state of the art. *Asian Journal of Andrology* 2011; 13(3): 406-419.

JAFAROGHILI, M.; KHALILI, B.; FARSHAD, A.; ZAMIRI, M.J. The effect of supplementattion of cryopreservation diluents with sugars on the post-thawing fertility of ram Ssemen. *Small Ruminant Research* 2011; 96(1): 58-63.

JANI, G.K.; SHAH, D.P.; PRAJAPATI, V.D.; JAIN, V.C. Goma e Mucilagens: excipientes versáteis para formulações farmacêuticas. *Asian Journal of Pharmaceutical Science* 2009; 4(5): 309-323.

JUNGWIRTH, A.; GIWERCMAN, A.; TOURNAYE, H.; DIEMER, T.; ZSOLT K.; DOHLE, G. *et al.* European association of urology guidelines on male infertility: the 2012 update. *European Association of Urology* 2012; 62: 324-332.

KUMAR, S. Cellular damages during cryopreservation and assessment of *In Vitro* fertilizing capacity of spermatozoa. *Indian Veterinary Medicine Journal* 2000; 24: 1-6.

KUMAR, S.; MILLAR, J.D.; WATSON, P.F. The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines. *Cryobiology* 2003; 46(3): 246-253.

LAGE, I.C.R.D. *Análise Seminal: Variabilidade da Concentração, Motilidade e Morfologia de Espermatozóides com o Emprego da Metodologia Preconizada pela Organização Mundial de Saúde*. [Dissertação]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2013.

LAL, S.N.D.; O'CONNER, L.; EYRES, A.D.V. Application of emulsifiers/stabilizers in dairy products of high rheology. *Advances in colloid and interface Science* 2006; 123-126: 433-437.

LAMB, D.J. Semen analysis in 21st century medicine: the need for sperm function testing. *Asian Journal of Andrology* 2010; 12(1): 64-70.

LIMA, D.T. *Efeito crioprotetor de lactose e glicose em células fúngicas imobilizadas em alginato de sódio como método de preservação de culturas*. [Tese]. Ceará: Universidade Federal do Ceará, 2011.

LOURENÇO, B.S.L.P. *Seleção de Ovócitos para as técnicas de Reprodução Assistida com base no estudo das Células do Cumulus*. [Dissertação]. Coimbra: Departamento de Ciências da Vida – Faculdade de Ciências e Tecnologia de Coimbra, 2012.

MAGNUSDOTTIR, E.V.; THORSTEINSSON, T.; THORTEINSDOTTIR, S.; HEIMISDOTTIR, M.; OLAFSDOTTIR, K. Persistent organochlorines, sedentary occupation, obesity and human males subfertility. *Human Reproduction* 2005; 20(1): 208-215.

MATOS, D.L.; ARAÚJO, A.A.; ROBERTO, I.G.; TONIOLLI, R. Análise computarizada de espermatozóides: revisão de literatura. *Revista Brasileira Reprodução Animal* 2008; 32(4): 225-232.

MEDINA, V.H.; VICENTE, W.R.R.; ESPER, C.R.; MALHEIROS, E.B. Uso de sondas fluorescentes para avaliação da integridade da membrana plasmática de espermatozóides ovinos antes e após congelamento. *ARS VETERINÁRIA* 2000; 16(3): 204-209.

MILARDI, D.; GRANDE, G.; SACCHINI, D.; ASTORRI, A.L.; POMPA, G.; GIAMPIETRO, A. et al. Male fertility and reduction in semen parameters: a single tertiary- care center experience. *Internetal Journal of Endocrinology* 2012.

MORRIS, G.J.; ACTON, E.; MURRAY, B.J.; FONSECA, F. Freezing injury: the special case of the sperm cell. *Cryobiology* 2012; 64(2): 71-80.

MYTHILI, R.; KINI, S.; MAHMOOD. T. Male fertility and infertility. *Obstetrics, Gynaecology & Reproductive Medicine* 2014; 24(11):326-332.

O'FLYNN, K.L.; VARGHESE, A.C.; AGARWAL, A. The genetic causes of male factor infertility: a review. *Fertility and Sterility* 2010; 93(1): 1-12.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Laboratory manual for the examination and processing of human semen. Geneva. Ed 5, 2010.

PENN, H.A.; WINDSPERGER, A.; SMITH, Z. PAREKATTIL, S.J.; KUANG, W.W.; KOLETTIS, P.N. et al. National semen analysis reference range reporting: adherence to the 1999 World Health Organization Guidelines 10 Years Later. *Fertility and Sterility* 2011; 95(7): 2320-2323.

PRAJAPATI, V.D., JANI, G.K.; MORADIVA, N.G.; RANDERIA, N.P. Pharmaceutical applications of various natural gums, mucilages and their modified forms. *Carbohydrate Polymers* 2013; 92(2): 1685-1699.

REERS, M.; SMITH, T.W.; CHEN, L.B. J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. *Biochemistry* 1991; 30(18): 4480-4486.

ROSATO, M.O.; IAFFALDANO, N. Cryopreservation of rabbit sêmen: Comparing the effects of different cryoprotectants, cryoprotectant-free vitrification, and the use of albumin plus osmoprotectants on sperm survival and fertility after standard vapor freezing and vitrification. *Theriogenology* 2013; 79(3): 508-516.

SALVIANO, M.B.; SOUZA, J.A.T. Avaliação andrológica e tecnológica do sêmen caprino. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 2008; 32(3): 159-167.

SAMPLASKI, M.K.; AGARWAL, A.; SHARMA, R.; SABANEKH, E. New generation of diagnostic tests for infertility: Review of specialized semen tests. *International Journal of Urology* 2010; 17(10): 839-847.

SHUFARO, Y.; SCENKER, J.G. Cryopreservation of human genetic nature. *Annals of New York Academy of Science* 2010; 1205(1): 220-224.

SILVA, P.F.N.; GADELLA, B.M. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology* 2006; 65(5): 958-978.

SILVA, A.R.; FONTENELE-NETO, J.D.; CARDOSO, R.C.S.; SILVA, L.D.M.; CHINIRÉA, V. H.; LOPES, M.D. Description of ultrastructural damages in frozen-thawed canine spermatozoa. *Ciência Animal Brasileira* 2009; 10: 595-601.

SILVA, C.G.; CUNHA, E.R.; BLUME, G.R.; MALAQUIAS, J.V.; BAO, S.N.; MARTINS, C.F. Cryopreservation of boar sperm comparing different cryoprotectants associated in media based on powdered coconut water, lactose and trehalose. *Cryobiology* 2015; 70(2): 90-94.

SIMAS-TOSIN, F.F.; BARRAZA, R.R.; PETKOWICZ, C.L.O.; SILVEIRA, J.L.M.; SASSAKI, G.L.; SANTOS, E.M.R. *et al.* Rheological and structural characteristics of peach tree gum exudate. *Food Hydrocolloids* 2010; 24: 486-493.

SOUSA, A.M.M.; BORGES, J.; SILVA, A.F.; GONÇALVES, M.P. Influence of the extraction process on the rheological and structural properties of agars. *Carbohydrate Polymers* 2013; 96(1): 163–171.

SOUSA, A.M.M.; BORGES, J.; SILVA, A.F.; RAMOS, A.M.; CABRITA, E.J.E.; GONÇALVES, M.P. Shaping the molecular assemblies of native and alkali-modified agars in dilute and concentrated aqueous media via microwave-assisted extraction. *Soft Matter* 2013; 9(11): 3131-3139.

SOUSA, A.M.M., GONÇALVES, M.P. Strategies to improve the mechanical strength and water resistance of agar films for food packaging applications. *Carbohydrate Polymers* 2015; 132: 196-204.

TAVILANI, H.; SETAREHBADI, A.; VATANNEJAD, A.; AMIRI, A. Different genotypes of apolipoprotein E in fertile and infertile males. *Clinical Biochemistry* 2011; 44(13): 285.

TONIETO, R.A.; GOULARTE, K.L.; GASTAL, G.D.A.; SCHIAVON, R.S.; DESCHAMPS, J.C.; LUCIA, T. Cryoprotectant effect of trehalose and low-density lipoprotein in extenders for frozen ram semen. *Small Ruminant Research* 2010; 93(2-3): 206-209.

