

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciência da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia

**Efeito dos processamentos seminais na funcionalidade dos espermatozoides
após a criopreservação**

Ana Paula de Souza Kussler

Porto Alegre, 2018

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia

**Efeito dos processamentos seminais na funcionalidade dos espermatozoides
após a criopreservação**

Msc. Ana Paula de Souza Kussler

Orientadora: Prof. Dra. Helena von Eye
Corleta

Tese apresentada como requisito parcial
para obtenção do título de Doutor no
Programa de Pós-Graduação em Ciências
da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia,
Faculdade de Medicina, Universidade
Federal do Rio Grande do Sul.

Porto Alegre, 2018

CIP - Catalogação na Publicação

Kussler, Ana Paula de Souza
Efeito dos processamentos seminais na
funcionalidade dos espermatozoides após a
criopreservação / Ana Paula de Souza Kussler. --
2019.
155 f.
Orientador: Helena von Eye Corleta.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de
Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e
Obstetrícia, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Sêmen. 2. Criopreservação. 3. Processamento
Seminal. 4. Reprodução Assistida. I. Corleta, Helena
von Eye, orient. II. Título.

À minha mãe pelo incentivo, dedicação e amor de sempre, aos meus irmãos que sempre estiveram ao meu lado e meu amor pela total dedicação em me auxiliar a realizar esse sonho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer **a minha mãe Darlise e aos meus irmãos Ana Carolina e Rudy**, pelo amor, pela ajuda, pela confiança e pela paciência. E também pedir desculpas, pela minha grande ausência neste tempo de doutorado. Sem esquecer minha “hermana” **Leticia** fundamental e sempre presente quando mais precisei.

Ao meu amor **Leonardo**, por todo apoio e por estar sempre presente em todos os momentos de alegria e angústia.

Às minhas duas parceiras de vida **Lisia e Kamila** pelos momentos de descontração, pelo ombro amigo e por aguentarem meus desabafos.

Às minhas amigas amadas **Fê, Dê, Cira e Joy** por aceitarem minha ausência quando foi necessária e pela compreensão de sempre.

À minha querida orientadora, **professora Dra. Helena Corleta**, por ter me acolhido como orientanda. Muito obrigada pela confiança, carinho e por toda a ajuda durante esta trajetória.

Ao querido professor **Ivan Cunha Bustamante Filho** por toda a ajuda intelectual e financeira no desenvolvimento deste projeto e pelo compartilhamento de conhecimento. Com certeza a melhor coisa que ocorreu nestes quatro anos foi o privilégio deste encontro.

À minha colega **Elisa Negri** pela colaboração e parceria na execução deste projeto.

À minha grande amiga **Anita** por estar sempre disposta a me auxiliar quando preciso e por ser um anjo na minha vida com seus sábios conselhos.

À minha grande amiga e colega **Leticia Arruda**, por toda a ajuda, conselhos, dicas e suporte.

Aos professores **Ilma Brum** e **Edison Capp** e as colegas e amigos do **Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral (LABIMET)** do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelos momentos de alegria, amizade, ajuda e suporte nesses quatro anos de convivência.

À **Patricia Lopez e ao Hugo Bock** da Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo suporte e disposição para esclarecimento as minhas dúvidas referentes a metodologia deste projeto.

À professora **Sandrine Wagner**, por ter me dado a oportunidade de fazer o estágio docente na disciplina dela.

À equipe da **Equipal** e da **BD**, principalmente ao Renan Antonialli, pela ajuda e disposição com as dúvidas sobre citometria de fluxo.

À minha equipe da **Clínica Generar** (Isa, Ligi, Carol e Moretto), por todo carinho e ajuda.

Ao **Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre** pelo suporte estatístico e por estarem sempre dispostos ao auxílio frente as diferentes etapas de desenvolvimento deste projeto.

Ao **Fundo de Incentivo à Pesquisa do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação** do Hospital de Clínicas de Porto Alegre por conceder auxílio na compra dos materiais.

À **CAPES** pela bolsa de estudos, permitindo assim que eu me dedicasse ao projeto.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia** pela qualificação de excelência proporcionada.

A todos os **pacientes e voluntários** que aceitaram participar deste estudo, permitindo a utilização de seus dados neste trabalho.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | 9 |
| LISTA DE FIGURAS | 14 |
| LISTA DE TABELAS | 15 |
| RESUMO..... | 16 |
| ABSTRACT | 18 |
| INTRODUÇÃO | 20 |
| REVISÃO DA LITERATURA..... | 23 |
| 1 Estratégias para localizar e selecionar as informações | 23 |
| 2 Mapa Conceitual..... | 25 |
| 3 Criopreservação do Sêmen Humano..... | 27 |
| 3.1 Histórico | 27 |
| 3.2 Indicações para Criopreservação do Sêmen..... | 28 |
| 3.3 Fundamentos da Criobiologia do Espermatozoide | 32 |
| 3.4 Crioprotetores..... | 37 |
| 3.5 Técnicas de Criopreservação | 44 |
| 3.6 Criopreservação do Sêmen após Processamento | 49 |
| 3.7 Efeitos da Criopreservação sobre a Qualidade Espermática | 62 |
| JUSTIFICATIVA | 74 |
| HIPÓTESES..... | 75 |

| | |
|----------------------------|-----|
| OBJETIVOS | 76 |
| OBJETIVO PRINCIPAL..... | 76 |
| OBJETIVOS SECUNDÁRIOS..... | 76 |
| REFERÊNCIAS..... | 78 |
| ARTIGO EM INGLÊS | 99 |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS | 148 |
| PERSPECTIVAS..... | 150 |
| ANEXOS | 151 |

LISTA DE ABREVIATURAS

% - Porcentagem

µg - micrograma

µl – microlitro

µM – micromolar

ω3 PUFA- Ácidos Graxos Poli-insaturados Ômega-3

8OHdG – 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina

ACS – American Cancer Society

AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

AMPc – 3'5'-adenosina-monofosfato-cíclico

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATP – Adenosina-tripofosfato

BDNF – Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro

BHT – Hidroxitolueno Butilado

BSA – Albumina Sérica Bovina

C – Celsius

CAPES – Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior

CAT - Catalase

CCCP - *Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone*

cm – Centímetros

DAG – 1,2-diacilglicerol

DHA – Ácido Docosaheptaenoico

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

dUTP – Deoxyuridine Triphosphate

FIPE – Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos

FITC/PSA – *Fluorescein Isothiocyanate-labelled Pisum sativum agglutinin*

G – Força Gravitacional

GEE – *Generalized Estimating Equations*

GPPG – Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação

H₂DCFDA - *2' 7'-dichlorofluorescein diacetate*

HBPs – Proteínas de Ligação à Heparina

HCPA – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

HSA – Albumina Sérica Humana

ICSI – Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoides

IU – Inseminação Intrauterina

INCA – Instituto Nacional do Câncer

IUI – *Intrauterine Insemination*

JC1 - *5,5',6,6'-tetrachloro 1,1',3,3'-tetramethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide*

M540 – *Merocyanine 540*

MACS – *Magnetic Activated Cell Sorting*

MESA – Aspiração Microcirúrgica de Espermatozoides do Epidídimo

Min - Minuto

ml – Mililitros

mM - Milimolar

MMP – *Mitochondrial Membrane Potential*

nM - Nanomolar

OPS – *Open-pulled Straws*

PBS – Tampão Fosfato Salino

PESA – Aspiração Percutânea de Espermatozoides do Epidídimo

pH – Potencial Hidrogeniônico

PI – *Propidium Iodide*

PMSC – *Progressive Motile sperm count*

PPGGO – Programa de Pós-Graduação em Ginecologia e Obstetrícia

PRDX 2 – Peroxiredoxina 2

PrOH – 1,2 Propanodiol

PUFAs - Ácidos Graxos Poli-insaturados

RNA – Ácido Ribonucleico

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio

SOD – Superóxido Dismutase

TAT - Transativador Transcricional

TES - *N-Tris (hydroxymethyl) methylaminoethane sulfonic acid*]

TESA – Aspiração de Espermatozoides do Testículo

TESE – Extração de Espermatozoides do Testículo

TEST – Combinação tampões TES e TRIS

TMSC – *Total motile sperm count*

TRIS - *[(hydroxymethyl) aminomethane]*

TUNEL – *Terminal Deoxynucleotidyl Transferase deoxyuridine triphosphate*

Nick end labeling

TYB – *TEST-yolk Buffer*

UNIVATES – Universidade do Vale do Taquari

WHO – World Health Organization

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Mapa conceitual. | 25 |
| Figura 2. Gráfico da interação entre a velocidade de congelamento, “efeito solução”, formação de gelo intracelular e sobrevivência celular. Curva de congelamento na forma de um “U” invertido (adaptado de Benson et al., 2012). | 36 |
| Figura 3. Mudanças tipo capacitação na criopreservação. O resfriamento-congelamento/descongelamento gera choque frio e esforço osmótico na membrana plasmática do espermatozoide que resulta em danos à membrana e aumento da permeabilidade da membrana. A permeabilidade da membrana alterada causa influxo de cálcio que eleva a concentração intracelular de AMPc e DAG que, em última instância, leva à fosforilação da proteína tirosina. A geração de choque frio durante a criopreservação está associada a uma grande quantidade de ROS que também conduzem ao estresse oxidativo e fosforilação da tirosina. ? : via desconhecida (adaptado de Naresh; Atreja, 2015). | 66 |
| Figura 4. Efeitos prejudiciais da criopreservação na integridade do espermatozoide e eventos associados que levam à apoptose e ao declínio na função espermática. O uso apropriado de técnicas de seleção de espermatozoides e crioprotetores podem minimizar esses efeitos prejudiciais (adaptado de Said; Gaglani; Agarwal, 2010). | 71 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Estratégia de busca bibliográfica | 24 |
|--|----|

RESUMO

Introdução: A criopreservação seminal provoca danos significativos no espermatozoide, por isso diferentes métodos de criopreservação têm sido estudados. **Objetivos:** Comparar os efeitos do processamento pelo gradiente de densidade e o lavado com remoção do plasma seminal concomitantes a criopreservação nos parâmetros seminais, dano oxidativo, fragmentação do DNA, criocapacitação e integridade do acrossoma e mitocôndria. **Método:** A amostra seminal de 26 pacientes normozoospermicos foi dividida em 3 partes, uma com plasma seminal, a segunda após realização do lavado e a terceira após seleção pelo gradiente de densidade. As amostras foram criopreservadas por no mínimo duas semanas e os parâmetros seminais, produção de ROS com a sonda DCF, a peroxidação da membrana plasmática com uso da sonda BODIPY, a fragmentação do DNA por TUNEL, a integridade do acrossoma pela sonda FITC/PSA, a desordem lipídica da membrana plasmática pela sonda Merocianina 540 e o potencial mitocondrial pela sonda JC1, foram avaliados por citometria de fluxo e analisados nas amostras antes da criopreservação e após o descongelamento. **Resultados:** O processamento pelo gradiente de densidade selecionou espermatozoides móveis, com morfologia normal e viáveis ($p < 0,05$). A criopreservação afetou negativamente os parâmetros seminais nos processamentos, mesmo que a recuperação de espermatozoides seja menor no gradiente densidade após o descongelamento a motilidade progressiva, motilidade total, vitalidade e morfologia permaneceram superiores ($p < 0,05$). O gradiente de densidade selecionou células com menor dano oxidativo, menor desordem lipídica da membrana plasmática, maior integridade do DNA e do acrossoma e com maior potencial mitocondrial ($p < 0,05$). A

criopreservação não aumentou as ROS, a peroxidação lipídica da membrana plasmática nem dano ao DNA, paralelamente houve prejuízo ao acrossoma, à mitocôndria e a desordem lipídica da membrana plasmática. **Conclusão:** A criopreservação compromete significativamente os parâmetros seminais (motilidade, morfologia, viabilidade); e acarreta danos estruturais ao acrossoma e as mitocôndrias do espermatozoide. Em pacientes normozoospermicos o gradiente foi capaz de selecionar espermatozoides de melhor qualidade (integridade do DNA, do acrossoma, da mitocôndria, peroxidação lipídica e da desordem lipídica da membrana plasmática) em comparação aos outros processamentos, sendo que este benefício foi mantido após o e congelamento/descongelamento das amostras.

Palavras-chave: Sêmen. Espermatozoide. Gradiente de densidade. Criopreservação. Lavado. Plasma seminal.

ABSTRACT

Background: Seminal cryopreservation causes significant damage to the sperm, therefore, different methods of cryopreservation have been studied.

Aim: Comparing the effects of density gradient processing and the washed with seminal plasma removal concomitant to cryopreservation in seminal parameters, oxidative damage, DNA fragmentation, cryo-capacitation and acrosome and mitochondrial integrity. **Methods:** The seminal sample of 26 normozoospermic patients was divided into 3 parts, one with seminal plasma, the second one after accomplishing the washed and the third one, after the selection through density gradient. The samples were cryopreserved for at least two weeks. The seminal parameters, ROS production with the DCF probe, plasma membrane peroxidation using the BODIPY probe, DNA fragmentation by TUNEL, acrosome integrity by FITC/PSA probe, the lipid disorder of the plasma membrane by the merocyanine 540 probe and the mitochondrial potential by the JC1 probe were evaluated through flow cytometry and analyzed in the samples before cryopreservation and after thawing. **Results:** Density gradient processing selected mobile and viable sperm with normal morphology ($p < 0,05$). Cryopreservation negatively affected seminal parameters in the processing, and even if the sperm recovery was lower in the density gradient after the thawing, progressive motility, total motility, vitality and morphology remained higher ($p < 0,05$). The density gradient selected cells with lower oxidative damage, lower plasma membrane lipid disorder, higher DNA and acrosome integrity and with higher mitochondrial potential ($p < 0,05$). Cryopreservation did not increase the ROS or the lipid peroxidation of the plasma membrane or damage to the DNA, in parallel, there was damage to the

acrosome, the mitochondria and the lipid disorder of the plasma membrane.

Conclusion: The cryopreservation significantly compromises the seminal parameters (motility, morphology, viability); and causes structural damage to the acrosome and to the mitochondria of the spermatozoa. In normozoospermic patients, the gradient was able to select better quality spermatozoon (integrity of DNA, acrosome, and mitochondria, lipid peroxidation and plasma membrane lipid disorder) compared to the other processes, and this benefit was kept after the thawing of the samples.

Keywords: Semen. Spermatozoa. Density gradient. Cryopreservation. Sperm wash. Seminal plasma.