TREFF, N.R.; SU, J.; TAYLOR, D.; JUNIOR SCOTT, R.T. Telomere DNA deficiency is associated with development of human embryonic aneuploidy. *Plos. Genet.* 2011; 7(6): e1002161.

TSAKMAKIDIS, I.A. Ram semen evaluation: Development and efficiency of modern techniques. *Small Ruminant Research* 2010; 92(1-3): 126-130.

VANNI, R.; ARABI, S.; GALLI, A. Storage of sheep at 4°C: comparison among different milk based extenders with or without gelatin. Budapest. In: *6° Meeting of Association for Applied Animal Andrology* 2008.

VILLANEUVA, R.D.; SOUSA, A.M.M., GONÇALVES, M.P.; NILSSON, M., HILLIOU, L. Produção e Propriedades de ágar da alga marinha invasora, *Gracilaria vermiculophylla* (Gracilariales Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology* 2010; 22(2): 211-220.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science* 2000; 60/61: 481-492.

WENG, L.; LI, W.; CHEN, C. ZUO, J. Kinetics of coupling water and cryoprotectant transport across cell membranes and applications to cryopreservation. *The Journal of Physical Chemistry B* 2011; 115(49): 14721-14731.

WHABA, M.I.; HASSAN, M.E. Novel grafted agar disks for the covalent immobilization of β -D-Galactosidase. *Biopolymers* 2015; 103(12).

YARNPAKDEE, S; BENJAKUL, S.; KINGWASCHARAPONG, P. Physico-chemical and gel properties of agar from *Gracilaria tenuistipitata* from the lake of Songkla, Thailand. *Food Hydrocolloids* 2015; 517: 217-226.

ZHANG, X., LIU, X., CAO, M., XIA, K., ZHANG, Y. Preparation of hydroxypropyl agars and their properties. *Carbohydrate Polymers* 2015; 129: 87-91.

ZHU, J.; JIN, R.T.; WU, M.; JOHANSSON, L.; GUO, H.; LIU, Y.S.; TONG, X.H.J. Cryoprotectant-free ultra-rapid freezing of human spermatozoa in cryogenic vials. *International Journal of Andrology* 2014; 46(6): 642-649.

ZÚCCARI, C.E.S.N.; CARRIJO, P.R.; LEITE, P.A. Seleção em Gradiente de Percoll® Sobre os Parâmetros Espermáticos do Sêmen Bovino Congelado. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal* 2008; 9(2): 358-366.

7. CAPÍTULO III: RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo será apresentado um artigo o qual foi submetido a avaliação da Revista de Saúde Pública (Qualis interdisciplinar A2).

7.1 Artigo 1

Artigo submetido a Revista de Saúde Pública

DESENVOLVIMENTO DE UM CRIOPROTETOR CONTENDO GOMA ÁGAR PARA
A CONSERVAÇÃO DE SÊMEN HUMANO

A CRYOPROTECTANT CONTAINING DEVELOPMENT GUM AGAR FOR HUMAN
SPERM CONSERVATION

Título abreviado: GOMA ÁGAR NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN HUMANO

Fernanda Guimarães Valverde¹, Conrado Marques Souza Neto¹; Sabrina Maria Rodrigues
Jacinto Costa¹; Érika Caldas Silveira²; George Hamilton Caldas Silveira²; Ricardo Luiz
Cavalcanti de Albuquerque-Júnior¹; Isabel Bezerra Lima- Verde¹

¹Universidade Tiradentes, Aracaju, Sergipe, Brasil.

²Cemise-Vida, Aracaju, Sergipe, Brasil.

Apresentação Prévia

Este manuscrito foi baseado na Dissertação de Mestrado de Fernanda Guimarães Valverde intitulada “Desenvolvimento de um Crioprotetor Contendo Goma Ágar Para a Conservação de Sêmen Humano”, em 2016, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente da Universidade Tiradentes/SE, na área de concentração Saúde e Ambiente.

Autor para contato:

Fernanda Guimarães Valverde
Av. Murilo Dantas, 300 – UNIT/ITP
Bairro: Farolândia
CEP: 49032-490
Tel: 55 79 32182190 Ramal: 2595
Aracaju, Sergipe, Brasil.
E-mail: nanadoca@hotmail.com

Contato dos autores:

Conrado Marques Souza Neto
Av. Murilo Dantas, 300 – UNIT/ITP
Bairro: Farolândia
CEP: 49032-490
Tel: 55 79 32182190 Ramal: 2595
Aracaju, Sergipe, Brasil.
E-mail: conrado_csl@hotmail.com

Sabrina Maria Rodrigues Jacinto Costa
Av. Murilo Dantas, 300 – UNIT/ITP
Bairro: Farolândia
CEP: 49032-490
Tel: 55 79 32182190 Ramal: 2595
Aracaju, Sergipe, Brasil.
E-mail: sajacinto@hotmail.com

Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque- Júnior
Av. Murilo Dantas, 300 – UNIT/ITP
Bairro: Farolândia
CEP: 49032-490
Tel: 55 79 32182190 Ramal: 2595
Aracaju, Sergipe, Brasil.
E-mail: ricardo.patologia@uol.com.br

Érika Caldas Silveira
Rua Construtor João Alves, 228
Bairro: Salgado Filho
CEP: 49020-340
Tel: 55 79 33041000
Aracaju, Sergipe, Brasil.
E-mail:

George Hamilton Caldas Silveira
Rua Construtor João Alves, 228
Bairro: Salgado Filho
CEP: 49020-340
Tel: 55 79 33041000
Aracaju, Sergipe, Brasil.
E-mail: georgecaldas@cemise.com.br

Isabel Bezerra Lima- Verde
Av. Murilo Dantas, 300 – UNIT/ITP
Bairro: Farolândia
CEP: 49032-490
Tel: 55 79 32182190 Ramal: 2595
Aracaju, Sergipe, Brasil.
E-mail: isabel_limaverde@yahoo.com.br

RESUMO

Objetivo: Avaliar o efeito da adição da goma ágar (GA) em solução crioprotetoras sobre a conservação de sêmen humano. **Método:** Estudo realizado em clínica especializada em reprodução humana assistida, em conjunto com a Universidade Tiradentes – UNIT (Aracaju/SE – Brasil). Os pacientes que preencheram os critérios de inclusão, voluntariamente, assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e foram convidados a participar da pesquisa, mediante esclarecimento dos termos e concordando com os procedimentos a serem realizados. Foram selecionadas 33 amostras seminais normais, coletadas e analisadas no período de Julho a Outubro de 2015. A análise seminal de rotina foi realizada nas amostras a fresco e criopreservadas. Nas amostras criopreservadas também foi avaliada a integridade espermática a partir do uso de sondas fluorescentes. As amostras foram divididas em seis grupos: (i) GEYC + GA 0,05%; (ii) GEYC + GA 0,10%; (iii) GEYC + GA 0,15%; (iv) GEYC + GA 0,2%; (v) TYB e (vi) GEYC. A adição dos meios crioprotetores às amostras seminais foram realizadas de acordo com protocolos previamente estabelecidos pela OMS (2010). Para dados estatísticos foram utilizados os testes de Shapiro-Wilk, ANOVA e Tukey. Para todos os testes estatísticos descritos foi adotado um nível de significância de 5%. **Resultados:** Nos parâmetros de motilidade total e progressiva e percentual de espermatozóides viáveis, todos os grupos criopreservados contendo goma ágar apresentaram resultados similares ao grupo controle v e vi ($p > 0,05$). Nesses mesmos parâmetros as amostras a fresco apresentaram resultados significativamente superiores ($p < 0,05$) quando comparadas aos demais tratamentos. Na análise morfológica somente o grupo contendo GA 0,05% apresentou resultados semelhantes ao grupo pré-crio ($p > 0,05$). Em relação a integridade espermática todos os grupos criopreservados contendo goma ágar apresentaram resultados semelhantes aos grupos controles ($p > 0,05$). **Conclusão:** Desta forma, a GA na concentração de 0,05% apresenta-se como uma substância com potencial crioprotetor para espermatozoides humanos, pois foi capaz de manter a morfologia espermática normal após a criopreservação. O grupo contendo GA 0,05% apresentou-se como um potencial crioprotetor para espermatozóides humanos.

Descritores: Criopreservação; Sêmen; Espermatozóides; Ágar

ABSTRACT

Objective: To evaluate the effect of adding the agar gum (GAS) in cryoprotectant solution on the human semen conservation. **Method:** A study conducted in clinic specializing in assisted human reproduction, together with the University Tiradentes - UNIT (Aracaju / SE - Brazil). Patients who met the inclusion criteria voluntarily signed an Informed Consent and Informed (IC) and were invited to participate in the research by clarifying the terms and agreeing with the procedures to be performed. We selected 33 normal semen samples were collected and analyzed during the period from July to October 2015. A routine semen analysis was performed on samples fresh and cryopreserved. In cryopreserved sperm sample integrity was also assessed from the use of fluorescent probes. The samples were divided into six groups: (i) GEYC + GA 0.05%; (ii) GEYC + GA 0.10%; (iii) GEYC + GA 0.15%; (iv) GEYC + 0.2% GA; (v) TYB (vi) GEYC. The addition of cryoprotective media to semen samples were performed according to protocols previously established by the WHO (2010). For statistical data Shapiro-Wilk tests were used, ANOVA and Tukey. For all described statistical tests we adopted a 5% significance level. **Results:** In the parameters of total and progressive motility and percentage of viable sperm, all cryopreserved groups containing agar gum showed similar results to the control group v and vi ($p > 0.05$). These same parameters as the samples to cool showed significantly better results ($p < 0.05$) when compared to the other treatments. In the morphological analysis only the group containing GA 0.05% showed similar results to pre-create group ($p > 0.05$). Regarding sperm integrity all cryopreserved groups containing agar gum showed similar results to the control groups ($p > 0.05$). **Conclusion:** Thus, the concentration of GA in 0.05% is presented as a substance with the potential for human spermatozoa cryoprotectant because it was able to maintain normal morphology after cryopreservation. The group containing GA 0.05% presented himself as a potential cryoprotectant for human spermatozoa.

Key Words: Agar; Spermatozoa; Cryopreservation; Semen.

INTRODUÇÃO

A infertilidade masculina está diretamente ligada com a qualidade dos espermatozóides, incluindo qualquer fator que provoque alteração no processo da espermatogênese, ocasionando redução da motilidade e viabilidade destas células.¹⁴ Estima-se que a infertilidade masculina é responsável por 30% dos casos de casais que não conseguem ter filhos, sendo que as causas masculinas associadas as femininas representam 20% dos casos, o que faz desta circunstância um alvo para pesquisas.¹²

A dificuldade de tratamento relacionados a infertilidade masculina tem incentivado a procura e as pesquisas sobre a criopreservação de sêmen. Esta técnica associada à reprodução humana assistida proporciona à maioria dos pacientes a oportunidade de gerar filhos, exercendo assim papel essencial na manutenção da fertilidade.¹⁹

A criopreservação seminal permite submeter células espermáticas a temperaturas abaixo do ponto de congelamento da água e tem como premissa a preservação da composição e da viabilidade das células por tempo indefinido, inibindo de forma reversível o metabolismo celular.¹⁵ Esta técnica tornou-se uma ferramenta importante para a melhoria e para o desenvolvimento das técnicas de reprodução humana assistida.¹⁹

Entretanto a criopreservação promove efeitos danosos sobre a funcionalidade dos espermatozóides humanos, especificamente na motilidade, no qual estima-se que somente 50% dos espermatozóides móveis sobrevivem ao processo de congelamento e descongelamento.¹⁶ Além disso, este processo pode ocasionar lesões irreversíveis aos espermatozóides como alterações metabólicas na membrana plasmática e no acrossomo.¹¹

As células espermáticas após o processo de criopreservação devem manter boa motilidade e integridade da membrana para que tenham a capacidade de penetração no oócito.¹⁹ Para minimizar, prevenir e/ou eliminar as injúrias provocadas pela criopreservação utilizam-se substâncias crioprotetoras. Os crioprotetores têm a função de evitar a formação de cristais grandes de gelo intracelular, reduzir o estresse osmótico por meio da reposição de água necessária para manutenção do volume celular, reduzir o ponto de congelamento da água, assim como servir de tampão para ajustes de possíveis alterações do pH.^{1,16}

Inúmeros crioprotetores têm sido desenvolvidos visando minimizar os efeitos deletérios causados pela criopreservação seminal.¹⁶ Alguns açúcares, agentes geleificantes e gomas já foram utilizados para uma melhor proteção da motilidade, viabilidade e funcionalidade da célula espermática, demonstrando efeito favorável na preservação desta célula.^{8,18}

Uma alternativa para esse incremento da técnica é a utilização de um polissacarídeo natural e atóxico no meio de criopreservação, que seja preparado através de matérias primas renováveis e que possua características que permitam a otimização da criopreservação de sêmen humano. Nesse contexto podemos destacar a goma ágar que pode ser considerada como uma substância com potencial para atuar como agente crioprotetor. Obtida pela extração de algas vermelhas, pertencentes à família *Rhodophyta* da espécie *Graciliaceae* e *Gelidiaceae* é comercialmente importante por sua propriedade geleificante e viscosificante. Possui alto potencial econômico, pois é utilizada em inúmeras áreas, como: base para culturas microbiológicas, meio de separação em cromatografia de coluna e eletroforese e na indústria de alimentos, como espessantes e geleificantes e ainda possui aplicações na área médica e farmacológica.²²

Devido a inexistência de estudos que relatem os efeitos da adição da goma ágar à solução crioprotetora para a conservação de espermatozóides humanos, este trabalho tem como objetivo avaliar o efeito da adição da goma ágar em solução crioprotetora sobre a conservação de sêmen humano.

MÉTODOS

O estudo foi realizado em clínica especializada em reprodução humana assistida. Em conjunto com a Universidade Tiradentes – UNIT (Aracaju/SE – Brasil). Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIT. Foi disponibilizado um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para os pacientes que preencheram os critérios de inclusão e mediante esclarecimento dos termos deste estudo foram convidados a participar da pesquisa.

As amostras foram coletadas e analisadas a partir de pacientes que realizaram o espermograma no período compreendido entre Julho e Outubro de 2015 e que preencheram os critérios de inclusão (idade entre 18 e 45 anos, 2 a 7 dias de abstinência ejaculatória e sem distúrbios ejaculatórios, sem anomalia pélvica ou testicular, uma ejaculação na mesma coleta e sem perda seminal, parâmetros seminais normais quanto à qualidade e quantidade espermática).

O protocolo experimental utilizado está representado na Figura 1. As amostras provenientes de cada paciente foram divididas em seis alíquotas. Seis diferentes meios de cultura foram utilizados para a criopreservação das amostras seminais. Dois grupos compreende o grupo controle, TYB (meio comercial de referência) e GEYC (meio preparado de acordo com o Manual Laboratorial para Exame e Processamento de Sêmen Humano).¹³

Após análise seminal de rotina, 33 amostras que apresentarem parâmetros seminais normais (concentração espermática mínima de 15×10^6 espermatozóides/mL, mínimo de 32% de motilidade progressiva) foram incluídos neste estudo.

De acordo com o protocolo da Organização Mundial de Saúde¹³ (2010) todas as amostras coletadas passaram pela análise seminal de rotina antes e após o processo de criopreservação. A análise seminal de rotina consiste em avaliar: tempo de liquefação em placa aquecida a 37°C, volume total do ejaculado, pH, viscosidade, concentração espermática, motilidade, vitalidade e morfologia.

Nesse estudo, foi considerado somente os parâmetros de motilidade, vitalidade e morfologia espermática pois, estes testes possuem maior relevância na análise seminal de rotina.

Seguindo o protocolo da OMS¹³ (2010), a motilidade espermática consiste na classificação dos espermatozóides em três: motilidade progressiva (espermatozóides com movimentos ativos, lineares ou em círculos grandes, independentemente da sua velocidade), motilidade não progressiva (todos os outros padrões de motilidade com

ausência de progressão) e imóvel (sem movimento). A vitalidade (% de espermatozóides viáveis) consiste na utilização do corante eosina que é impermeável à membrana plasmática das células viáveis, corando somente espermatozóides não viáveis. A morfologia espermática (% de espermatozóides morfologicamente normais) foi avaliada através do critério estrito de Kruger utilizando microscópio óptico equipado com régua em uma das oculares. Foram considerados normais os espermatozóides que apresentarem cabeça lisa e oval com eixo longo entre 5 e 6 μm e eixo curto entre 2,5 e 3,5 μm , acrossomos cobrindo de 40 a 70% do volume da cabeça, peça intermediária com até 1 μm de largura e comprimento de até uma vez e meia o comprimento da cabeça e ausência de anomalia na cauda.