INTRODUÇÃO

A criopreservação de espermatozoides consiste no procedimento padrão para preservar a fertilidade masculina previamente a tratamentos e doenças que possam acarretar na perda temporária ou permanente da fertilidade masculina. O tratamento de tumores do trato geniturinário masculino, muitas vezes com cirurgias mutiladoras ou radioterapia, e a quimioterapia sistêmica utilizada em diversas neoplasias, são as maiores indicações para criopreservação do sêmen (MORTIMER, 2004). Nas últimas décadas o câncer se tornou um problema de saúde pública, segundo estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA), 600.000 novos casos serão diagnosticados no biênio 2018-2019. Uma grande preocupação é o aumento no número de casos de tumores em homens jovens e adultos em idade reprodutiva, como é o caso dos tumores de testículo e do Linfoma de Hodking. Segundo o *American Cancer Society* (ACS), 1 em cada 263 homens desenvolverão câncer de testículo durante a vida e, em 2018, 9.310 novos casos deste tumor serão diagnosticados. Com o avanço das terapias oncológicas as taxas de sobrevivência ao câncer vêm aumentando significativamente. Infelizmente, os pacientes curados frequentemente tem sua fertilidade comprometida, estudos recentes demonstram que 51 a 70% de homens jovens sobreviventes do câncer desejam ter filhos no futuro, portanto, a preservação da fertilidade é um tema extremamente relevante (ACS, 2017; INCA, 2017; NANGIA; KRIEG; KIM, 2013).

Além, disso, amostras de sêmen de doadores têm sido amplamente utilizadas em centros de reprodução assistida e somente podem ser utilizadas 6 meses após congelamento e novo rastreamento das doenças infecciosas. Estima-se que no mundo 30.000 nascimentos/ano ocorram através de inseminação intrauterina com o uso de sêmen criopreservado de doadores, no Brasil, em 2017, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), publicou em seu primeiro relatório de importação de amostras de sêmen criopreservados, que entre 2011 e 2016 houve um aumento de 2.625% na importação de sêmen criopreservado provenientes de bancos de sêmen (ANVISA, [s.d.]; MORTIMER, 2004).

Embora a criopreservação do sêmen tenha grandes benefícios práticos para os procedimentos de reprodução assistida, sabe-se, que o processo de criopreservação que envolve resfriamento, congelamento e descongelamento provoca alterações e danos celulares conhecidos como crioinjúrias. Estas surgem principalmente devido a formação de cristais de gelo intra e extracelular, toxicidade química dos crioprotetores, estresse osmótico e choque frio. Sabe-se que durante a criopreservação, os espermatozoides sofrem mudanças extremas em componentes intra e extracelulares. Os efeitos químicos, físicos e osmóticos deste processo são conhecidos por diminuir a capacidade de fertilização dos espermatozoides, podendo resultar na perda da integridade estrutural e da capacidade funcional de, pelo menos, 50% dos espermatozoides. Amostras de sêmen de homens com parâmetros seminais alterados, podem ter a taxa de sobrevivência ainda mais comprometida (BENSON et al., 2012; PAOLI et al., 2014; PETRUNKINA, 2007). A

criopreservação acarreta também mudanças na composição lipídica da membrana, alterações no acrossoma, perda da viabilidade da membrana plasmática, redução importante da motilidade, alterações morfológicas e fragmentação do DNA (DI SANTO et al., 2012; KALTHUR et al., 2008; NIJS; OMBELET, 2001; OEHNINGER et al., 2000)

As técnicas de seleção de espermatozoides são normalmente usadas após o processo de criopreservação, mas com o intuito de melhorar os resultados deste procedimento, os espermatozoides têm sido submetidos a estas técnicas antes do processo de criopreservação para congelar somente a fração de espermatozoides com melhor qualidade, tendo a possível desvantagem de remover o plasma seminal que poderia proteger os espermatozoides de danos provenientes da criopreservação devido à presença de antioxidantes. Embora bancos de sêmen de doadores habitualmente utilizem esta técnica, poucos estudos foram realizados para comprovar a eficácia da mesma e os dados são bastante contraditórios (PALOMAR RIOS; MOLINA BOTELLA, 2017; SHARMA et al., 2015).

Com o intuito de aprimorar os estudos relacionados a melhora na congelabilidade do sêmen humano e preservação da fertilidade masculina, além de melhores resultados nos tratamento de reprodução assistida, este trabalho se propõe a comparar os parâmetros seminais, a fragmentação do DNA, os marcadores de estresse oxidativo e avaliações funcionais do espermatozoide, comparando o congelamento convencional com o congelamento após dois métodos de processamento seminal (lavado/centrifugação e gradiente de densidade).

REVISÃO DA LITERATURA

1 Estratégias para localizar e selecionar as informações

A busca de artigos para a revisão da literatura foi realizada no PUBMED com o cruzamento das seguintes palavras-chave: 1) *cryopreservation and human sperm* 2) *cryopreservation and human semen* 3) *sperm cryopreservation and DNA fragmentation* 4) *sperm cryopreservation and apoptosis* 5) *sperm cryopreservation and oxidative stress* 6) *processing human semen and cryopreservation* 7) *cryopreservation human sperm and seminal plasma*.

Cruzando as palavras-chave *cryopreservation and human sperm* foram encontrados 2.911 artigos. Ao se cruzar *cryopreservation and human semen* foram encontrados 1.509 artigos. Em relação ao cruzamento das palavras-chave *sperm cryopreservation and DNA fragmentation*, foram encontrados 254 artigos. No cruzamento de *sperm cryopreservation and apoptosis* foram encontrados 140 artigos. Cruzando *sperm cryopreservation and oxidative stress* encontrou-se 189 artigos. Ao cruzar *processing human semen and cryopreservation* foram encontrados 57 artigos. No cruzamento de *cryopreservation human sperm and seminal plasma* foram encontrados 1330 artigos.

Os artigos foram selecionados para a revisão a partir da leitura de seu resumo. Foram utilizados 141 artigos a partir das palavras-chave e seus cruzamentos e também incluídas 3 webpages com dados sobre câncer e dados da ANVISA, 3 livros, 6 artigos usados exclusivamente na metodologia dos

experimentos, 15 artigos selecionados a partir das referências de outros artigos e 21 artigos da leitura de revistas científicas totalizando 189 referências utilizadas.

| Descritores | Artigos encontrados | Artigos usados |
|--|----------------------------|-----------------------|
| <i>cryopreservation human sperm</i> | 2911 | 70 |
| <i>cryopreservation human semen</i> | 1509 | 10 |
| <i>sperm cryopreservation AND DNA fragmentation</i> | 254 | 25 |
| <i>sperm cryopreservation AND apoptosis</i> | 140 | 6 |
| <i>sperm cryopreservation AND oxidative stress</i> | 189 | 5 |
| <i>processing human semen AND cryopreservation</i> | 57 | 22 |
| <i>cryopreservation human sperm AND seminal plasma</i> | 1330 | 3 |
| Total | | 141 |

Tabela 1. Estratégia de busca bibliográfica

2 Mapa Conceitual

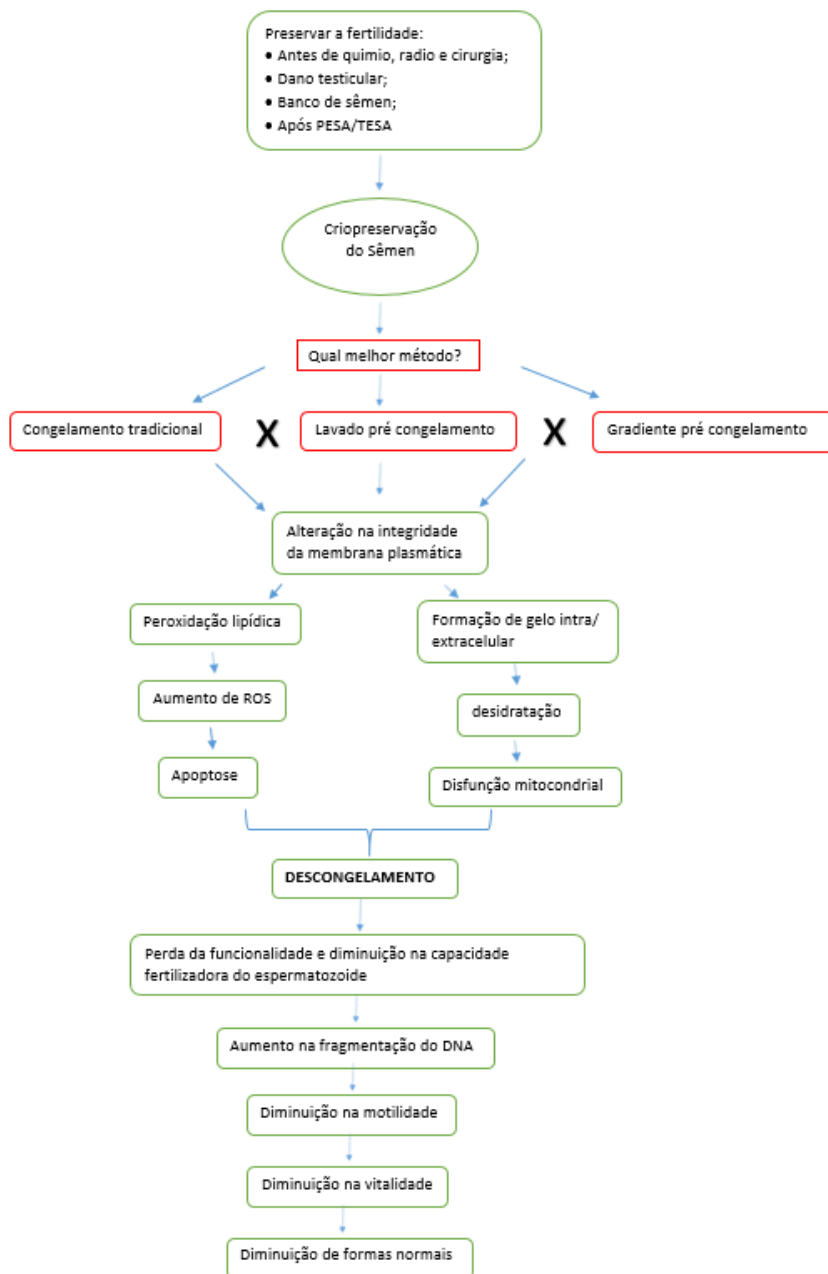


Figura 1. Mapa conceitual.

A criopreservação de sêmen é utilizada para preservar a fertilidade de homens frente a diferentes situações, sendo muitas vezes, a única

possibilidade de paternidade genética, mediante técnicas de reprodução assistida.

Embora usada rotineiramente, sabe-se que não mais que 50% dos espermatozoides sobrevivem a criopreservação, devido aos danos físicos, químicos e osmóticos, que acarretam alterações nos parâmetros seminais, como motilidade, morfologia e na fragmentação do DNA do espermatozoide, causando perda da funcionalidade e diminuição da capacidade fertilizadora do espermatozoide.

Devido ao impacto negativo da criopreservação nos parâmetros da amostra seminal, principalmente quando o homem apresenta alterações nos parâmetros seminais. Diferentes métodos de congelamento têm sido estudados, entre eles o de congelar os espermatozoides removendo o plasma seminal por centrifugação ou ainda selecionando os melhores espermatozoides através de um processamento como o gradiente de densidade.

3 Criopreservação do Sêmen Humano

3.1 Histórico

A criobiologia por definição significa *cryo*=frio, *bios*=vida e *logos*=ciência, sendo o ramo da biologia que estuda os efeitos de baixas temperaturas em células, tecidos e organismos vivos (ALMODIN; COSTA, 2011).

Os primeiros relatos de testes de criopreservação seminal aconteceram há mais de 200 anos. O padre italiano e fisiologista Lazzaro Spallanzani, em 1776 reportou que espermatozoides poderiam ser armazenados pelo congelamento na neve. Em 1886, Paolo Mantegazza propôs o congelamento seminal para a formação de bancos de sêmen, visando garantir a continuação da linhagem de soldados que foram para a guerra. Observou que uma pequena porção do sêmen armazenado por um longo tempo a aproximadamente -15°C recuperava a motilidade após o descongelamento. No final da década de 30 vários estudos demonstraram que espermatozoides resistem ao congelamento a baixas temperaturas. Jahnel, em 1937, descobriu acidentalmente, que espermatozoides humanos sobreviveram ao armazenamento a temperaturas de -79°C , -196°C e -269°C . No entanto, após o descongelamento apenas 10% recuperavam a motilidade (ALMODIN; COSTA, 2011; ANGER; GILBERT; GOLDSTEIN, 2003; BROTHERTON, 1990; PAOLI et al., 2014).

Em 1949 houve o grande avanço na área da criopreservação, quando Polge descobriu que o glicerol poderia atuar como um crioprotetor. Em 1953 Bunge e Sherman relataram 3 gestações após inseminação com

espermatozoides tratados com glicerol e armazenados em gelo seco a -70°C por 6 semanas. Outros relatos de gestação, entre 1954 e 1958, foram reportados no Japão e nos Estados Unidos. Sherman em 1963 introduziu o congelamento de sêmen humano em vapor de nitrogênio líquido e seu armazenamento a -196°C , seguido de relatos de nascimentos normais. A introdução da gema de ovo como meio crioprotetor, juntamente com o uso do congelamento gradual em pellets ou palhetas em 1964, aumentaram as taxas de gestação. Neste mesmo ano, nascimentos após inseminação intrauterina com o uso de espermatozoides congelados e armazenados por 5 meses em nitrogênio líquido foram relatados por Perloff. Os primeiros criobancos comerciais de sêmen humano foram abertos nos Estados Unidos durante a década de 1970, visando fornecer um "seguro de fertilidade" para milhões de homens que fariam vasectomias. No entanto, a expansão dos bancos de sêmen comerciais ocorreu na segunda metade da década de 1980, quando a necessidade absoluta de sêmen de doadores em quarentena para reduzir o risco de transmissão da AIDS foi estabelecida. Existem bancos de sêmen com disponibilidade mais de 200 doadores. Atualmente, a inseminação heteróloga (sêmen de doador criopreservado) proveniente de banco é responsável por 30.000 nascimentos/ano (ANGER; GILBERT; GOLDSTEIN, 2003; BENSON et al., 2012; BROTHERTON, 1990; MORTIMER, 2004; PAOLI et al., 2014).