Após o processo de criopreservação todas as amostras passaram pela análise de integridade espermática através do uso de sondas fluorescentes, avaliando a membrana plasmática espermática e acrossomal íntegra e atividade mitocondrial. Para esta análise utilizou microscópio de epifluorescência (Nikon Eclipse 50i) equipado com filtro B2A com excitação de 400-570nm e emissão de 460-610nm, um espelho dicróico de 505nm e um filtro de barreira de 520nm com magnificação de 400x.

Para análise da membrana plasmática íntegra utilizou iodeto de propídio (ID) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) conjugada com o diacetato de carboxifluoresceína (DIC) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). A integridade do acrossomo foi avaliada com o uso da aglutinina de amendoim (PNA – Peannut Agglutinin) conjugada com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). A sonda fluorescente usada para avaliar a atividade mitocondrial foi a JC-1 (iodeto de 5,5',6,6'tetracloro-1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), um corante catiônico lipofílico. Estas análises foram realizadas de acordo com a metodologia proposta por Celeghini et al⁴ (2007).

Este estudo é uma análise descritiva. O teste de normalidade foi determinado pela análise de Shapiro Wilk. Para a análise comparativa entre as amostras a fresco e cada grupo, bem como os grupos controles e grupos testes de criopreservação foi utilizado o teste ANOVA e Tukey. As análises dos dados foram realizadas utilizando os softwares estatísticos GraphPad Prisma 5.0. Valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

RESULTADOS

As amostras seminais recém-coletadas bem como as criopreservadas foram submetidas à análise seminal de rotina, observando parâmetros como motilidade espermática total e progressiva, espermatozoides morfologicamente normais e percentual de espermatozoides viáveis (vitalidade).

Foi verificado que, nos parâmetros de motilidade total (Figura 2A) e motilidade progressiva (Figura 2B) e percentual de espermatozoides viáveis (Figura 2C), todos os grupos submetidos a criopreservação contendo goma ágar mostraram resultados semelhantes aos grupos controles TYB e GEYC ($p>0,05$). No entanto, as amostras a fresco mostraram percentuais significativamente superior ($p<0,001$) aos demais tratamentos submetidos à criopreservação, nos parâmetros analisados.

Na avaliação da morfologia espermática (Figura 2D), os grupos submetidos a criopreservação GA 0,2% apresentou resultados semelhantes aos grupos controles TYB e GEYC ($p>0,05\%$). Os grupos GA 0,10% e GA 0,15% mostraram percentuais de espermatozoides morfologicamente normais significativamente inferiores ($p<0,05$) aos demais grupos testados. Entretanto, somente o grupo criopreservado GA 0,05% mostrou percentuais de espermatozoides morfologicamente normais semelhantes ao grupo de amostras a fresco (pré-crio), mostrando que a goma ágar na referida concentração foi capaz de manter a morfologia normal dos espermatozoides mesmo após o processo de criopreservação.

Além disso, as amostras criopreservadas foram submetidas às sondas fluorescentes para avaliação da integridade espermática analisando os parâmetros de integridade de membrana plasmática (Figura 3A), membrana acrossomal (Figura 3B) e atividade mitocondrial (Figura 3C). Em relação aos parâmetros acima citados, constatou-se que todos os grupos criopreservados contendo goma ágar nas diferentes concentrações apresentaram percentuais similares aos grupos controles TYB e GEYC ($p>0,05$).

DISCUSSÃO

Este estudo consiste em empregar a goma ágar como constituinte do meio para criopreservação de espermatozoides humanos. Sua ação foi testada comparando os resultados das amostras seminais a fresco e criopreservadas utilizando a goma em concentrações distintas e com grupos controle padrões ouros TYB e GEYC.

Dentre os resultados, foi observado que, quando ambas as motilidades foram avaliadas, bem como o percentual de espermatozoides viáveis, não houve diferença significativa entre os grupos criopreservados e os grupos controles TYB e GEYC. Também foi verificado que independente do meio utilizado e da concentração de goma ágar, os parâmetros acima relacionados apresentaram redução significativa quando comparados às amostras a fresco. De acordo com Duarte Júnior et al⁶ (2015) o processo de congelamento associado ao descongelamento está continuamente relacionado com a queda nos parâmetros seminais. Câmara e Guerra³ (2011) concluíram em seu estudo que o processo de criopreservação de sêmen humano naturalmente diminui o número de espermatozoides com motilidade. De acordo com Silva e Monreal¹⁶, (2015) um dos maiores desafios da criopreservação é a recuperação da motilidade espermática, pois este parâmetro é fundamental para a conclusão do exame espermático¹³. CURTIS et al⁵ (2015) explica que cerca de 50% das células espermáticas humanas submetidas ao processo de criopreservação apresentam danos estruturais, físicos, bioquímicos ou funcionais. Os processos danosos que podem acometer as células espermáticas são a ação do choque térmico, desidratação celular, formação de cristais de gelo intracelular, desnaturação proteica, além de comprometimentos funcionais.²³ Sendo assim, torna-se esperada a diminuição das porcentagens de motilidade após a criopreservação observadas neste estudo.

Já é bem definido na literatura e na prática clínica que os crioprotetores melhoram a resistência da célula espermática quando submetida a baixas temperaturas.⁷ Para a redução dos processos danosos da criopreservação, bem como a manutenção das características estruturais espermáticas, as substâncias crioprotetoras devem ter o papel de nutrir, prevenir contaminação, manter os níveis de osmose toleráveis, evitar congelamento intracelular, além de atuar como um tampão para manutenção do pH.²¹ A análise da morfologia é um dos testes utilizados para determinar a qualidade espermática, além de ser complementar para o diagnóstico da infertilidade. A morfologia espermática é fundamental para os critérios

de análise seminal, uma vez que o comprometimento das estruturas da célula espermática pode ocasionar imobilidade, déficit de potencial de penetração do oócito e prejuízo na integridade da célula.¹³ Os resultados da análise de morfologia espermática no presente estudo mostraram que dentro dos grupos criopreservados, o grupo GA 0,05% apresentou resultado similar à amostra a fresco, sugerindo que, dentro das concentrações de goma ágar estudadas, esta foi a concentração com melhor potencial para a manutenção da morfologia dos espermatozoides. Em relação à avaliação da integridade espermática pela fluorescência, constatou-se que todos os grupos criopreservados com a goma ágar apresentaram percentuais similares aos grupos controle TYB e GEYC quando avaliados parâmetros de integridade de membrana plasmática e acrossomal e a atividade mitocondrial.

A goma ágar é frequentemente utilizada na indústria alimentícia para a conservação dos alimentos, por apresentar características que permitem controlar a viscosidade formada em soluções, bem como a redução de danos causados pelo processo de congelamento.²⁰ Além disso, a goma ágar pode estabelecer redução no fluxo de substâncias durante o resfriamento, protegendo a célula contra a perda de suas propriedades e mantendo sua integridade funcional e morfológica.¹⁷ Este fator é importante pois, a membrana espermática possui importante papel no processo de fertilização do oócito, garantindo o equilíbrio osmótico entre o meio intra e extra celular.⁹

A membrana espermática é rica em fosfolipídios e ao ser submetida ao processo de criopreservação sofre uma translocação de seus lipídeos para que a célula se adeque às mudanças térmicas. Sendo assim, a preservação da membrana plasmática espermática no processo de criopreservação é fundamental para a sobrevivência da célula, garantindo sua viabilidade para a fertilização.² Desta forma estes dados sugerem que a goma ágar, devido às suas propriedades físicas e químicas tem o potencial de preservar a integridade em células animais.