3.2 Indicações para Criopreservação do Sêmen

A criopreservação de gametas masculinos oferece a homens e meninos a possibilidade de preservar sua fertilidade, ou conservar seus gametas frente a diferentes situações onde a capacidade reprodutiva pode ser colocada em risco (NIJS; OMBELET, 2001). A criopreservação deve ser considerada nas seguintes situações:

- Antes do tratamento de doenças malignas: pacientes submetidos a tratamentos com quimioterapia citotóxica, radioterapia e alguns tipos de tratamento cirúrgico, principalmente a orquiectomia. Agentes alquilantes e outros quimioterápicos podem causar azoospermia em 90 a 100% dos homens tratados. Embora os tratamentos quimioterapêuticos estejam menos agressivos, a incidência de azoospermia permanece alta, com 20 a 50% dos pacientes recuperando a espermatogênese. A resposta aos tratamentos varia consideravelmente, dependendo do tipo e dose do quimioterápico administrado; e no caso da radioterapia, a dosagem de irradiação, o tempo de exposição, e a resposta individual do paciente. Como é difícil prever qual paciente sobreviverá a doença e qual se tornará infértil após o tratamento, a criopreservação dos espermatozoides é fortemente recomendada para todos os pacientes com doenças malignas. Como os efeitos dos agentes quimioterápicos nos espermatozoides e espermatogônias não são totalmente conhecidos, recomenda-se que a criopreservação seja realizada antes do início da quimioterapia e a contracepção eficaz deve ser realizada desde o início da quimioterapia até 12 a 18 meses após.

- Criopreservação pré-operatória: A criopreservação pode ser utilizada como um “seguro de fertilidade” antes de procedimentos cirúrgicos como a vasectomia, caso no futuro haja desejo de ter filhos. Nos casos de correção cirúrgica da varicocele em homens com oligozoospermia severa, caso a cirurgia não melhore os parâmetros seminais ou caso ocorra azoospermia pós-operatória no caso de lesão ou ligação da artéria testicular.
- Recuperação cirúrgica de espermatozoides: A criopreservação de espermatozoides do epidídimo pode ser realizada nos casos de azoospermia obstrutiva, como na ausência bilateral congênita dos vasos deferentes através da aspiração microcirúrgica de espermatozoides do epidídimo (MESA) e da aspiração percutânea de espermatozoides do epidídimo (PESA). Em procedimentos complexos de reconstrução cirúrgica (vasovasostomia, vasoepididimostomia e na falha de reversão da vasectomia) podem ser captados espermatozoides para criopreservação. A criopreservação de espermatozoides testiculares pode ser realizada durante uma biópsia testicular diagnóstica, em homens com falência testicular e espermatogênese focal e azoospermia obstrutiva, podendo ser usada a aspiração de espermatozoides testiculares (TESA) ou a extração de espermatozoides testiculares (TESE). A criopreservação evita a necessidade de repetição de procedimentos invasivos e para evitar a ausência de espermatozoides no dia da punção dos oócitos em ciclo de Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI).

- Criopreservação antes do tratamento de doenças não malignas: Recomenda-se a criopreservação de espermatozoides para homens com doenças sistêmicas não malignas (doenças autoimunes, diabetes, colite ulcerativa e transplante de coração) onde a doença ou o seu tratamento, como o uso de imunossupressores e terapias citotóxicas possam causar infertilidade (ANGER; GILBERT; GOLDSTEIN, 2003).
- Conveniência do paciente: A criopreservação de espermatozoides pode ser utilizada quando o homem não pode estar presente no dia do tratamento reprodutivo ou apresenta dificuldade para a coleta de sêmen no dia do procedimento de reprodução assistida (MORTIMER, 2004).
- Homens com oligoastenoteratozoospermia: Para se obter um número suficiente de espermatozoides, homens inférteis com diferentes graus de oligoastenoteratozoospermia realizam diversas coletas para armazenamento e subsequente *pooling* destas amostras (MORTIMER, 2004; OEHNINGER et al., 2000).
- Por precaução para atividades ocupacionais de alto risco: Algumas profissões podem provocar consequências para a saúde, incluindo a infertilidade masculina. São os casos de homens expostos a toxinas ambientais como químicos, pesticidas, herbicidas, chumbo, radiação, entre outros; atletas profissionais com risco de lesão testicular e mergulhadores de grandes profundidades (ALMODIN; COSTA, 2011).
- Sêmen de doadores: Para evitar assim a transmissão de agentes infecciosos sexualmente transmissíveis, os bancos de sêmen têm a

obrigação de seguir os critérios de quarentena da amostra e repetição dos testes sorológicos para infecções como HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana) e hepatites em um prazo nunca inferior a 6 meses, sendo portanto, obrigatório que as amostras de sêmen de doadores sejam criopreservadas antes de seu uso (MORTIMER, 2004).

- Prevenir a transmissão do vírus Zica: Em 2017, a mais recente indicação, consiste no congelamento e armazenamento do sêmen para prevenir a transmissão do vírus Zica antes de viagens para áreas afetadas pelo mesmo (FEINBERG, 2017).

3.3 Fundamentos da Criobiologia do Espermatozoide

A complexidade da criobiologia está profundamente enraizada no comportamento complexo dos sistemas celulares vivos e sua resposta a mudanças massivas de temperatura. Para garantir o máximo sucesso durante a criopreservação é essencial uma compreensão completa da fisiologia do espermatozoide. O processo de criopreservação leva a danos ao espermatozoide denominados crioinjúrias que surgem principalmente devido: 1) formação de cristais de gelo intracelular; 2) toxicidade química dos crioprotetores; 3) estresse osmótico; 4) formação de cristais de gelo extracelular; 5) choque frio; 6) mudanças de volume na célula devido a desidratação/reidratação e 7) recristalização no descongelamento (HEZAVEHEI et al., 2018; PETRUNKINA, 2007).

A vida celular depende da interação simultânea de várias reações químicas, mantidas em equilíbrio através de mecanismos de controle homeostático. O armazenamento à longo prazo somente é possível minimizando estas reações, diminuindo a temperatura até a vida estar criogenicamente suspensa. Em nitrogênio líquido a -196°C , nenhuma reação química pode ocorrer, pois a energia térmica é insuficiente a esta temperatura. A água, abaixo de -130°C , existe apenas em estado cristalino ou vítreo, em que sua viscosidade se torna tão alta que limita sua difusão (PAOLI et al., 2014).

O processo de criopreservação envolve a redução da temperatura, desidratação celular, congelamento e descongelamento e leva a danos funcionais e morfológicos nas células, por estar associado a consideráveis mudanças osmóticas uma vez que durante o congelamento, as células se tornam desidratadas e, durante o descongelamento, quando ocorre o reequilíbrio da água, elas são submetidas a um desafio hipotônico. A fase de transição da água para o gelo é considerada o evento mais crítico, com respeito a sobrevivência, que a célula deve superar, pois existe uma região crítica de temperatura dentro da qual as células são irreversivelmente danificadas se os cristais de gelo permanecem dentro delas por mais de alguns segundos (PAOLI et al., 2014; PETRUNKINA, 2007).

Com a temperatura ao redor de -5°C a água intra e extracelular permanece não congelada em um estado super-resfriado, os solutos no meio aquoso em que as células estão suspensas diminuem seu ponto de congelamento entre -10 e -15°C , abaixo da água pura (0°C). Nesta temperatura, a água no meio extracelular congela, aumentando a concentração

dos solutos, isto gera uma pressão osmótica, fazendo com que o solvente flutue através da membrana plasmática, de dentro para fora da célula. Esta necessidade extracelular de água leva a uma redução no volume da célula e então a desidratação, um processo essencial para proteger as células da formação de cristais de gelo intracelular. No entanto, o processo intenso de desidratação pode exceder a tolerância osmótica em que não há retorno (aproximadamente 40% do volume original da célula), e a célula sofre danos permanentes. Durante o descongelamento, ocorre o inverso. As células são ressuscitadas na solução hipertônica descongelada, que se torna progressivamente diluída à medida que descongela. Isto faz com que a água retorne para dentro da célula (osmose reversa), restaurando o conteúdo intracelular e o volume celular, nesta fase, há o risco da formação de cristais de gelo intracelular (recristalização) (MEDEIROS et al., 2002; PAOLI et al., 2014).

Quando o processo de congelamento é muito rápido leva a formação de cristais de gelo intracelular. Neste caso, a desidratação não será completa e a água será mantida dentro da célula, onde poderão ser formados cristais de gelo. O congelamento rápido pode também levar a grandes gradientes na pressão osmótica através da membrana plasmática que ficará danificada em um gradiente de pressão crítica, e o congelamento intracelular também ocorrerá como resultado desse dano. A formação de grandes cristais de gelo está associada a morte celular e embora taxas de congelamento mais moderadas são associadas a formação de cristais de gelo menores, eles podem ser recristalizados após o descongelamento se tornando letais. No entanto se o congelamento progride a taxas muito lentas, a desidratação

ocorrerá por um longo período de tempo, a água extracelular congela antes da água intracelular e o ambiente extracelular se torna então hipertônico. As células serão expostas a altas concentrações de sal, fazendo com que a água saia de dentro para fora da célula, causando excessiva desidratação em que as células atingiram um certo grau de encolhimento associado com perturbações celulares graves. A crioinjúria devido ao encolhimento excessivo da célula e a longa exposição a altas concentração de solutos é referida como “efeito solução” (AGCA; CRITSER, 2002; PAOLI et al., 2014; PETRUNKINA, 2007).

Mazur em 1972 sugeriu então que a taxa de congelamento ideal deve ser rápida o suficiente para evitar o efeito solução, mas lenta o suficiente para que as células possam desidratar o suficiente para evitar a formação de cristais de gelo intracelular. As taxas devem ser lentas o suficiente para permitir a célula minimizar o potencial químico e o gradiente de osmolaridade através da membrana plasmática, além de desidratar sem ser exposta a concentrações de sal letais. Esse congelamento em "equilíbrio" leva ao encolhimento tolerável das células, a um aumento do potencial químico intracelular e à diminuição da temperatura de congelamento. Devido à diminuição da quantidade de água intracelular e à depressão do ponto de congelamento, o risco potencial de formação de gelo intracelular é reduzido, de modo que apenas se formará gelo extracelular. Assim, a forma característica da curva que planeja a sobrevivência celular contra a taxa de congelamento é um "U" invertido, com uma taxa de resfriamento crítica para a sobrevivência máxima (**Figura 2.** . Conforme essa teoria, o descongelamento também deve ser realizado de forma correta, pois a taxa de aquecimento influencia a sobrevivência da célula. Assim a temperatura

usada para o descongelamento depende diretamente das taxas de congelamento utilizadas, evitando assim o fenômeno da recristalização que acontece principalmente quando as células são congeladas rapidamente e aquecidas lentamente. (BENSON et al., 2012; PAOLI et al., 2014; PETRUNKINA, 2007).

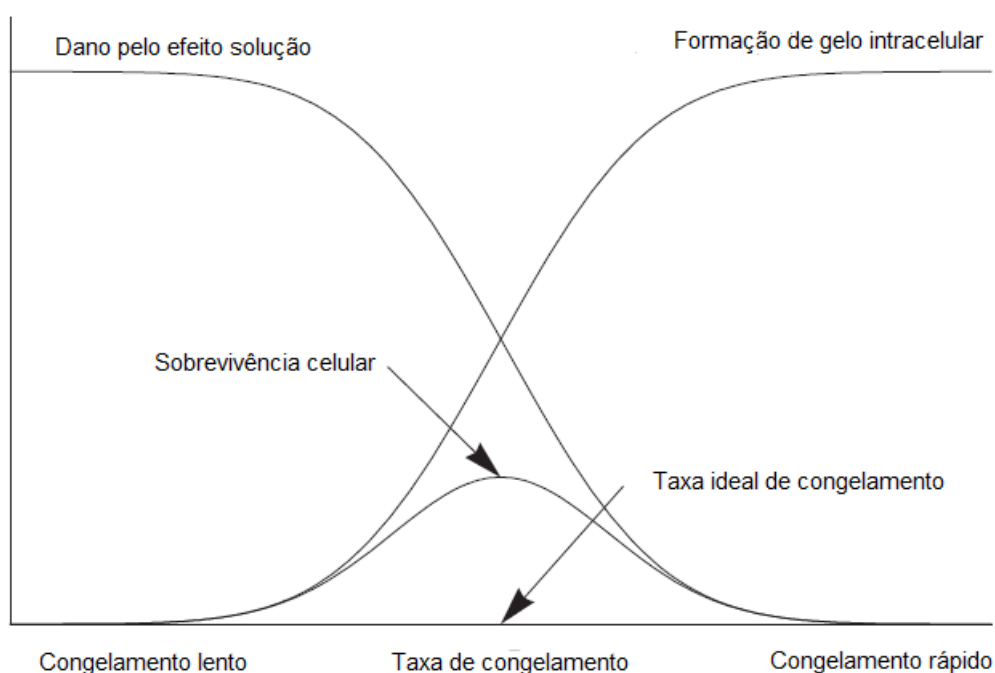


Figura 2. Gráfico da interação entre a velocidade de congelamento, “efeito solução”, formação de gelo intracelular e sobrevivência celular. Curva de congelamento na forma de um “U” invertido (adaptado de Benson et al., 2012).

A capacidade de uma célula para sobreviver ao congelamento depende da sua forma, tamanho, teor de água, permeabilidade e composição lipídica da membrana. O espermatozoide humano pode tolerar uma série de variações de temperatura sendo bastante resistente aos danos causados pelo congelamento

rápido devido aos ácidos graxos insaturados na bicamada lipídica (65-70% de fosfolipídios - cadeias laterais do ácido docosaenoico), o que resulta em alta fluidez da membrana, para o seu tamanho pequeno da célula e para a organização celular compacta da cabeça. Seu baixo teor de água (cerca de 50%) também pode torná-los mais resistentes do que outras células aos danos do congelamento. No entanto, a motilidade geralmente é reduzida em 30-50% após o descongelamento. Na tentativa de diminuir os danos causados pela criopreservação houve a adição de soluções crioprotetoras e a criação de técnicas diferentes de congelamento que pudessem controlar melhor as curvas de congelamento (PAOLI et al., 2014).

3.4 Crioprotetores

Agentes crioprotetores devem estar presentes durante o congelamento e descongelamento para proteger as células dos efeitos adversos. São essenciais para evitar a formação de cristais de gelo intracelular, reduzir o ponto de congelamento, evitar o estresse osmótico e manter o potencial de hidrogênio (pH) (NIJS; OMBELET, 2001; SRIDHARAN; VICKRAM, 2016).

São divididos em duas classes gerais relacionadas com a sua capacidade de se mover através da membrana celular: Crioprotetores permeáveis penetram na membrana celular e incluem dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol, 1,2 pronanodiol (PROH) e etileno glicol, e os não-permeáveis, não atravessam a membrana celular e incluem sacarose, frutose, glicose, dextrose

e gema de ovo (PAOLI et al., 2014). Seus mecanismos de ação são diferentes. A crioproteção pelos agentes permeáveis pode ser explicada por suas propriedades coligativas, estas substâncias hidrofílicas possuem um peso molecular menor que 400 e atravessam a membrana muito facilmente, criando um gradiente osmótico pela diminuição do ponto de congelamento e fazendo com que a água deixe a célula, provocando a desidratação celular por substituição da água intracelular. Eles trabalham diretamente na membrana da célula, através das interações eletrostáticas, diminuindo o ponto de congelamento da solução e modificando o ambiente intra e extracelular, uma vez que a substituição da água evita a formação de cristais de gelo intracelular e diminui a quantidade de sais e solutos na fase líquida. Estes osmólitos penetráveis ainda estabilizam as proteínas intracelulares e diminuem o impacto dos eletrólitos intra e extracelulares dentro da célula (DI SANTO et al., 2012; FABOZZI et al., 2016; PAOLI et al., 2014; PETRUNKINA, 2007).

Já os crioprotetores não permeáveis são macromoléculas, com peso molecular maior que 1.000 ou moléculas de açúcar que aumentam a concentração de solutos extracelulares, assim gerando um gradiente osmótico que faz com que a água saia da célula, levando a desidratação antes do congelamento, permitindo que as células sejam resfriadas rapidamente, antes de sofrerem alguma injúria letal devido ao efeito da solução, além disso, atuam como tampões osmóticos protegendo a célula dos danos causados pelo inchaço durante o processo de adição e remoção do crioprotetor (FABOZZI et al., 2016; NIJS; OMBELET, 2001; PAOLI et al., 2014; PETRUNKINA, 2007).

O glicerol consiste no meio crioprotetor mais utilizado para criopreservar espermatozoides humanos. Ele atua na estrutura da membrana, na permeabilidade e estabilidade da bicamada lipídica, na associação de proteínas de superfície e no metabolismo da célula (DI SANTO et al., 2012). No entanto, alguns pesquisadores têm reportado que o glicerol foi metabolizado por muitas espécies, incluindo espermatozoides humanos e apresenta alguns efeitos negativos no espermatozoide, especialmente a citotoxicidade. Ele tem a capacidade de atuar como substrato, alterando e aumentando a demanda bioenergética dos espermatozoides (PAOLI et al., 2014; SRIDHARAN; VICKRAM, 2016). Também pode contribuir para a ativação das caspases diretamente via os efeitos tóxicos na mitocôndria. Sherman, em 1990 mostrou que o uso do glicerol sozinho, pode causar ondulações na membrana plasmática, alterações na membrana acrossomal interna, no núcleo e desorganização da crista mitocondrial (DI SANTO et al., 2012; SAID; GAGLANI; AGARWAL, 2010).

Outras substâncias como o DMSO e etileno glicol foram testadas, o primeiro se mostrou tóxico aos espermatozoides, diminuindo a porcentagem de espermatozoides móveis antes do congelamento e após o descongelamento (PAOLI et al., 2014). Gilmore e colaboradores, em três estudos compararam os crioprotetores glicerol, DMSO, propileno glicol e etileno glicol e verificaram que o espermatozoide é menos permeável ao DMSO e que o etileno glicol permeia o espermatozoide mais rapidamente, apresentando uma condutividade hidráulica maior e menor energia de ativação, fazendo com a célula assuma um maior grau de desidratação, mantendo assim um volume de água

intracelular perto do equilíbrio (GILMORE et al., 1995, 2000). Em outro estudo foi demonstrada maior sobrevivência do espermatozoide quando usado 1 molar de etileno glicol comparado a 1 molar de glicerol (GILMORE et al., 1997). O etileno glicol criopreservou amostras de sêmen em um estado mais fisiológico, uma vez que comparado ao glicerol e DMSO foi o melhor na prevenção da reação acrossômica, sendo capaz de proteger o acrossoma em mudanças de temperatura (ORTLOFF et al., 2006).

Vários aditivos foram estudados nos espermatozoides humanos, como o uso da gema de ovo de galinha relacionada a manutenção da fluidez da membrana plasmática, uma vez que atua como um reservatório de fosfolípidios e colesterol, o HEPES usado como tampão, o citrato de sódio, estreptomicina como antibiótico, os tampões zwitteriônicos TES [*N-Tris (hydroxymethyl) methylaminoethane sulfonic acid*] e TRIS [*(hydroxymethyl) aminomethane*] e a combinação de TES e TRIS (usualmente chamado de “TEST”) (BENSON et al., 2012; BROTHERTON, 1990; MORTIMER, 2004; STANIC et al., 2000).

Em dois estudos, 8 diferentes meios de criopreservação foram estudados. O meio contendo TEST, citrato de sódio, gema de ovo, frutose e glicerol à 6% apresentou melhores resultados de motilidade e longevidade (PRINS; WEIDEL, 1986; WEIDEL; PRINS, 1987). McGonagle, em 2002, comparou o uso de glicerol sozinho à 7% com o meio contendo glicerol-gema de ovo-citrato-glicose e com o meio contendo glicerol-TRIS-gema de ovo-glicose. Os dois últimos foram superiores ao uso de glicerol sozinho (MCGONAGLE et al., 2002). Atualmente, o meio contendo TEST-glicerol-gema de ovo (TEST-yolk) é o mais utilizado para congelamento de sêmen humano,

com estudos demonstrando sua efetividade frente a outros crioprotetores (HALLAK et al., 2000; HAMMADEH et al., 2001a, 2001b; STANIC et al., 2000).

Com as pesquisas realizadas, alguns meios comerciais foram propostos, trazendo um maior controle e padronização para as clínicas de reprodução assistida e bancos de sêmen, como o TYB (*TEST-yolk buffer*) da empresa Irvine, *Sperm Freeze Medium* da Medicult/Origio, *SpermCryo* da Provitro e *Enhance Sperm Freeze* da Conception Technologies e estudos mostram que o TYB é recomendado primeira escolha como meio crioprotetor de sêmen humano (FABOZZI et al., 2016; NALLELLA et al., 2004; PARAS et al., 2008).

Raad e colaboradores, em 2018, ao comparar 5 meios comerciais verificaram uma diminuição na motilidade e na porcentagem de espermatozoides com formas normais sem diferença no dano ao DNA no grupo de pacientes férteis, sendo o crioprotetor A (*Sydney IVF Sperm Cryopreservation Buffer* da empresa Cook Medical) o que provocou maior dano na motilidade e o crioprotetor E (TYB da empresa Irvine Scientific) o que gerou menos defeitos na cabeça do espermatozoide. Já no grupo de pacientes inférteis o crioprotetor E provocou maior recuperação na motilidade espermática e menor fragmentação do DNA e embora todos os meios tenham gerado dano na morfologia do espermatozoide, o TYB apresentou maior porcentagem de formas normais, porém também apresentou maior percentual de espermatozoides com cauda enrolada comparado aos demais meios. Os pesquisadores justificaram que estas diferenças entre os meios seriam devido a discrepância entre a osmolaridade dos mesmos, e concluíram que ainda não

há um único meio de criopreservação que forneça uma proteção completa aos espermatozoides (RAAD et al., 2018).

A eficácia do crioprotetor depende da sua concentração, modo de adição e de remoção, além do tempo de exposição das células ao meio. O glicerol tem apresentado melhores resultados, quando usado há uma concentração de 5-15%, sendo 7,5% a concentração considerada ótima, com um tempo de incubação de 10 minutos, para reduzir os efeitos tóxicos do meio (HAMMADEH et al., 2001b; ROYERE et al., 1996). Gao em 1995 determinou que o espermatozoide humano poderia encolher 0,75 vezes e aumentar 1,1 vezes o seu volume isosmótico sem perder a integridade funcional e demonstrou que quando espermatozoides humanos são expostos a 1 molar de glicerol em um único passo, o volume de excursão excede os limites toleráveis, tanto na adição quanto na remoção do crioprotetor e confirmou, através da recuperação da motilidade, uma vantagem da adição do crioprotetor em quatro passos de volume fixo (gota a gota) e a remoção em oito passos de molaridade fixa (GAO et al., 1995). A adição e remoção do glicerol em múltiplos passos pequenos, ao invés de um único passo, melhora a motilidade e a capacidade de fertilização dos espermatozoides após o descongelamento, provavelmente, devido a menor extensão de mudança de volume sob estas condições, minimizando assim o choque osmótico (WIDIASIH et al., 2009).

Atualmente, sabe-se que que o meio crioprotetor deve apresentar algumas características: 1) Compor de nutrientes como recurso energético; 2) Proteger do choque frio durante o resfriamento; 3) Diminuir a criolesão dos espermatozoides; 4) Prevenir a proliferação de bactérias; 5) Tampão de

qualquer alteração no pH; e 6) Manter a pressão osmótica e concentrar eletrólitos. No entanto o meio ideal para a criopreservação de espermatozoides humanos ainda está sendo buscado. (SRIDHARAN; VICKRAM, 2016). Alguns pesquisadores têm preconizado a substituição da gema de ovo de galinha, que poderia apresentar risco de doenças infecciosas, além de não apresentar uma composição padrão, podendo levar a variações de acordo com o status nutricional do ovo da galinha, com resultados bastante promissores (JEYENDRAN et al., 2008; MUTALIK et al., 2014; REED et al., 2009; TIWARI et al., 2017).

Uma das principais causas de criodano no espermatozoide consiste no desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a atividade antioxidante do sêmen, na criopreservação há uma produção excessiva de ROS e uma alteração no sistema de defesa antioxidante. Por isso, estudos suplementando os meios de criopreservação com antioxidantes enzimáticos, que participam do sistema de defesa antioxidante natural no espermatozoide (glutaciona peroxidase, glutaciona redutase, superóxido dismutase e catalase) e com antioxidantes não enzimáticos, também conhecidos como antioxidantes sintéticos ou dietéticos (glutaciona reduzida, urato, ácido ascórbico, vitamina E, carotenoides, ubiquinonas, taurina, hipotaurina, selênio e zinco) tem sido publicados (AMIDI et al., 2016).

Outros estudos ainda suplementaram o meio crioprotetor com gangliosídeos, zinco, fosfatidilcolina de soja, pentoxifilina, genisteína, resveratrol e com os antioxidantes hidroxitolueno butilado (BHT), melatonina, L-carnitina, extrato natural da *Opuntia ficus-indica* (uma espécie de cacto), fator

neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e a proteína TAT (transativador transcrricional) – peroxiredoxina 2 (PRDX 2), entre outros e os resultados são bastante interessantes, principalmente na proteção do DNA do espermatozoide e diminuição de ROS (ALIABADI et al., 2017; AMIDI et al., 2016; BANIHANI et al., 2014; GAVELLA et al., 2012; GHORBANI et al., 2015; KARIMFAR et al., 2015; KOTDAWALA et al., 2012; LIU et al., 2018; MEAMAR et al., 2012; NAJAFI et al., 2016; STANIC; SONICKI; SUCHANEK, 2002; VIREQUE et al., 2016).

3.5 Técnicas de Criopreservação

O sucesso na criopreservação de espermatozoides humanos depende de taxas ótimas de congelamento e descongelamento e para controlar as mesmas, há duas principais técnicas de congelamento usadas na criopreservação de espermatozoides: o congelamento lento e o congelamento rápido.

O congelamento lento, foi proposto por Behrman e Sawada em 1966 e consiste no congelamento progressivo dos espermatozoides em duas ou três etapas, através de um congelador automático semi programável que leva as células da temperatura ambiente a temperatura de armazenamento a uma taxa controlada. Os congeladores usam uma placa para segurar as palhetas que são resfriadas por nitrogênio líquido mantido em um tanque de armazenamento sob a placa (DI SANTO et al., 2012). A máquina, uma vez programada, usa o

log de dados do software para obter o resfriamento, da temperatura ambiente a 5°C a uma taxa de -1°C/min e então até -80°C a -10°C/min, algumas máquinas ainda usam uma terceira etapa onde a temperatura vai de -80°C a -130°C a uma taxa de -25°C/min. Ao completar o congelamento, as palhetas são removidas e armazenadas em nitrogênio líquido a -196°C, levando o processo todo cerca de 40 minutos. Os programas são simples de usar e permitem uma combinação de resfriamento que não requer a intervenção contínua do operador e tem sido utilizada para aumentar a reprodutibilidade da operação de congelamento, mas consiste em um método mais caro, uma vez que há a necessidade do congelador automático que além de ser um equipamento custoso, consome 3 a 5 vezes mais nitrogênio que a técnica rápida (DI SANTO et al., 2012; HAMMADEH et al., 2001c; PAOLI et al., 2014).

O congelamento rápido foi proposto por Sherman em 1963 e não há necessidade do uso de equipamentos. Esta técnica requer o contato direto entre as palhetas e o vapor do nitrogênio líquido, há uma distância de 15-20 cm, por 8 a 30 minutos e imersão no nitrogênio líquido a -196°C, sendo preferível que as palhetas estejam em posição horizontal para minimizar a diferença de calor entre as duas extremidades. O vapor de nitrogênio possui um gradiente térmico contínuo e a temperatura depende da distância da superfície do nitrogênio líquido, da estreiteza e forma do recipiente e da profundidade a que está preenchido e por isso esta técnica tem desvantagens como a baixa reprodutibilidade e a dificuldade de controlar a taxa de resfriamento e a temperatura de congelamento que pode variar de -70°C, -80°C e -99°C (BROTHERTON, 1990; DI SANTO et al., 2012; PAOLI et al., 2014).

Na tentativa de selecionar a melhor técnica de congelamento, estudos têm sido realizados comparando estes dois métodos e os resultados são bastante controversos. Com alguns demonstrando superioridade no método lento (HAMMADEH et al., 2001d; MCLAUGHLIN; FORD; HULL, 1990; STANIC et al., 2000) e outro defendendo o método de vapor (ESTEVES et al., 2003). Houve ainda estudos que mostraram que ambos os métodos são efetivos, não encontrando diferenças entre os mesmos na motilidade, vitalidade e morfologia após o descongelamento (AMESSE et al., 2003; VERHEYEN; PLETINCX; VAN STEIRTEGHEM, 1993). Interessantemente, Hammadeh e colaboradores, recomendaram o uso do congelamento lento em pacientes subférteis uma vez que encontraram menor dano na cromatina e na vitalidade quando usado este método, no entanto, em pacientes férteis não houve diferença entre os métodos (HAMMADEH et al., 2001c).