O desenvolvimento de testes laboratoriais para precisar a capacidade de fertilização dos espermatozoides instiga pesquisadores há anos. Para monitorar sistemas de criopreservação seminal, têm sido propostos testes mais sensíveis para avaliar injúrias à membrana plasmática.¹⁰ A descoberta de uma variedade de fluorocromos forneceu novas ferramentas de avaliação da funcionalidade espermática. O uso de sondas fluorescentes na andrologia tem o objetivo de avaliar a integridade e a função de compartimentos específicos das células espermáticas. A

fluorescência é um indicador sensível e específico do estado de certas moléculas e pode ser aplicada como uma forma de medição de alterações metabólicas no interior das células espermáticas.⁴

Desta forma, pode ser concluído que a goma ágar na concentração de 0,05% apresenta-se como um potencial crioprotetor para espermatozoides humanos, visto que foi o único tratamento testado que manteve o percentual de espermatozoides morfológicamente normais semelhantes ao observado antes da criopreservação, sugerindo que esta goma pode manter a funcionalidade espermática. Entretanto, testes posteriores serão necessários para verificar o comportamento da GA em concentrações inferiores a 0,05% bem como para testar a capacidade fertilizante destes espermatozoides.

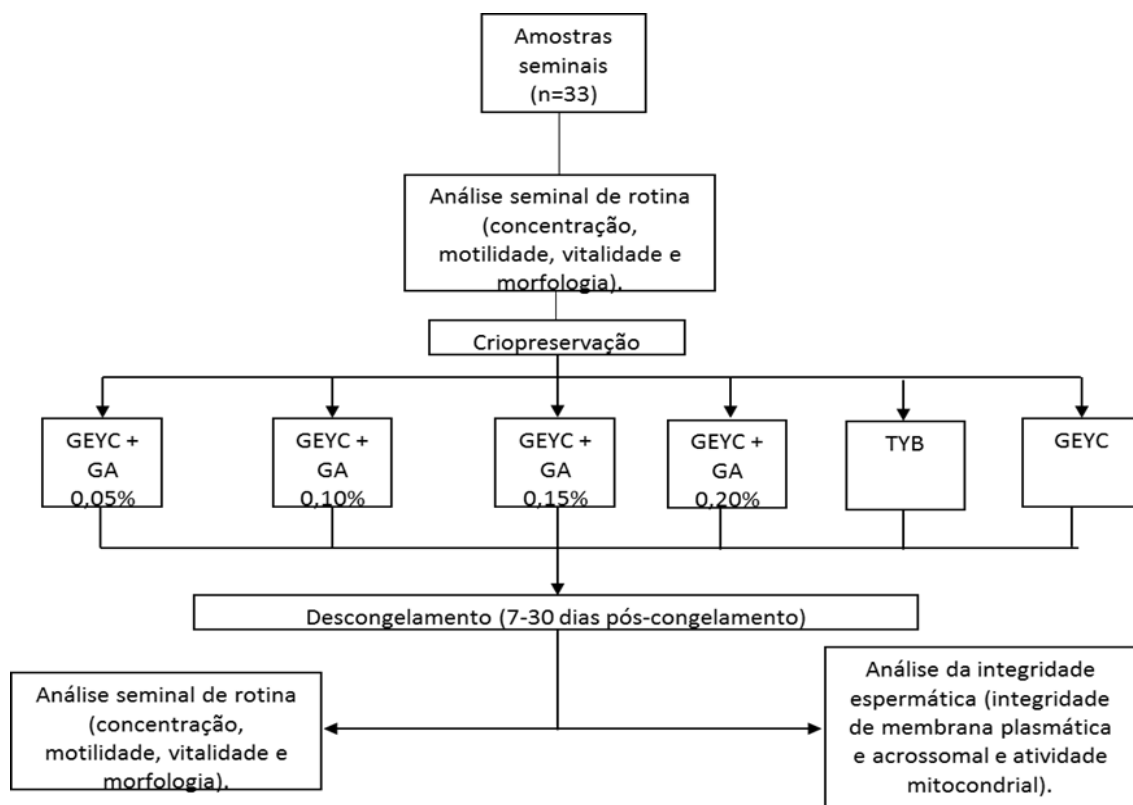


Figura 1: Protocolo experimental utilizado no estudo.

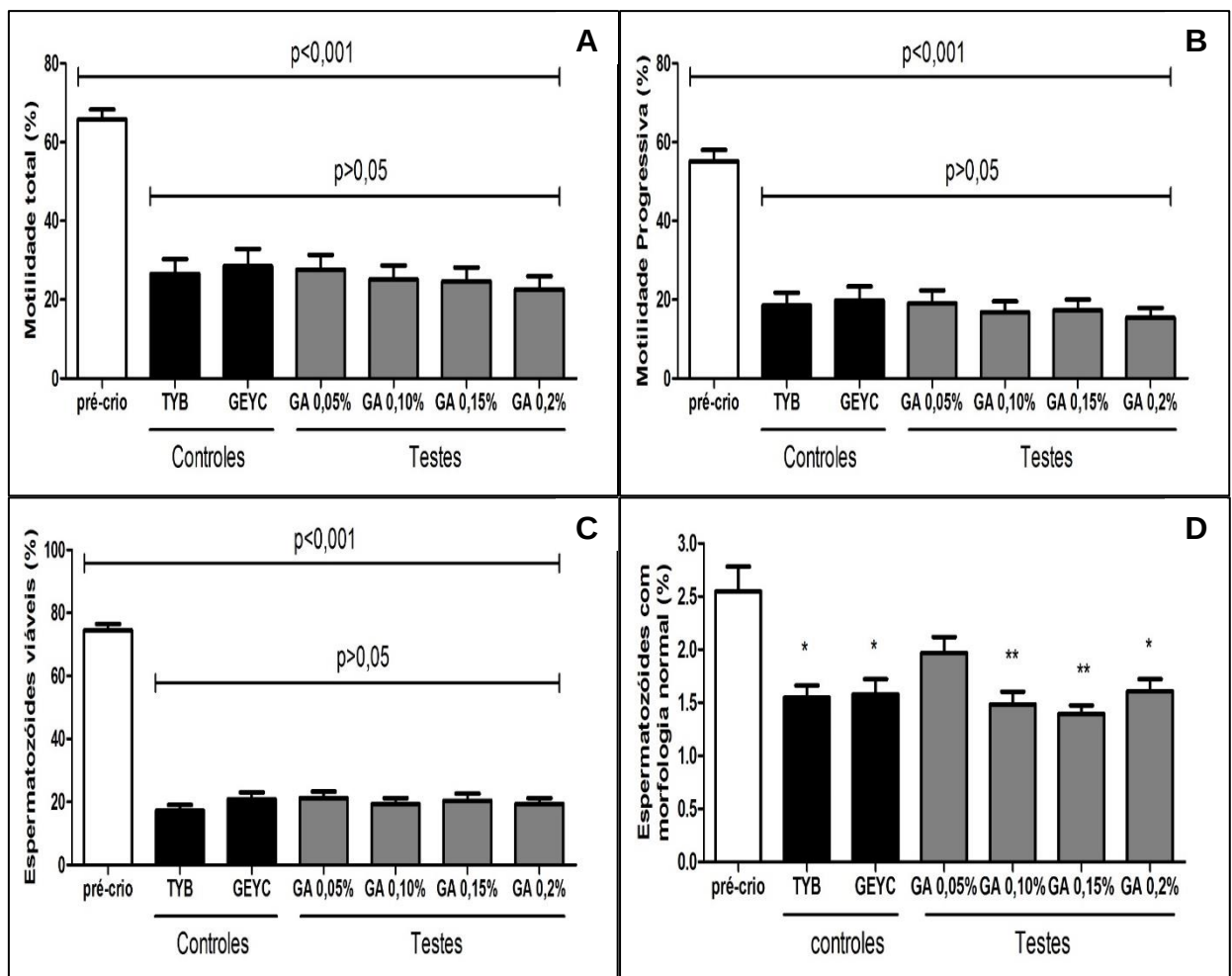


Figura 2: Análise comparativa entre os parâmetros de motilidade total (A); motilidade pogrressiva (2B), % de espermatozóides viáveis (2C) e % de espermatozóides com morfologia normal (2D).

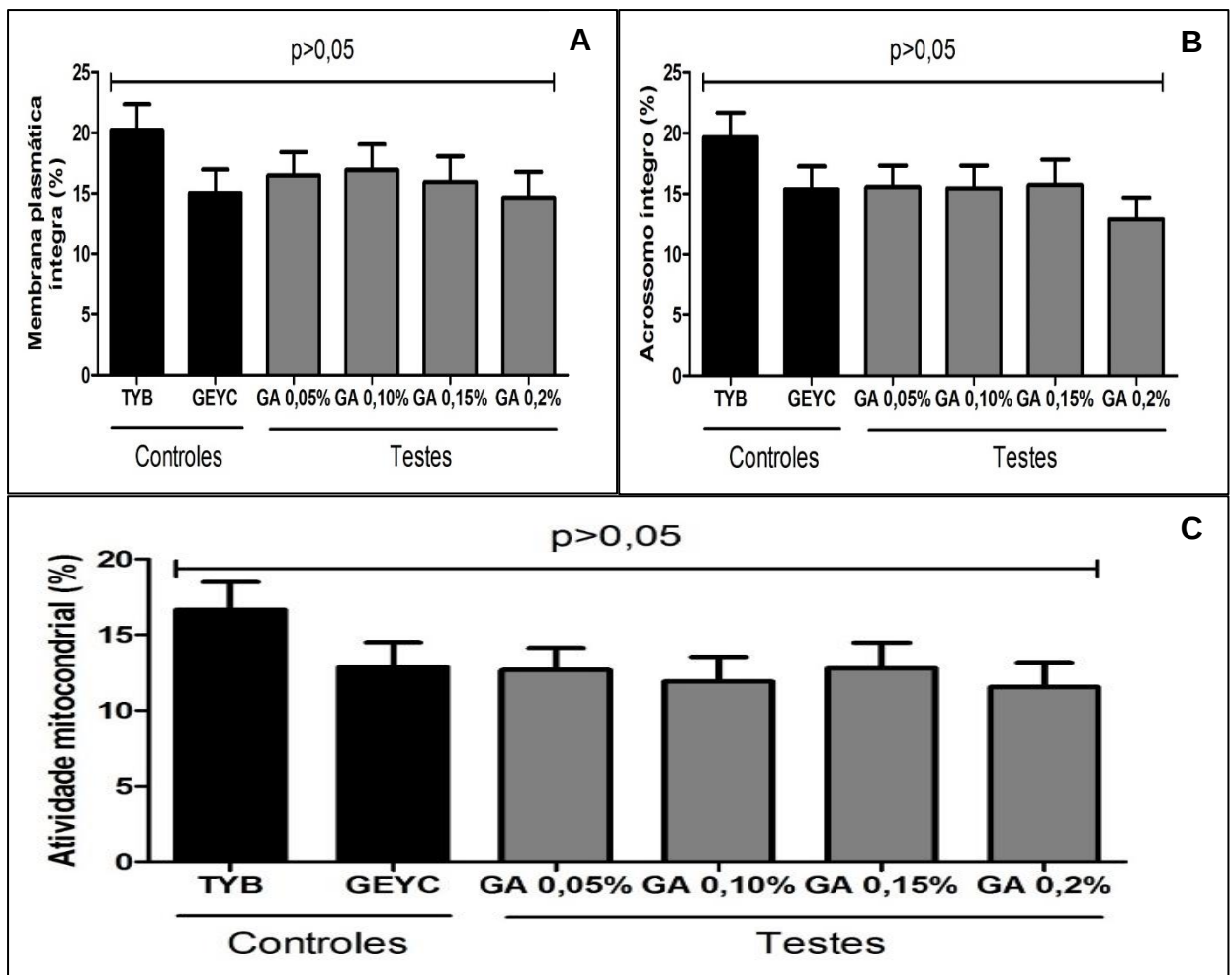


Figura 3: Análise comparativa da integridade espermática em relação a avaliação da integridade da membrana plasmática (3A), acrossomal (3B) e atividade mitocondrial (3C) nos diferentes grupos experimentais.

REFERÊNCIAS

1. Bittencourt RF, Oba E, Ribeiro Filho AL, Chalhoub M, Azevedo HC, Bicudo SD. Avanços na Criopreservação do Sêmen Ovino I: Diluidores e Crioprotetores. *Ciênc. Anim. Bras.* 2013;14(4):522-536. DOI: 10.5216/cab.v14i4.22964.
2. Buffone MG, Calamera JC, Brugo-Olmedo S, De Vicentiis S, Calamera MM, Storey BT, et al. Superoxide Dismutase Content in Sperm Correlates with Motility Recovery after Thawing of Cryopreserved Human Spermatozoa. *Fertility and Sterility.* 2012;97(2):293-298. DOI:10.1016/j.fertnstert.2011.11.012.
3. Câmara DR, Guerra MMP. Refrigeração e Criopreservação do Sêmen Ovino: Danos Inerentes à Técnica e Influência da Suplementação do meio com antioxidantes sobre a qualidade espermática. *Revista Brasileira de Reprodução Animal.* 2011;35-33-40.
4. Celeghini ECC, Arruda RP, De Andrade AFC, Nascimento J, Raphael CF. Practical Techniques for Bovine Sperm Simultaneous Fluorimetric Assessment of Plasma, Acrosomal and Mitochondrial Membranes. *Reproduction in Domestic Animal.* 2007;42(5):479-488. DOI:10.1111/j.1439-0531.2006.00810.x.
5. Curtis LAM, Wieczorek AJ, McGann LE, Elliot JAW. Mesenchymal Stroma Cells Derived From Various Tissues: Biological, Clinical and Cryopreservation Aspects *Cryobiology.* 2015;71:181-197. DOI:10.1089/107632701300062859.
6. Duarte Júnior MF, Zervoudakis LKH, Zervoudakis JT, Nichi M, Bertolla RP, Tsuneda PP et al. Avaliação do Tocoferol no Congelamento do Sêmen Bovino e nas Taxas de Prenhez após Inseminação Artificial em tempo Fixo. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária.* 2015;22(2):114-118. DOI: 10.4322/rbcv.2015.362
7. Fardin S, Manpoor MR, Esfahani MHN. Effect of Different Concentration of Permeable and Non-Permeable Cryoprotectants on the Hatching Rate of Goldfish (*carassius auratus*). *Asian Pacific Journal of Reproduction.* 2013;13:185-188.
8. Jafaroghili M, Khalili B, Farshad A, Zanire MJ. The Effect of Supplementattion of Cryopreservation Diluents with Sugars on the Post-Thawing Fertility of Ram Semen, *Small Ruminant Research.* 2011;96(1):58-63. DOI:10.1016/j.smallrumres.2010.11.010
9. Kadirve G, Kumar S, Ghosh SK, Perumal P. Activity of Antioxidative Enzymes in Fresh and Frozen Thawed Buffalo (*bubalus bubalis*) Spermatozoa in Relation to Lipid Peroxidation and Semen Quality. *Asian Pacific Journal of Reproduction.* 2014;14:210-217.
10. Lee S, Iwasaki Y, Shikina S, Yashizaki G. Generation of Functional Eggs and Sperm from Cryopreserved Whole Testes. *PNAS Early Edition.* 2013; DOI:10.1073/pnas.1218468110.
11. Morris GJ, Acton E, Murray BJ, Fonseca F. Freezing Injury Special Case of the Sperm Cell. *Cryobiology.* 2012;64(2):71-80. DOI:10.1016/j.cryobiol.2011.12.002.
12. Mythili R, Kini S, Mahmood T. Male Fertility and Infertility. *Obstetrics, Gynaecology & Reproductive Medicine.* 2014;24(11):326-332.
13. Organização Mundial de Saúde. Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. Geneva. *World Health Organization Press.* 2010; 5 Ed.
14. Shufaro Y, Schenker JG. Cryopreservation of Human Genetic Material. *Annals of The New York Academy of Science.* 2010;1205(1):220-224. DOI:10.1111/j.1749-6632.2010.05651.x.
15. Silva AM, Monreal ACD, Efeitos da Homeopatia Combinado com Diluente a Base de Leite de Cabra na Criopreservação de Sêmen de Ovinos. *PECIBES: Perspectivas Experimentais e Clínicas, Inovações Biomédicas e Educação em Saúde.* 2015;1(2):10-14.