Na ausência de uma técnica ideal para criopreservar espermatozoides humanos, novos métodos têm sido propostos, como a vitrificação. Este método permite o uso de taxas muito rápidas de congelamento pela imersão direta de amostras em nitrogênio líquido, mostrando-se eficaz, inclusive, sem o uso de crioprotetores permeáveis, como o uso da combinação dos crioprotetores não permeáveis sacarose e albumina sérica humana (HSA) que mostraram proteger efetivamente parâmetros fisiológicos importantes como o acrossoma e a mitocôndria. Durante este o procedimento, a água é resfriada até um estado vítreo através da elevação extrema da viscosidade sem a cristalização intracelular de gelo. Embora seja uma técnica ainda pouco utilizada, estudos

mostram gestações e nascimentos oriundos de espermatozoides vitrificados (ENDO et al., 2012a; ISACHENKO et al., 2017; SANCHEZ et al., 2012).

Diferentes carreadores têm sido sugeridos na vitrificação como: (1) A zona pelúcida vazia para criopreservar espermatozoides individuais (ABDELHAFEZ et al., 2009; YE et al., 2009). (2) A criopreservação direta em micro gotas, pensada para evitar a perda de espermatozoides que ficam aderidos nos carreadores e permitir o congelamento de volumes pequenos. (ABDELHAFEZ et al., 2009). (3) O uso de cryoloop, permite a criopreservação de minúsculos volumes de fluido, entre um décimo e um centésimo de microlitro (ABDELHAFEZ et al., 2009; DESAI; BLACKMON; GOLDFARB, 2004). (4) Uso de palhetas de diferentes tipos, podendo ser mini palhetas originadas das palhetas para criopreservação de embriões cortadas em secções de 2,5 cm, ou ainda as palhetas francesas de 0,25 ml esticadas, conhecidas como *open-pulled straws* (OPS) e, mais recentemente, o uso de palhetas de inseminação de 0,5ml. As palhetas são os carreadores mais seguros para vitrificação, uma vez que permitem o isolamento da amostra e podem ser hermeticamente seladas (ABDELHAFEZ et al., 2009; ISACHENKO et al., 2011, 2017). (5) Outros estudos ainda relatam a vitrificação de espermatozoides com o uso de capilares plásticos, cryotop (uma tira de polipropileno fina anexada a uma alça de plástico e equipada com uma palheta de cobertura) e *Cell Sleeper* (os espermatozoides são colocados em uma bandeja inserida dentro de um criotubo com uma tampa de rosca) (ENDO et al., 2012b; ISACHENKO et al., 2012, 2017). Um estudo realizado em 2004 comparou diferentes carreadores (cryoloops, gotas, OPS e palhetas padrões

de 0,25ml) e não encontrou diferença entre os mesmos em relação a motilidade e viabilidade dos espermatozoides, no entanto o uso de OPS e palhetas padrões que permitem o isolamento dos espermatozoides do nitrogênio líquido são preconizados por serem consideradas técnicas limpas (ISACHENKO et al., 2005).

A maioria dos estudos comparando as técnicas convencionais de criopreservação com a vitrificação demonstram superioridade da última (AIZPURUA et al., 2017; ISACHENKO et al., 2011, 2012; RIVA et al., 2018; SATIRAPOD et al., 2012; VUTYAVANICH; PIROMLERTAMORN; NUNTA, 2010). Outros estudo, no entanto, não encontraram diferença entre os métodos (AGHA-RAHIMI et al., 2014; ISACHENKO et al., 2004; SCHUSTER et al., 2003) e outro ainda mostrou superioridade da técnica convencional sobre a vitrificação (DARVISHNIA et al., 2013).

Pesquisas recentes sugeriram a liofilização dos espermatozoides, removendo o excesso de água, seja por sublimação da porção congelada de gelo, que é realizada a temperaturas inferiores a zero, ou por evaporação da fase líquida por vácuo direto ou secagem ao ar, ou suavizando e liquefazendo o material vítreo deixado após a liofilização. Os mesmos apontaram que após a liofilização o DNA e os cromossomos dos espermatozoides humanos se mantem íntegros, no entanto a motilidade e a integridade da membrana plasmática foram totalmente comprometidas (GIANAROLI et al., 2012; ISACHENKO et al., 2003; KUSAKABE; YANAGIMACHI; KAMIGUCHI, 2008).

Assim como controlar o congelamento, a taxa ótima de descongelamento consiste em outro ponto fundamental para a sobrevivência

do espermatozoide. Estudo de Henry e colaboradores, em 1993, demonstrou que a taxa de descongelamento irá depender da taxa de congelamento utilizada, uma vez que encontraram máxima motilidade, integridade da membrana plasmática e função mitocondrial na taxa de descongelamento a 1°C/min, quando a taxa de congelamento foi de 1°C/min; e, na taxa de descongelamento a 400°C/min quando a taxa de congelamento foi de 10°C/min (HENRY et al., 1993). Esta relação foi confirmada em outro estudo que obteve melhores resultados quando o congelamento rápido foi seguido pelo descongelamento à 37°C e, quando o congelamento lento foi combinado com descongelamento à 22°C (VERHEYEN; PLETINCX; VAN STEIRTEGHEM, 1993). A temperatura de 40°C para o descongelamento se mostrou segura no estudo de Calamera e colaboradores, onde temperaturas de 20°C, 37°C e 40°C foram comparadas. Maior motilidade após o descongelamento foi obtida com 40°C, embora a vitalidade, integridade acrossomal, conteúdo de adenosina trifosfato (ATP) no espermatozoide e integridade do DNA não apresentaram diferenças entre as temperaturas (CALAMERA et al., 2010). Os principais protocolos de descongelamento utilizados são: (1) as palhetas são mantidas a temperatura ambiente por 10 minutos e então incubadas à 37°C por 10 minutos; (2) as palhetas são colocadas em banho-maria à 37°C por 10 minutos e (3) as palhetas são descongeladas à temperatura ambiente (22°C) por 15 minutos (PAOLI et al., 2014).

3.6 Criopreservação do Sêmen após Processamento

Acridita-se que o plasma seminal desempenha um papel protetor durante o congelamento dos espermatozoides, uma vez que possui um sistema antioxidante que previne a formação de ROS durante a criopreservação, além da presença dos ácidos graxos poli-insaturados. Estes aumentam a fluidez da membrana plasmática, aprimorando a resistência a baixas temperaturas das lipoproteínas que mantem a mesma, e aumentam a viabilidade e crioestabilidade das células e membranas dos espermatozoides, provavelmente, inclusive a estabilização das membranas mitocondriais e das proteínas de ligação à heparina que previnem o choque térmico e a peroxidação (ISACHENKO et al., 2017; PALOMAR RIOS; MOLINA BOTELLA, 2017; SAID; GAGLANI; AGARWAL, 2010).

O protocolo mais comumente utilizado, fixa a proporção de sêmen e crioprotetor em 1:1, ou seja, a concentração de plasma seminal também fixada em 50% e diferentes estudos foram realizados com o intuito de verificar a importância do plasma seminal na criopreservação (BEN et al., 1997). Kolon e colaboradores concluíram que cada plasma seminal individual possui qualidades crioprotetoras variáveis. Quando diferentes concentrações de plasma seminal (0%, 50% e 100%) foram utilizadas para o congelamento de sêmen de doadores e de pacientes inférteis, maior motilidade pós descongelamento foi encontrada quando 50 ou 100% do plasma seminal foi usado em doadores. No grupo de pacientes inférteis, 70% apresentaram maior preservação da motilidade com 50% de plasma seminal e em 30% dos pacientes quando o plasma seminal a 100% foi utilizado, sendo que quando a amostra foi congelada na ausência de plasma seminal a motilidade foi menor

que com qualquer concentração de plasma seminal (KOLON; PHILIPS; BUCH, 1992). Um outro estudo realizado em 1997 também concluiu que a presença de plasma seminal seria importante para recuperação de espermatozoides móveis após a criopreservação, este utilizou diferentes concentrações de plasma seminal tanto do próprio paciente, quanto de doadores na criopreservação de espermatozoides de doadores e pacientes. No grupo de doadores os melhores resultados foram encontrados na concentração de 50% e 75% do plasma seminal próprio, não havendo diferença ao usar 50% de plasma seminal próprio ou doado, já no grupo de pacientes, a preservação da motilidade foi maior ao usar 75% de plasma seminal de doador e ao usar a concentração de 50%, os resultados foram melhores com o uso de plasma seminal de doador quando comparado ao do próprio paciente (BEN et al., 1997).

Técnicas de processamento seminal como gradiente de densidade, *swim up* e um simples lavado com centrifugação podem ser usadas antes do congelamento do sêmen, sendo amplamente utilizadas em bancos de sêmen comerciais. Alguns estudos têm reportado a possibilidade de melhorar a eficiência da criopreservação ao concentrar e selecionar a subpopulação de espermatozoides de maior qualidade, ou seja, aqueles móveis, funcionalmente e morfológicamente normais antes do congelamento, uma vez que os mesmos teriam maior capacidade de resistir aos danos estruturais e bioquímicos induzidos durante a criopreservação, além disso, o fato de remover os leucócitos, potencialmente danosos, e espermatozoides danificados, poderia também melhorar a sobrevivência após o descongelamento. Os estudos que demonstram a segurança e eficácia destas metodologias, no entanto, são

escassos e contraditórios (OEHNINGER et al., 2000; PALOMAR RIOS; MOLINA BOTELLA, 2017; PÉREZ-SÁNCHEZ et al., 1994; SAID; GAGLANI; AGARWAL, 2010; SHARMA et al., 2015).

O lavado com centrifugação do sêmen, consiste em um preparo de fácil execução e baixo custo, com centrifugação da amostra seminal, podendo ou não utilizar meio de cultura tamponado e suplementado (AZAMBUJA, 2017). Nesta, diferente das demais técnicas, não há seleção de espermatozoides com melhor qualidade, apenas a separação do plasma seminal e concentração da amostra antes da criopreservação. Estudos foram realizados comparando o congelamento após lavado e o método tradicional, como o de Mack e Zaneveld, em 1987, que não encontraram diferenças significativas nos parâmetros de motilidade, viabilidade, integridade de acrossoma e atividade enzimática acrossomal ao congelar o sêmen com plasma seminal ou após o lavado, sem plasma seminal (MACK; ZANEVELD, 1987). Outras duas publicações também não encontraram superioridade nas amostras congeladas pelo método tradicional (BANDULARATNE; BONGSO, 2002; CROSS; HANKS, 1991). Barthelemy e colaboradores preconizam o uso do lavado antes da criopreservação, principalmente para uso em Inseminação Intrauterina (IIU), pois seus resultados, utilizando avaliação ultra estrutural de espermatozoides com uso de microscopia eletrônica, demonstraram que os espermatozoides congelados sem plasma seminal, após lavado, apresentaram danos menos importantes na membrana plasmática ao adicionar o crioprotetor, além de melhor preservação acrossomal e taxa de sobrevivência espermática após o descongelamento (BARTHELEMY et al., 1990). Um estudo de 1999, no

entanto, embora não tenha comparado com a técnica de congelamento tradicional, separou a amostra em três frações, centrifugou as mesmas para separação do plasma seminal e os pellets foram suplementados, o primeiro com o plasma seminal, o segundo com meio basal e o terceiro com meio basal suplementado com albumina sérica bovina (BSA). A recuperação de espermatozoides móveis e viáveis foi significativamente maior nas amostras suplementadas com o plasma seminal. Neste estudo, o efeito prejudicial da centrifugação, tanto na motilidade progressiva quanto na motilidade total, foi demonstrado, levantando a questão que a técnica de centrifugação pode causar dano mecânico direto a membrana plasmática do espermatozoide (GRIZARD et al., 1999). Corroborando com a importância do plasma seminal na criopreservação, Fabozzi e colaboradores ao compararem o congelamento tradicional com o método de lavado pré congelamento em uma população de pacientes normozoospermicos, demonstraram uma maior eficiência no primeiro protocolo em termos de viabilidade após o descongelamento, todavia, não encontraram diferença na motilidade entre os métodos (FABOZZI et al., 2016).

O *swim-up* foi a primeira técnica de separação seminal a ser utilizada, sendo de fácil execução e baixo custo, seu princípio consiste na seleção de espermatozoides com motilidade progressiva por migração contra a gravidade. Há duas formas principais de ser executada, a maneira clássica, onde a amostra seminal é colocada em um tubo cônico de 15ml em bloco aquecido inclinado em 45 graus, sobre ela cuidadosamente é colocado meio de cultura tamponado e suplementado, assim o tubo deve permanecer em incubação por 60 minutos e a forma de *pellet* ou sedimento, onde primeiro a amostra seminal

passará por uma lavagem/ centrifugação prévia em meio de cultura tamponado e suplementado, o pellet deve ser ressuspensão, adicionado 0,5ml de meio de cultura tamponado e suplementado, e o tubo então inclinado a 45 graus em bloco aquecido e incubado por 60 minutos. Independente da forma realizada, após a incubação, 0,5ml do sobrenadante é retirado e acondicionado em outro tubo para análise e utilização (AZAMBUJA, 2017). Estudos têm defendido o uso do *swim-up* como método de seleção de espermatozoides antes da criopreservação, encontrando uma maior taxa de recuperação de espermatozoides móveis e com formas normais após o descongelamento, quando comparado ao método convencional de criopreservação (PÉREZ-SÁNCHEZ et al., 1994). Esteves e colaboradores, em 2000, encontraram melhores parâmetros de velocidade do espermatozoide, maior integridade de acrossoma e maior porcentagem de espermatozoides com acrossoma íntegro capazes de se submeter a reação acrossômica em resposta ao ionóforo de cálcio nas amostras congeladas após *swim-up* quando comparadas ao método convencional (ESTEVES et al., 2000). Um estudo de 2014 comparou o uso de *swim-up* antes e após o congelamento, verificando que ao realizar o processamento antes da técnica de congelamento houve maior porcentagem de motilidade progressiva, melhores parâmetros de velocidade e menor porcentagem de espermatozoides apoptóticos e necróticos, suportando os dados de um estudo de Spanò, que mostrou que a integridade nuclear tanto dos espermatozoides frescos, quanto criopreservados, selecionados por *swim-up* foi maior do que nos espermatozoides não selecionados (PETYIM et al., 2014; SPANÒ et al., 1999). Embora não tenha comparado com outro método de congelamento, Oberoi e colaboradores realizaram a seleção espermática

por *swim up* antes e após a criopreservação de espermatozoides e compararam a motilidade 20 e 40 minutos após o descongelamento. A motilidade total, 20 minutos após o descongelamento foi de 46,4%, já após 40 minutos aumentou para 74,5% do valor de pré-congelamento, demonstrando que o congelamento com o processamento prévio por *swim up* gera ótimas taxas de recuperação espermática (OBEROI; KUMAR; TALWAR, 2014).