16. Sousa AMM, Gonçalves MP. Strategies to improve the mechanical strength and water resistance of agar films for food packaging applications. *Carbohydrate Polymers*. 2015; 132:196-204. DOI: 10.1016/j.carbpol.2015.06.022.
17. Tonieto RA, Goularte KL, Gastal GDA, Schiavon RS, Deschamps JC, Lucia T. Cryoprotectant Effect of Trehalose and Low-Density Lipoprotein in Extenders for Frozen Ram Semen. *Small Ruminant Research*. 2010;93(2-3):206-209. DOI:10.1016/j.smallrumres.2010.05.003.
18. Tsakmakidis IA. Ram Semen Evaluation: Development and Efficiency of Modern Techniques. *Small Ruminant Research*. 2010;92:126-130.
19. Villaneuva RD, Sousa AMM, Gonçalves MP, Nilsson M, Hilliou L. Produção e Propriedades de Ágar da Alga Marinha Invasora: *Gracilaria vermiculophylla* (Gracilariales Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology*. 2010;22(2):211-220.
20. Wolf MV, Stut P. Cryopreservation and Transplantation of Ovarian Tissue Exclusively to Postpone Menopause: Technically Possible but Endocrinologically Doubtful. *Reproductive Biomedicine Online*. 2015;31(6):718-721. DOI:10.1016/j.rbmo.2015.08.010.
21. Zhang X, Liu X, Cao M, Xia K, Zhang Y. Preparation of Hydroxypropyl Agars and Their Properties. *Carbohydrate Polymers*. 2015;129: 87-91. DOI:10.1016/j.carbpol.2015.04.056.
22. Zribi N, Chakroun NF, Ben-Abdallah F, Elleuch H, Sellami A, Gargouri J, et al. Effect of Freezing – Thawing Process and Quercetin on Human Sperm Survival and DNA Integrity. *Criobiology*. 2012;65(3):326-331. DOI:10.1016/j.cryobiol.2012.09.003.

8. ANEXOS

ANEXO 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Prezado participante,

Você está sendo convidado a participar da pesquisa intitulada “Desenvolvimento de um crioprotetor contendo goma ágar para a criopreservação de sêmen humano”, desenvolvida por, Fernanda Guimarães Valverde aluna de pós-graduação da Universidade Tiradentes (UNIT) devidamente assistidos por sua orientadora Isabel Bezerra Lima.

1-Objetivos Primário e Secundários: 1) Avaliar o efeito da goma ágar na criopreservação de sêmen humano, usando sondas fluorescentes como ferramentas para avaliar a funcionalidade espermática pós-descongelamento; 2) Verificar o efeito crioprotetor da goma ágar em diferentes concentrações sobre a morfologia, a motilidade e a viabilidade de espermatozoides humanos; avaliar diferentes concentrações da goma ágar no diluente para congelamento de sêmen humano sobre a viabilidade seminal; avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio e a capacidade antioxidante das células espermáticas frente à adição dos hidrocolóides e avaliar a qualidade espermática após o descongelamento utilizando a goma ágar como crioprotetor externo.

2-Descrição de procedimentos: O presente estudo será realizado no Laboratório de BioMateriais (LBMat), localizado na Unit, em Aracaju/SE. Os participantes deste estudo serão voluntários que preencherem os critérios de inclusão (idade entre 18 a 45 anos; parâmetros seminais normais e tempo de abstinência sexual entre 2 a 5 dias (parâmetros preconizados pela OMS - Organização Mundial de Saúde) e exclusão (perda de plasma seminal no momento da coleta; presença de distúrbios ejaculatórios; ocorrência de mais de uma ejaculação no mesmo recipiente na hora da coleta; pacientes vasectomizados; pacientes que possuem anomalia pélvica e/ou testicular clinicamente significativa). Serão convidados a participar da pesquisa em questão 30 pacientes por experimento, totalizando 120 participantes, mediante esclarecimento dos termos deste estudo, assinando este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) previamente e concordando com a participação voluntária dos procedimentos a serem realizados. A coleta do sêmen será feita pelo próprio paciente em domicílio, de forma manual, utilizando frasco coletor estéril fornecido pelos pesquisadores. Após a coleta, um dos pesquisadores irá buscar a amostra na residência do participante e a levará imediatamente ao LBMat devidamente acondicionada para a realização das análises e congelamento. Os participantes serão previamente instruídos pelos pesquisadores sobre a coleta do material biológico. Os participantes desta pesquisa (n=33) serão divididos em seis experimentos com quatro diferentes concentrações de goma ágar e dois grupos controle, sendo que cada experimento contará com 33 pacientes. A amostra de cada paciente será dividida em cinco alíquotas formando 6 grupos de congelamento (2 grupos controle e 3 grupos experimentais). Nos grupos controle, as amostras seminais serão congeladas com meios de congelamento convencionais (TYB - diluente comercialmente utilizado e GEYC - diluente adotado pela OMS). Nos grupos experimentais, as amostras seminais serão congeladas com meio de congelamento convencional GEYC acrescido de quatro concentrações diferentes da goma ágar: 0,20%, 0,15%, 0,10% e 0,05%. O experimento será realizado com adição de goma ágar ao GEYC. Cada alíquota de sêmen será diluída na proporção de 1:1 com meio de congelamento, acondicionadas em criotubos para cada meio utilizado e submetidas a congelamento em nitrogênio líquido. Todas as amostras permanecerão armazenadas em botijões de nitrogênio líquido por um período de 7 a 30 dias após o congelamento, então serão descongeladas e analisadas. Para análise da qualidade espermática pré e pós congelamento será utilizado microscópio óptico invertido, onde será depositada uma gota de 10µL da amostra na câmara de Makler (própria para avaliação de

espermatozoides humanos) e em seguida a motilidade e a concentração será avaliada. Serão avaliados ainda vitalidade, morfologia e funcionalidade espermáticas. Após as análises, o restante das amostras será descartado em sacos plásticos apropriados, que serão recolhidos por uma empresa especializada que dará a destinação final adequada em Aterro Sanitário, devidamente licenciado em órgão ambiental competente.

3-Justificativa para a realização da pesquisa: A criopreservação do sêmen humano é utilizada com várias finalidades, incluindo novas técnicas de reprodução assistida, pré-tratamento de radioterapia ou quimioterapia, problemas com ejaculação e inacessibilidade do homem à parceira no período da ovulação, para os homens submetidos à vasectomia e armazenamento de doadores de sêmen com soro negatividade para HIV, doenças sexualmente transmissíveis e hepatites. Entretanto, o congelamento do sêmen apresenta dificuldades, devido à criopreservação provocar danos celulares a nível membranar, afetando a motilidade, encurtando a vida do espermatozoide e com isto diminuindo a capacidade de fertilização, fato este já observado em sêmen humano. Portanto, é preciso o estudo de novos crioprotetores (e.g. biopolímeros), uma vez que a composição deste meio pode afetar a viabilidade durante o processo de congelamento-descongelamento. Assim, a avaliação de outras substâncias crioprotetoras é importante para a eficiência do processo de preservação de sêmen, uma vez que as células espermáticas devem manter suas características morfológicas e moleculares, vitais para o desenvolvimento embrionário. Hidrocolóides são biopolímeros higroscópicos, ou seja, adsorvem água as moléculas de água diminuindo a quantidade desta disponível para a formação de cristais de gelo. Devido à esta característica, acredita-se que os hidrocolóides possam contribuir na dinâmica de formação de cristais de gelo no meio, limitando a difusão de moléculas de água e o crescimento de cristais de gelo. Dentre os hidrocolóides mais conhecidos, podem ser mencionados a goma guar, a goma locusta, a carboximetilcelulose e a goma ágar. Considerando o aumento da incidência da infertilidade mundialmente, este estudo é relevante, pois permitirá a aplicação de técnicas biotecnológicas visando um incremento na recuperação de espermatozoides viáveis e, consequentemente, uma melhoria nas taxas de gravidez advindas de técnicas de fertilização *in vitro*, utilizando espermatozoides criopreservados.

4-Desconfortos e riscos esperados: O desconforto que pode ser ocasionados deve-se ao dispêndio de tempo para o procedimento da coleta do material; o risco que pode ocorrer é de origem emocional devido ao constrangimento que a coleta do material pode ocasionar. Todos os procedimentos realizados são não-invasivos e indolores. A coleta do sêmen será feita pelo próprio paciente, de forma manual, em domicílio, utilizando frasco coletor estéril. Os riscos acima descritos e qualquer risco não descrito, não previsível, porém que possa ocorrer em decorrência da pesquisa, será de inteira responsabilidade dos pesquisadores.