Outros estudos, entretanto, detectaram piores taxas de recuperação de espermatozoides móveis e menor porcentagem de espermatozoides vivos com o uso de *swim-up* antes da criopreservação, sendo os resultados ainda piores em homens com parâmetros seminais alterados. Moubasher e colaboradores identificaram também que o processamento antes da criopreservação provocou maior dano no DNA do espermatozoide quando comparado a criopreservação convencional, este dano foi melhorado ao suplementar a amostra com catalase. Os autores defendem que o processo de centrifugação liberaria ROS e a ausência do plasma seminal, que é fonte de antioxidantes, na criopreservação são os responsáveis pelo maior dano aos espermatozoides (MOUBASHER et al., 2013; PALOMAR RIOS et al., 2018; SARITHA; BONGSO, 2001).

A técnica de gradiente descontínuo de densidade tem como princípio a seleção de espermatozoides através da passagem da amostra seminal por duas camadas de densidades distintas, sendo a inferior de maior densidade, variando de 80% a 95%, e a superior de menor densidade, variando de 40% a 50%. Essas densidades são definidas a partir da concentração do meio, o qual é composto por partículas de sílica recobertos por polivinilpirrolidona e a

passagem pelas mesmas permite uma capacitação espermática e seleção dos espermatozoides com melhor motilidade e morfologia. Para a execução da técnica, normalmente, são transferidos para um tubo cônico de 15ml, 1,0ml do gradiente com maior densidade (camada inferior), sobre ela, cuidadosamente 1,0ml do gradiente de menor densidade (camada superior) e por fim, 1,0 a 2,0ml da amostra seminal acima das duas camadas, após centrifugação, o sobrenadante é removido e no *pellet* adiciona-se meio de cultura tamponado e suplementado para uma nova centrifugação. O sobrenadante deve ser novamente removido e o pellet resuspendido em 0,5ml de meio para análise e utilização (AZAMBUJA, 2017). Kobayashi e colaboradores, em 1991 ao utilizarem o gradiente de densidade de camada única (80%) antes do congelamento, verificaram uma alta taxa de sobrevivência de $74 \pm 7.7\%$ e a motilidade após o descongelamento maior do que a do sêmen original ($39 \pm 15\%$ versus $17 \pm 11\%$), além de concluírem que a realização do lavado após o descongelamento, para a remoção do crioprotetor, foi efetivo na manutenção da motilidade após o descongelamento (KOBAYASHI et al., 1991). Um método amplamente utilizado por bancos de sêmen comerciais é denominado “*IUI-ready*” que utiliza o gradiente de densidade como processamento e um crioprotetor baseado em glicerol e sacarose, pelo fato de não usar xenoproteínas para o congelamento, a amostra pode ser inseminada diretamente na cavidade uterina após o descongelamento (MORTIMER, 2004; OEHNINGER et al., 2000). Larson et al. (1997) foram os primeiros a reportar esta técnica, e concluíram que este método aumentou significativamente a porcentagem de espermatozoides móveis morfologicamente normais quando comparado ao método tradicional de congelamento usando amostras de

doadores (LARSON et al., 1997). Em estudo clínico de Wolf *et al.* (2001) a fecundidade das amostras de doadores *IUI-ready* foi equivalente ao método convencional de criopreservação de espermatozoides, uma vez que na análise retrospectiva a taxa de gestação por ciclo de inseminação intrauterina foi de 11,3% quando usadas amostras *IUI-ready* versus 13,9% no congelamento convencional, já na análise prospectiva, a taxa de gestação foi 36% versus 19,6% respectivamente, avalizando, portanto, o uso deste método de criopreservação em centros que utilizam inseminação intrauterina com sêmen de doador e permitindo que bancos de sêmen comerciais pudessem utilizar esta técnica (WOLF et al., 2001). Outro estudo, também realizado em 2001, comparou o congelamento convencional, *IUI-ready* e *IUI-wash* (congelamento convencional com lavado após o descongelamento) em amostras de pacientes e doadores. A superioridade da técnica *IUI-ready* em amostras de pacientes, devido a maior concentração de espermatozoides móveis, motilidade progressiva e taxa de sobrevivência comparado as demais técnicas foi demonstrada. No entanto, a porcentagem de espermatozoides rápidos não foi diferente entre as técnicas *IUI-ready* e *IUI-wash*. No grupo de doadores, não houve diferença na concentração de espermatozoides móveis, motilidade progressiva e taxa de sobrevivência entre as técnicas e a porcentagem de espermatozoides rápidos foi significativamente maior somente na *IUI-wash* (MORSHEDI et al., 2001).

Há ainda o relato de maior taxa de recuperação de espermatozoides móveis, maior potencial da membrana mitocondrial, menor dano no DNA, menor porcentagem de espermatozoides vivos com externalização da

fosfatidilserina (marcador de apoptose) e maior retenção de espermatozoides móveis após 24 horas quando usado gradiente de densidade antes do congelamento, sendo inclusive apoiado seu uso em amostras seminais de homens infectados com o vírus HIV-1 (BRUGNON et al., 2013; FRAINAIS et al., 2010; SHARMA; AGARWAL, 1996). Outro ponto a favor do uso do processamento antes da técnica de congelamento foi analisado em um estudo de 2012, o qual correlacionou positivamente a recuperação de espermatozoides móveis após o descongelamento com utilização da enzima antioxidante SOD na fração 90% do gradiente de densidade (BUFFONE et al., 2012) A publicação de Donnelly e colaboradores, em 2001, demonstrou que em pacientes férteis (grupo controle), não houve diferença no dano ao DNA entre amostras frescas e criopreservadas, tanto pelo método convencional quanto com o uso do gradiente de densidade antes do congelamento, mostrando que os espermatozoides destes pacientes foram mais resistentes ao congelamento e que o DNA não foi afetado pelo processo de criopreservação. No entanto, no grupo de homens inférteis houve uma redução significativa na integridade da cromatina após o congelamento convencional (24%), alcançando uma redução de 40% nas amostras processadas por gradiente de densidade antes do congelamento, podendo, portanto, no caso de homens inférteis, a habilidade dos espermatozoides resistirem ao congelamento, ser devido há alguns constituintes protetores do plasma seminal como SOD e CAT (DONNELLY et al., 2001). Em pacientes com diferentes tipos de câncer, o gradiente de densidade antes da criopreservação também não gerou bons resultados, provocando menores taxas de sobrevivência (SAID et al., 2009).

A técnica de preparo seminal ideal deve remover efetiva e rapidamente o plasma seminal, pois embora ele proteja os espermatozoides de condições como o estresse oxidativo, ele é dotado de espermatozoides senescentes, leucócitos, células epiteliais, debris e contaminação microbiana, além disto, o preparo deve ser custo efetivo, permitir o processamento de grande volume do ejaculado, para maximizar o número de espermatozoides disponíveis e também deve minimizar o risco de geração de ROS, uma vez que em excesso podem afetar negativamente a integridade do DNA e a função espermática *in vitro* (ALLAMANENI et al., 2005). Raros estudos foram realizados na tentativa de apurar qual o processamento ideal a ser realizado antes da criopreservação de espermatozoides, e não há consenso na escolha do melhor método. Donnelly e colaboradores ao comparar o congelamento pelo método tradicional com o uso do gradiente de densidade e o *swim-up* antes da criopreservação, verificaram que em ambos os métodos de processamento a porcentagem de espermatozoides com motilidade progressiva, após o congelamento das amostras foi maior que nas amostras congeladas pelo método tradicional, não apresentando diferença entre os métodos. No entanto, o dano no DNA foi significativamente maior quando usadas estas duas técnicas de seleção, havendo uma diminuição na integridade do DNA de aproximadamente 40% com o uso dos processamentos, frente a 20% de queda provocada pelo congelamento tradicional. Interessantemente, esta queda na integridade do DNA foi melhorada quando o plasma seminal foi adicionado a amostra processada, apresentando então dano ao DNA similar as amostras criopreservadas pelo método tradicional, com a adição do plasma seminal, a motilidade progressiva após o descongelamento também foi melhorada,

respaldando, portanto, o papel do plasma seminal e dos antioxidantes presentes no mesmo, na proteção dos espermatozoides contra o dano ao DNA durante o processo de criopreservação (DONNELLY; MCCLURE; LEWIS, 2001). Outros estudos, todavia, encontraram superioridade na técnica de *swim-up* ao comparar com o gradiente de densidade antes da criopreservação com maior taxa de recuperação de espermatozoides, menor produção de óxido nítrico e maior vitalidade, embora este último parâmetro no estudo de Counsel e colaboradores, tenha sido verificada a superioridade somente em amostra de doadores, pois em amostras oligozoospermicas não houve diferença entre os processamentos (CHAN et al., 2004; COUNSEL; BELLINGE; BURTON, 2004). Divergentemente, estudos apoiam o uso do gradiente de densidade como forma de seleção antes da criopreservação de espermatozoides. Yogev e colaboradores constaram a superioridade do gradiente de densidade quando comparado ao lavado/centrifugação em relação a concentração de espermatozoides progressivamente móveis, motilidade, grau de motilidade e morfologia, mas a respeito da capacidade do espermatozoide se ligar a zona pelúcida (teste hemizona), não houve diferença entre os métodos, não sendo afetada pelo tratamento, demonstrando que o congelamento com uso destes processamentos não apresenta efeitos adversos no potencial de fertilização dos espermatozoides (YOGEV et al., 1999). Ao comparar o gradiente de densidade com o *swim-up*, em 2005, um estudo sugeriu que o gradiente de densidade (com o uso do PureSperm) está associado a uma melhor taxa de recuperação, contagem total de espermatozoides e contagem de espermatozoides móveis quatro horas após o descongelamento. A mediana da contagem total de espermatozoides móveis, utilizando o gradiente de

densidade foi 1.8 vezes maior do que a obtida usando *swim-up* e a longevidade após as quatro horas também melhorou em aproximadamente 1.5 vezes. O estudo também mostrou que a recuperação de espermatozoides após a criopreservação foi melhor com a técnica de gradiente de densidade (69% vs. 50%) (ALLAMANENI et al., 2005).

Outras técnicas de seleção de espermatozoides também foram empregadas antes da criopreservação com resultados superiores ao método convencional, como o emprego de colunas de anexina, uma técnica denominada MACS (do inglês *Magnetic activated cell sorting*). A fosfatidilserina consiste em um fosfolípido que está presente no folheto interno da membrana plasmática e se move para a superfície externa quando a membrana está danificada, sendo um marcador para a apoptose. Assim, a ligação da anexina-V, que tem alta afinidade com a fosfatidilserina e não pode penetrar a membrana espermática, na superfície de uma célula significa que a integridade da membrana foi violada e que a fosfatidilserina está externalizada. A técnica utiliza microesferas super paramagnéticas coloidais conjugadas com anexina-V para separação celular. As células são separadas à medida que se movem através de um campo magnético, que aprisiona as células marcadas magneticamente e permite que as células não magnéticas passem. Os estudos que utilizaram esta técnica antes da criopreservação verificaram maior motilidade, taxa de sobrevivência e integridade da membrana mitocondrial (GRUNEWALD et al., 2006; SAID et al., 2005). O método de filtração SpermPrepTMII também mostrou superioridade em relação ao método convencional (ZAVOS et al., 1991). Já os métodos potencial Zeta e eletroforese

não são aconselhados antes da criopreservação, pois a taxa de recuperação de espermatozoides é muito baixa (SHARMA et al., 2015).

3.7 Efeitos da Criopreservação sobre a Qualidade Espermática

Durante o processo de resfriamento, congelamento e descongelamento, os espermatozoides são submetidos a uma série de mudanças em seu ambiente, sendo amplamente reportado que vários processos prejudiciais podem ocorrer durante estas etapas, como o choque térmico, com a formação de cristais de gelo intra e extracelulares, desidratação celular e choque osmótico. Os criodanos nos espermatozoides podem ser observados em diferentes níveis celulares como nos parâmetros de motilidade, viabilidade e morfologia, danos estruturais ou danos moleculares. Esta queda na qualidade espermática é especialmente significativa em homens que apresentam os parâmetros seminais alterados, uma vez que estas amostras são mais suscetíveis aos danos do congelamento e a capacidade de sobreviver ao congelamento apresenta uma grande variabilidade (DI SANTO et al., 2012; NIJS; OMBELET, 2001; OEHNINGER et al., 2000).

A criopreservação causa um declínio significativo na motilidade em associação a queda na velocidade, na viabilidade, e causa relevantes alterações morfológicas, estudos, reportam uma redução de 50% da motilidade na criopreservação. Este declínio pode ser explicado devido a mudanças físicas na cauda, no transporte ativo e na permeabilidade da membrana

plasmática nesta região, sendo também possível que danos nos elementos do axonema possam contribuir para a motilidade diminuída. Sabe-se que a criopreservação pode induzir ao enrolamento irreversível da cauda, que usualmente ocorre após mudanças osmóticas, dificultando o movimento de propulsão da mesma (OEHNINGER et al., 2000; OZKAVUKCU et al., 2008; SHARMA et al., 2015; WATSON, 1995). Estas alterações osmóticas podem causar danos à estrutura da membrana lipídica, levando a mudanças de tensão nas proteínas do canal da água e vazamento iônico nas membranas plasmáticas e resultando em mudanças morfológicas, sendo as cabeça soltas e os defeitos de cauda, como as caudas enroladas e em “*looping*”, frequentemente observadas após o congelamento dos espermatozoides (HEZAVEHEI et al., 2018).

Várias organelas do espermatozoide estão envolvidas por membranas, e é sabido que as mesmas são particularmente vulneráveis durante a criopreservação, incluindo as membranas plasmática, mitocondrial e acrossomal. A membrana plasmática do espermatozoide apresenta uma composição lipídica altamente especializada com alto teor de ácidos graxos poli-insaturados, esteróis, fosfatidilcolinas e esfingomielinas, contém ainda um glicocálix de cadeias de oligossacarídeos ligado as proteínas integrais da membrana plasmática (glicoproteínas) ou lipídios (glicolipídios). Apesar da alta concentração de colesterol e ácidos graxos poli-insaturados proporcionarem maior fluidez a membrana a baixas temperaturas, o processo de resfriamento causa a transição de fase dos lipídeos da membrana e prejudica a função das proteínas de membrana. A criopreservação ainda pode modificar a composição

dos carboidratos do glicocálix, prejudicando a função das proteínas de membrana que são responsáveis pelo transporte de íons e metabolismo e afetam a capacidade de fertilização, além das funções do glicocálix como a proteção imunológica do trato genital feminino, a reação acrossômica e a interação inicial dos gametas (DI SANTO et al., 2012; NIJS; OMBELET, 2001; PAOLI et al., 2014). Estudos com espectrometria de massa revelaram que a criopreservação altera a composição lipídica dos espermatozoides, com diminuição das fosfatidilcolinas e esfingomielinas e formação de lisofosfatidilcolinas e ceramida e que os ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs), os ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 (ω 3 PUFA) e ácido docosahexaenoico (DHA) são diretamente correlacionados com a motilidade e a viabilidade após o descongelamento (MARTÍNEZ-SOTO; LANDERAS; GADEA, 2013; SCHILLER et al., 2000).

A estrutura do acrossoma é vulnerável aos efeitos físicos e químicos dos processos de congelamento e descongelamento, sendo uma das organelas mais afetadas no processo de criopreservação. A desintegração acrossômica e a remoção parcial da membrana acrossomal externa com depleção de conteúdo acrossômico são alterações comuns atribuídas a eventos físicos do congelamento. Um aumento no enrugamento do plasmalema e no inchaço sub-acrossomal, bem como o aparecimento de vesículas também foram visualizados (HEZAVEHEI et al., 2018). Estudos com redução em acrossomas intactos normais e na atividade da acrosina total, bem como na responsividade do espermatozoide a progesterona em termos de aumento de $[Ca^{2+}]$, despolarização da membrana plasmática e indução da reação acrossômica

após a criopreservação têm sido publicados (CROSS; HANKS, 1991; GÓMEZ-TORRES et al., 2017; HAMMADEH et al., 2001a; LIU et al., 2018; MACK; ZANEVELD, 1987; MCLAUGHLIN, 1993; NIJS; OMBELET, 2001; ROSSATO et al., 2000; WANG et al., 2014).

Este processo também induz mudanças na capacitação dos espermatozoides, um evento conhecido como criocapacitação **(Erro! Fonte de referência não encontrada.** e algumas mudanças semelhantes são observadas entre esta e a capacitação *in vitro* como a reorganização da membrana plasmática, aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} e a ocorrência da fosforilação da proteína tirosina. Embora, as duas primeiras alterações pareçam semelhantes, há uma diferença no padrão de fosforilação da proteína tirosina e, portanto, não deve ser considerada como uma capacitação verdadeira. O mecanismo molecular da fosforilação de tirosina durante a criopreservação não é completamente compreendido. A criopreservação resulta em flutuação de temperatura e desidratação celular que induz a reordenação de componentes lipídicos da membrana, perda de ácidos graxos poli-insaturados e colesterol. Esta reordenação da membrana aumenta a permeabilidade da superfície do espermatozoide à água, Ca^{2+} e crioprotetores, o influxo de Ca^{2+} ativa a adenilil ciclase com aumento da geração de AMPc e 1,2-diacilglicerol (DAG), resultando na capacitação do espermatozoide através da fosforilação da tirosina. Estas mudanças tipo capacitação precoce, durante o congelamento e descongelamento de espermatozoides, os torna incapazes de fertilizar, mesmo que sejam viáveis. Estudos indicam que a fosforilação da tirosina induzida pela criopreservação

reduz significativamente a capacidade de ligação dos espermatozoides à zona pelúcida em comparação com os espermatozoides capacitados *in vitro*, podendo ser uma das causas da baixa fertilidade dos espermatozoides criopreservados (GÓMEZ-TORRES et al., 2017; NARESH; ATREJA, 2015).

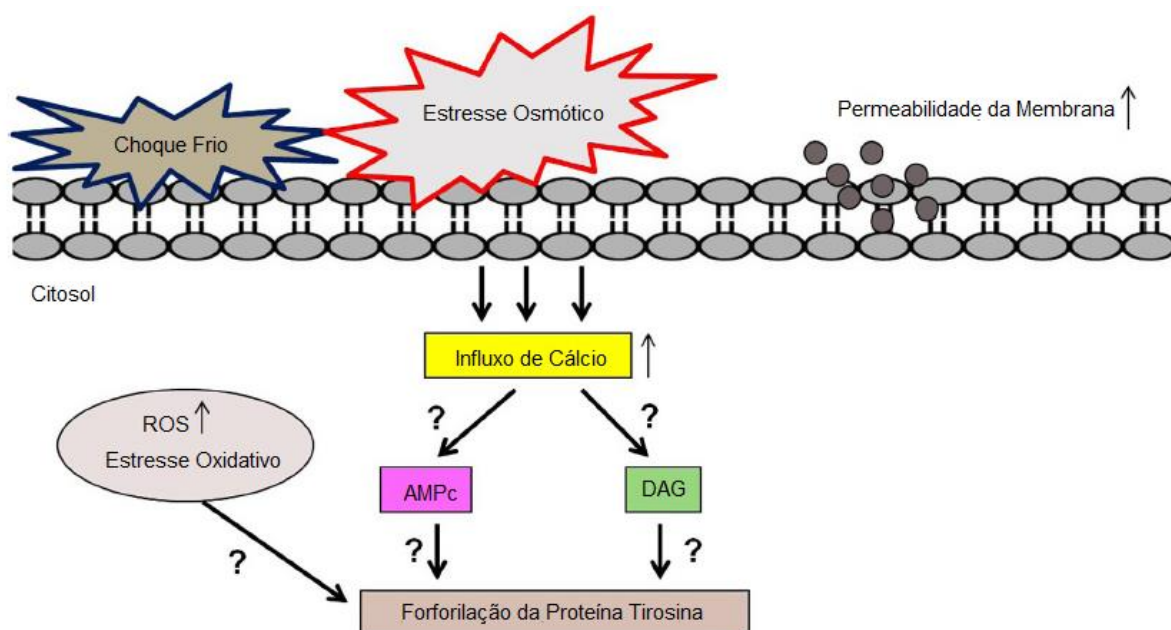


Figura 3. Mudanças tipo capacitação na criopreservação. O resfriamento-congelamento/descongelamento gera choque frio e esforço osmótico na membrana plasmática do espermatozoide que resulta em danos à membrana e aumento da permeabilidade da membrana. A permeabilidade da membrana alterada causa influxo de cálcio que eleva a concentração intracelular de AMPc e DAG que, em última instância, leva à fosforilação da proteína tirosina. A geração de choque frio durante a criopreservação está associada a uma grande quantidade de ROS que também conduzem ao estresse oxidativo e fosforilação da tirosina. ?: via desconhecida (adaptado de Naresh; Atreja, 2015).

A maior fonte de energia do espermatozoide é fornecida pelas moléculas de ATP sintetizadas ou pela glicólise no citoplasma ou através da fosforilação oxidativa na mitocôndria. O ATP gerado por esta, via cadeia de transporte de elétron, na membrana mitocondrial interna é transferido para os microtúbulos para coordenar a motilidade. Estudos têm demonstrado que o processo de criopreservação não só mantém menos espermatozoides com mitocôndrias funcionais, mas também a atividade dentro das mitocôndrias é igualmente danificada, podendo este dano explicar a redução na motilidade (DI SANTO et al., 2012; LI et al., 2010; NASHTAEI et al., 2017; NIJS; OMBELET, 2001; O'CONNELL; MCCLURE; LEWIS, 2002; PAASCH et al., 2004a; PEDERSEN; LEBECH, 1971; WANG et al., 2014; WATSON, 1995). Henry e colaboradores, em 1993, demonstraram que a integridade da membrana plasmática, a motilidade e a função mitocondrial são similarmente afetadas pela criopreservação (HENRY et al., 1993).

A alteração na fluidez da membrana mitocondrial, que ocorre durante a criopreservação, pode também levar a uma alteração no potencial da membrana mitocondrial e a liberação de ROS. Estudos têm reportado que a produção de ROS tanto por espermatozoides quanto por leucócitos seminais aumenta no resfriamento à 4°C e também durante o processo de congelamento e descongelamento. Em adição, a criopreservação provoca a diminuição da atividade antioxidante do espermatozoide, com estudos demonstrando a diminuição da glutatona reduzida e da superóxido dismutase, tornando-os mais suscetíveis aos danos induzidos por ROS. Este desequilíbrio entre a presença de ROS e a atividade antioxidante consiste na principal causa de criodanos nos

espermatozoides (GADEA et al., 2011; LI et al., 2010; NAJAFI et al., 2016; NASHTAEI et al., 2017; WANG et al., 1997). As espécies reativas de oxigênio têm a capacidade de iniciar uma cascata de peroxidação lipídica, a qual possui efeitos profundos na organização e função das membranas biológicas e consiste em uma das primeiras manifestações dos danos induzidos por ROS aos espermatozoides, o qual é mediado pelo ataque oxidativo de grupos metileno bis-alílico de ácidos graxos poli-insaturados ligados a fosfolipídios, levando a peroxidação lipídica. A membrana plasmática do espermatozoide possui grandes quantidades de ácidos graxos insaturados, esta característica, juntamente com a limitada distribuição e conteúdo das enzimas defensivas citoplasmáticas, explica a susceptibilidade particular dessa célula ao estresse oxidativo. A peroxidação lipídica modifica a permeabilidade e a fluidez da membrana ocasionando a perda da motilidade, o vazamento de enzimas intracelulares, dano ao DNA do espermatozoide e dificuldade na penetração no oócito e na fusão do espermatozoide e oócito e sabe-se que a peroxidação da membrana do espermatozoide aumenta durante o congelamento e descongelamento (AITKEN; FISHER, 1994; ALVAREZ; STOREY, 1992; AMIDI et al., 2016; OEHNINGER et al., 2000).

O efeito da criopreservação na integridade do DNA do espermatozoide ainda permanece controverso e as diferentes conclusões sobre esta relação pode ser devido a diferente crioresistência, diferentes protocolos de congelamento e diferentes protocolos de avaliação da integridade do DNA (DI SANTO et al., 2012; PALOMAR RIOS; MOLINA BOTELLA, 2017). Alguns estudos têm demonstrado que a criopreservação provoca aumento na

fragmentação do DNA do espermatozoide, com dano ainda maior em amostras teratozoospermicas, além disso, o DNA do espermatozoide descongelado tende a degradar mais rápido, uma vez que a taxa dinâmica de fragmentação do DNA, após o descongelamento foi maior comparada com amostras frescas (DE PAULA et al., 2006; GANDINI et al., 2006; GOSÁLVEZ et al., 2009, 2011; KALTHUR et al., 2008; THOMSON et al., 2009a; ZRIBI et al., 2010). Alguns autores ainda reportaram aumento na vacuolização nuclear e maior comprometimento da cromatina após o congelamento e descongelamento, principalmente em amostras com os parâmetros seminais alterados (BOITRELLE et al., 2012; FORTUNATO; LEO; LIGUORI, 2013; HAMMADEH et al., 1999; ROYERE et al., 1991). Interessantemente, outros estudos verificaram ainda que a criopreservação reduz os transcritos de RNAs (ácido ribonucleico) mensageiros de genes essenciais para a fertilização e gestação e afeta as regiões do genoma relacionadas as síndromes de Prader Willi e Angelman. A metilação do DNA, no entanto, parece não ser afetada pela criopreservação (KLÄVER et al., 2012; VALCARCE et al., 2013a, 2013b).

Alguns estudos avaliaram os mecanismos envolvidos na etiologia do dano ao DNA induzido pela criopreservação (**Figura 4.** . A apoptose é apontada, por alguns autores, como causa principal de dano ao DNA, enquanto outros acreditam que o estresse oxidativo seja a principal causa. O aumento em eventos apoptóticos como a externalização da fosfatidilserina e a ativação das caspases 1, 3, 8 e 9, as quais são conhecidas por seu papel na cascata celular apoptótica e eventual morte celular foram relatados (GRUNEWALD et al., 2005; PAASCH et al., 2004b; SAID; GAGLANI; AGARWAL, 2010;

SCHUFFNER; MORSHEDI; OEHNINGER, 2001; SION et al., 2004; WÜNDRICH et al., 2006). Duru e colaboradores, em 2001, demonstraram em pacientes férteis e inférteis, aumento na porcentagem de espermatozoides com translocação da fosfatidilserina na membrana após a criopreservação, não houve, no entanto, associação com aumento na fragmentação do DNA (DURU et al., 2001). O estudo de Paasch *et al.*, (2004) relatou ativação das caspases 3, 8 e 9, além do prejuízo no potencial da membrana mitocondrial após a criopreservação, sem qualquer dano a integridade do DNA, demonstrando que os efeitos prejudiciais da criopreservação levam a apoptose do espermatozoide (PAASCH et al., 2004a). Amor e colaboradores também encontraram aumento da caspase 3 após a criopreservação tanto nas amostras de pacientes férteis quanto de sub-férteis, neste estudo, no entanto, a fragmentação do DNA em ambas as populações, aumentou após a criopreservação (AMOR et al., 2018).

No entanto, estudos mais recentes sugerem que a fragmentação do DNA pode estar associada ao aumento do estresse oxidativo induzido pela criopreservação ao invés da ativação de caspases e apoptose. Thomson e colaboradores compararam a porcentagem de espermatozoides com DNA fragmentado, a porcentagem de 8-hidroxi-2'desoxiguanosina (8OHdG) e a porcentagem de caspases positivas em amostras de sêmen de pacientes inférteis. Houve um aumento na porcentagem de fragmentação do DNA, dano oxidativo e ativação das caspase após criopreservação. No sêmen fresco, houve correlação entre as células caspase positivas e a fragmentação do DNA e entre 8OHdG e a fragmentação do DNA devido à natureza simultânea das duas vias unificadas pela produção de ROS por espermatozoides anormais.

Em contraste, houve uma correlação negativa entre as células caspase positivas e a fragmentação do DNA após o descongelamento, sugerindo que a criopreservação poderia induzir a fragmentação do DNA independentemente da ativação das caspases e que este processo provavelmente ocorre em células não apoptóticas (THOMSON et al., 2009b). Esta hipótese foi contestada Zribi e colaboradores que não encontraram relação entre a fragmentação do DNA e a oxidação do DNA. Eles sugeriram que a criopreservação induz a fragmentação do DNA do espermatozoide através de outras vias como defeitos em enzimas reparadoras de DNA ou na amplificação de defeitos já presentes em células espermáticas, que poderia ativar os mecanismos apoptóticos, embora o estudo não tenha analisado marcadores de apoptose (ZRIBI et al., 2010).