5-Benefícios esperados: 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. A realização deste trabalho permitirá o desenvolvimento de uma solução crioprotetora com capacidade de manter a motilidade espermática em níveis satisfatórios e que possa ser utilizada em baixas concentrações, de modo a diminuir custos e a toxicidade do processo de criopreservação.

6-Informações: Os participantes têm a garantia que receberão respostas a qualquer pergunta e esclarecimento de qualquer dúvida quanto aos assuntos relacionados à pesquisa. Também os pesquisadores supracitados assumem o compromisso de proporcionar informações atualizadas obtidas durante a realização do estudo.

7-Retirada do consentimento: O participante tem a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, não acarretando nenhum dano ao participante.

8-Aspecto Legal: Elaborado de acordo com as diretrizes e normas regulamentadas de pesquisa envolvendo seres humanos atende à Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012, do Conselho Nacional de Saúde do Ministério de Saúde - Brasília – DF.

9-Confabilidade: Os participantes terão direito à privacidade de forma que cada participante receberá uma numeração de acordo com sua sequência na participação da pesquisa. A identidade (nomes e sobrenomes) do participante não será divulgada durante todas as fases da pesquisa, inclusive na divulgação dos resultados em congressos e publicações, porém os participantes assinarão este termo de consentimento para que os resultados obtidos possam ser apresentados em congressos e publicações.

10-Quanto à indenização: Não há danos previsíveis decorrentes da pesquisa, mesmo assim fica prevista indenização diante de eventuais danos recorrentes da pesquisa, previstos ou não neste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Não sendo aceitável que se exija, sob qualquer argumento, renúncia ao direito desta indenização. Está garantida a assistência integral e gratuita pelo tempo que for necessário em caso de danos decorrentes direta ou indiretamente da participação no estudo, caso se faça necessário.

11-Dados do pesquisador responsável:

Nome: Fernanda Guimarães Valverde

Endereço/telefone/e-mail: Av. Murilo Dantas, 300 bloco F – Farolândia – CEP 49032-490, Aracaju-SE / (79)999586561/ nanadoca@hotmail.com

ATENÇÃO: A participação em qualquer tipo de pesquisa é voluntária. Em casos de dúvida quanto aos seus direitos, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Tiradentes. O Comitê de Ética é a instância que tem por objetivo defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos. Dessa forma o comitê tem o papel de avaliar e monitorar o andamento do projeto de modo que a pesquisa respeite os princípios éticos de proteção aos direitos humanos, da dignidade, da autonomia, da não maleficência, da confidencialidade e da privacidade.

CEP/Unit – DPE - Av. Murilo Dantas, 300 bloco F – Farolândia – CEP 49032-490, Aracaju-SE.

Telefone: (79) 32182206 – e-mail: cep@unit.br.

Atendimento ao participante pela coordenação:

Segunda, das 08h às 11h / 13:30h às 16:30h; Quinta, das 14h às 17h.

Se desejar, consulte ainda a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP):

Tel: (61) 3315-5878 / (61) 3315-5879 / E-mail: conep@saude.gov.br

Finalmente, tendo eu compreendido perfeitamente tudo o que me foi informado sobre a minha participação no mencionado estudo e estando consciente dos meus direitos, das minhas responsabilidades, dos riscos e dos benefícios que a minha participação implica, declaro que concordo em participar desse estudo que envolve o depósito, armazenamento e utilização da amostra seminal por mim coletada. Recebi uma via deste termo de consentimento livre e esclarecido assinada pelo pesquisador e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Aracaju, _____ de _____ de 201__.

Nome	Assinatura do Participante	Data
------	----------------------------	------

Nome	Assinatura do Pesquisador	Data
------	---------------------------	------

ANEXO 2

COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CRIOPRESERVAÇÃO UTILIZADOS.

1. TYB (Test Yolk Buffer)

- ❖ TES $C_6H_{15}NO_6S$ PM= 229,2 N-tris[hidroximetil]metil-2-ácido aminoetano sulfônico;
- ❖ TRIS $C_4H_{11}NO_3$ PM= 121,1 2-aminno-2-hidroximetil-1,3 propanodiol;
- ❖ Frutose;
- ❖ Gema de ovo (20% v/v);
- ❖ Glicerol (12%);
- ❖ Citrato de Sódio;
- ❖ Gentamicina.

2. GEYC (Glycerol Egg Yolk-Citrate)

- ❖ Em 65 mL de água estéril purificada adicionar 1,5 g de glicose e 1,3 g de citrato de sódio tribásico dihidratado;
- ❖ Adicionar 15 mL de glicerol e misturar bem;
- ❖ Adicionar 1,3 g de glicina. Quando dissolvido, filtrar a solução através de um poro de 0,45 μ m;
- ❖ Adicionar 20 mL de gema de ovo fresco (de preferência, obtido a partir de ovos específicos livre de patógenos, cerca de 10 mL de gema será obtida por ovo);
- ❖ Colocar toda a suspensão em banho maria a 56°C durante 40 min, homogeneizando algumas vezes;
- ❖ Verificar o pH da solução. Se estiver fora da faixa de 6,8-7,2, é necessário o descarte e novo preparo,
- ❖ Culturas bacterianas foram realizadas nesta fase, para testar a esterilidades;
- ❖ Dispensar a solução em alíquotas de 2 mL em criotubos estéreis e armazenar a 70°C;
- ❖ Usar em até 3 meses.

3.

Em GEYC + 0,05% DE Goma Ágar

- ❖ Em 1mL de água purificada adicionar 0,0025g de goma ágar, homogeneizar com mistura suave;
- ❖ Deixar a solução a temperatura ambiente por 25°C por 24 horas;
- ❖ Em 4 mL de solução de GEYC adicionar o 0,0025g de goma ágar dissolvida em 1 mL de água purificada;
- ❖ Usar em até 3 meses.

4. GEYC + 0,10% DE Goma Ágar

- ❖ Em 1mL de água purificada adicionar 0,005g de goma ágar, homogeneizar com mistura suave;
- ❖ Deixar a solução a temperatura ambiente por 25°C por 24 horas;
- ❖ Em 4 mL de solução de GEYC adicionar o 0,0075g de goma ágar dissolvida em 1 mL de água purificada;
- ❖ Usar em até 3 meses.

5. GEYC + 0,15% DE Goma Ágar

- ❖ Em 1mL de água purificada adicionar 0,075g de goma ágar, homogeneizar com mistura suave;
- ❖ Deixar a solução a temperatura ambiente por 25°C por 24 horas;
- ❖ Em 4 mL de solução de GEYC adicionar o 0,005 g de goma ágar dissolvida em 1 mL de água purificada;
- ❖ Usar em até 3 meses.

6. GEYC + 0,20% DE Goma Ágar

- ❖ Em 1mL de água purificada adicionar 0,010g de goma ágar, homogeneizar com mistura suave;
- ❖ Deixar a solução a temperatura ambiente por 25°C por 24 horas;
- ❖ Em 4 mL de solução de GEYC adicionar o 0,010g de goma ágar dissolvida em 1 mL de água purificada;
- ❖ Usar em até 3 meses.

ANEXO 3:

PREPARO DA SOLUÇÃO DE EOSINA 0,5%

1. Solução de eosina a 0,5%:

- ❖ Diluir 0,25 g de eosina em 50 mL de solução fisiológica (NaCl 0,9%);
- ❖ Aquecer a solução para a dissolução;
- ❖ Esfriar a solução em temperatura ambiente;
- ❖ Filtrar usando filtro de papel;

Obs* Reagente estável por 3 meses à temperatura ambiente.

Procedimento:

- ❖ Em uma lâmina, colocar 5µl da amostra seminal homogeneizada;
- ❖ Adicionar 5µl da solução de eosina a 0,5% e misturar bem por 15 segundos;
- ❖ Cobrir com lamínula;
- ❖ Contar 100 espermatozoides utilizando aumento de 400X;
- ❖ Calcular a porcentagem de espermatozoides vivos (não corados) e mortos (corados). (OMS, 2010).