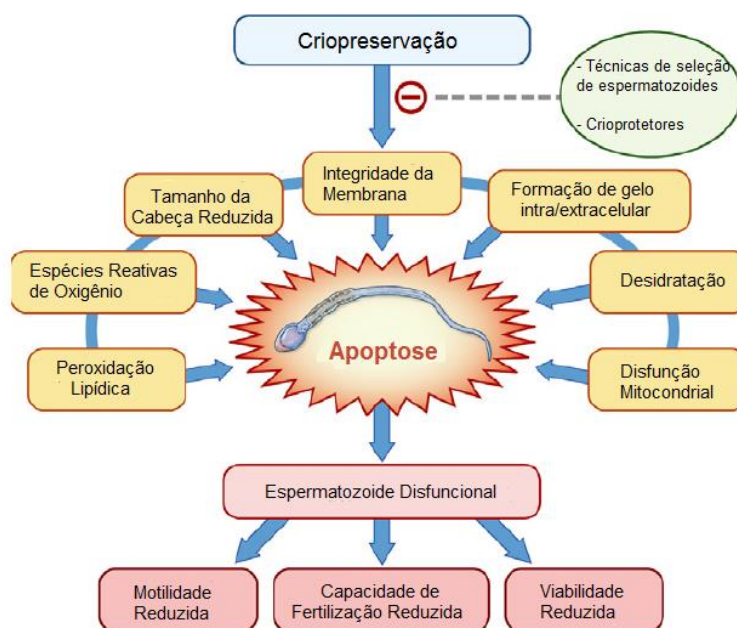


Figura 4. Efeitos prejudiciais da criopreservação na integridade do espermatozoide e eventos associados que levam à apoptose e ao declínio na função espermática. O uso apropriado de

técnicas de seleção de espermatozoides e crioprotetores podem minimizar esses efeitos prejudiciais (adaptado de Said; Gaglani; Agarwal, 2010).

Recentemente estudos com análise proteômica analisaram os efeitos da criopreservação nas proteínas espermáticas. Em 2006 a diminuição em 55% da proteína de ligação da membrana P34H após a criopreservação foi demonstrada, esta proteína tem papel chave na ligação do espermatozoide a zona pelúcida do oócito e, portanto, sua diminuição em espermatozoides criopreservados pode estar correlacionada com a perda da capacidade de fertilização (DESROSIERS et al., 2006). Wang e colaboradores, em 2014 encontraram 30 proteínas alteradas após o processo de criopreservação e aumento na fosforilação da proteína tirosina. Das 30 proteínas, 27 foram escolhidas para identificação, onde após a criopreservação, 22 estavam com níveis aumentados e 5 com níveis diminuídos. As proteínas degradadas estão envolvidas com vários processos como danos na mitocôndria, no citoesqueleto e na cauda, além de deficiência de ATP (WANG et al., 2014). Outro estudo realizado em 2017 verificou que a adição do crioprotetor a amostra seminal alterou os níveis de 105 proteínas envolvidas em processos metabólicos e redução oxidativa, sendo localizadas no citoplasma e na mitocôndria. Os autores ainda compararam o descongelamento em duas temperaturas distintas, onde os níveis de 22 proteínas foram alterados, independentemente do método de descongelamento. Quando a amostra foi descongelada a 0°C houve modificação de 60 proteínas, sendo 17 aumentadas e 43 diminuídas, já quando a amostra foi descongelada a 23°C, 99 proteínas foram modificadas,

onde 36 foram aumentadas e 53 diminuídas. A maioria destas proteínas possuem papel associado com ciclo celular, apoptose, resposta ao estresse, metabolismo e energia ou sinalização celular. Esta metodologia, ainda pouco explorada no campo da criopreservação seminal em humanos, poderá auxiliar na revelação de novos biomarcadores e desenvolvimento de metodologias alternativas para reduzir os criodanos (BOGLE et al., 2017).

JUSTIFICATIVA

A criopreservação de espermatozoides é fundamental para preservar a fertilidade masculina em diversas situações como nos casos de quimio/radioterapia, orquiectomia, bem como para manutenção do sêmen de doadores em bancos de sêmen comerciais. Sabe-se que a técnica gera mudanças físicas, químicas e osmóticas no espermatozoide acarretando criodanos significativos em diferentes níveis celulares, como na membrana plasmática, mitocôndria, acrossoma e DNA. Existe perda de até 50% da viabilidade da amostra criopreservada e, até o momento, o melhor método para congelar a amostra seminal não foi definido. Alguns autores propõem realizar técnicas de processamento seminal antes da criopreservação, método habitualmente praticado por bancos de sêmen comerciais com o intuito de melhorar a qualidade da amostra descongelada, porém os resultados são contraditórios. Sendo assim, torna-se necessário avaliar parâmetros seminais qualitativos, estruturais e funcionais para determinar a eficiência da realização do processamento seminal antes da criopreservação.

Dessa forma, este trabalho se propõe a comparar o congelamento de sêmen tradicional com duas técnicas de processamento seminal antes da criopreservação de espermatozoides (lavado X gradiente de densidade) em relação aos parâmetros seminais clássicos, fragmentação de DNA, marcadores de estresse oxidativo e avaliação funcional dos espermatozoides através de sondas fluorescentes.

HIPÓTESES

H₀: Não há diferença na recuperação de espermatozoides viáveis após o congelamento de sêmen quando comparadas as três formas de congelamento;

H_c: Existe diferença na viabilidade de espermatozoides após o descongelamento do sêmen quando comparadas as três formas de congelamento.

H₀: A fragmentação do DNA e marcadores de funcionalidade dos espermatozoides e o estresse oxidativo não aumentam após o processo de criopreservação, e não há diferença quando comparadas as três formas de congelamento;

H_c: A fragmentação do DNA e marcadores de funcionalidade dos espermatozoides e o estresse oxidativo aumentam após o processo de criopreservação, sendo este aumento significativamente diferente comparadas as três formas de congelamento.

OBJETIVOS

OBJETIVO PRINCIPAL

Avaliar qual o melhor método de congelamento de sêmen (congelamento tradicional *versus* lavado pré-congelamento *versus* gradiente de densidade pré-congelamento), em relação a obtenção de espermatozoides viáveis, comparando os principais parâmetros seminais.

OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

Verificar a importância do plasma seminal no congelamento de sêmen através da comparação entre o congelamento tradicional e o lavado pré-congelamento;

Verificar se congelar espermatozoides de melhor qualidade, recuperados após gradiente de densidade, aumenta a recuperação de espermatozoides viáveis após o processo de congelamento e comparar com as taxas de recuperação dos outros métodos;

Comparar o dano ao DNA, parâmetros de funcionalidade (dano no acrossoma e mitocôndria e criocapacitação) e marcadores de estresse oxidativo nos espermatozoides antes e após o congelamento/descongelamento de sêmen nos três métodos de criopreservação.

REFERÊNCIAS

ABDELHAFEZ, F. et al. Techniques for cryopreservation of individual or small numbers of human spermatozoa: a systematic review. **Human Reproduction Update**, [s. l.], v. 15, n. 2, p. 153–164, 2009.

ACS. **Key Statistics for Testicular Cancer 2018**. 2017. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/testicular-cancer/about/key-statistics.html>>.

AGCA, Y.; CRITSER, J. K. Cryopreservation of spermatozoa in assisted reproduction. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 20, n. 1, p. 15–23, 2002.

AGHA-RAHIMI, A. et al. Vitrification is not superior to rapid freezing of normozoospermic spermatozoa: effects on sperm parameters, DNA fragmentation and hyaluronan binding. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 28, n. 3, p. 352–358, 2014.

AITKEN, J.; FISHER, H. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. **BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology**, v. 16, n. 4, p. 259–267, 1994.

AIZPURUA, J. et al. New permeable cryoprotectant-free vitrification method for native human sperm. **Human Reproduction**, v. 32, n. 10, p. 2007–2015, 2017.

ALIABADI, E. et al. Comparison and evaluation of capacitation and acrosomal reaction in freeze-thawed human ejaculated spermatozoa treated with L-carnitine and pentoxifylline. **Andrologia**, n. Version of Record Online: 28 July, p. 1–8, 2017.

ALLAMANENI, S. S. R. et al. Comparative study on density gradients and

swim-up preparation techniques utilizing neat and cryopreserved spermatozoa. **Asian Journal of Andrology**, v. 7, n. 1, p. 86–92, 2005.

ALMODIN, C. G.; COSTA, R. C. **Criopreservação de Gametas, Embriões e Tecido Germinativo em Laboratório de Fertilização in Vitro**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2011.

ALVAREZ, J. G.; STOREY, B. T. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. **Journal of Andrology**, v. 13, n. 3, p. 232–241, 1992.

AMESSE, L. S. et al. Comparison of cryopreserved sperm in vaporous and liquid nitrogen. **The Journal of Reproductive Medicine**, v. 48, n. 5, p. 319–324, 2003.

AMIDI, F. et al. The role of antioxidants in sperm freezing: a review. **Cell and Tissue Banking**, v. 17, n. 4, p. 745–756, 2016.

AMOR, H. et al. Relationship between nuclear DNA fragmentation, mitochondrial DNA damage and standard sperm parameters in spermatozoa of fertile and sub-fertile men before and after freeze-thawing procedure. **Andrologia**, v. 50, n. 5, p. 1–9, 2018.

ANGER, J. T.; GILBERT, B. R.; GOLDSTEIN, M. Cryopreservation of sperm: indications, methods and results. **The Journal of Urology**, v. 170, n. 4, p. 1079–1084, 2003.

ANVISA. **1º Relatório de Amostras Seminais para uso em Reprodução Humana Assistida**. [s.d.]. Disponível em:
<<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33840/3484451/1º+Relatório+de+Importação+de+Amostras+Seminais+para+uso+em+Reprodução+Humana+Assistida/33c91fcf-18bb-4825-b659-a8a45053113f>>.

AZAMBUJA, R. **Reprodução Assistida: Técnicas de Laboratório**. 1. ed. Porto Alegre, RS: AGE, 2017.

BANDULARATNE, E.; BONGSO, A. Evaluation of human sperm function after repeated freezing and thawing. **Journal of Andrology**, v. 23, n. 2, p. 242–249, 2002.

BANIHANI, S. et al. Cryoprotective effect of L-carnitine on motility, vitality and DNA oxidation of human spermatozoa. **Andrologia**, v. 46, n. 6, p. 637–641, 2014.

BARTHELEMY, C. et al. Ultrastructural changes in membranes and acrosome of human sperm during cryopreservation. **Archives of Andrology**, v. 25, n. 1, p. 29–40, 1990.

BEN, W. X. et al. Effects of various concentrations of native seminal plasma in cryoprotectant on viability of human sperm. **Archives of Andrology**, v. 39, n. 3, p. 211–216, 1997.

BENSON, J. D. et al. The cryobiology of spermatozoa. **Theriogenology**, v. 78, n. 8, p. 1682–1699, 2012.

BOGGLE, O. A. et al. Identification of protein changes in human spermatozoa throughout the cryopreservation process. **Andrology**, v. 5, n. 1, p. 10–22, 2017.

BOITRELLE, F. et al. Cryopreservation of human spermatozoa decreases the number of motile normal spermatozoa, induces nuclear vacuolization and chromatin decondensation. **Journal of Andrology**, v. 33, n. 6, p. 1371–1378, 2012.

BROTHERTON, J. Cryopreservation of human semen. **Archives of**

Andrology, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 181–195, 1990.

BRUGNON, F. et al. Density gradient centrifugation prior to cryopreservation and hypotaurine supplementation improve post-thaw quality of sperm from infertile men with oligoasthenoteratozoospermia. **Human Reproduction**, v. 28, n. 8, p. 2045–2057, 2013.

BUFFONE, M. G. et al. Superoxide dismutase content in sperm correlates with motility recovery after thawing of cryopreserved human spermatozoa. **Fertility and Sterility**, v. 97, n. 2, p. 293–298, 2012.

CALAMERA, J. C. et al. Effect of thawing temperature on the motility recovery of cryopreserved human spermatozoa. **Fertility and Sterility**, v. 93, n. 3, p. 789–794, 2010.

CHAN, C. C. et al. Comparison of Nitric Oxide Production Motion Characteristics of Sperm After Cryopreserved in Three Different Preparations. **Archives of Andrology**, v. 50, n. 1, p. 1–3, 2004.

COUNSEL, M.; BELLINGE, R.; BURTON, P. Vitality of oligozoospermic semen samples is improved by both swim-up and density gradient centrifugation before cryopreservation. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 21, n. 5, p. 137–142, 2004.

CROSS, N. L.; HANKS, S. E. Effects of cryopreservation on human sperm acrosomes. **Human Reproduction**, v. 6, n. 9, p. 1279–1283, 1991.

DARVISHNIA, H. et al. Effects of very rapid versus vapor phase freezing on human sperm parameters. **Cell and Tissue Banking**, v. 14, n. 4, p. 679–685, 2013.

DE PAULA, T. S. et al. Effect of cryopreservation on sperm apoptotic deoxyribonucleic acid fragmentation in patients with oligozoospermia. **Fertility and Sterility**, v. 86, n. 3, p. 597–600, 2006.

DESAI, N. N.; BLACKMON, H.; GOLDFARB, J. Single sperm cryopreservation on cryoloops: an alternative to hamster zona for freezing individual spermatozoa. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 9, n. 1, p. 47–53, 2004.

DESROSIERS, P. et al. Membranous and structural damage that occur during cryopreservation of human sperm may be time-related events. **Fertility and Sterility**, v. 85, n. 6, p. 1744–1752, 2006.

DI SANTO, M. et al. Human sperm cryopreservation: Update on techniques, effect on DNA integrity, and implications for ART. **Advances in Urology**, v. 2012, 2012.

DONNELLY, E. T. et al. Assessment of DNA integrity and morphology of ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men before and after cryopreservation. **Human Reproduction**, v. 16, n. 6, p. 1191–1199, 2001.

DONNELLY, E. T.; MCCLURE, N.; LEWIS, S. E. M. Cryopreservation of human semen and prepared sperm: Effects on motility parameters and DNA integrity. **Fertility and Sterility**, v. 76, n. 5, p. 892–900, 2001.

DURU, N. K. et al. Cryopreservation-thawing of fractionated human spermatozoa is associated with membrane phosphatidylserine externalization and not DNA fragmentation. **Journal of Andrology**, v. 22, n. 4, p. 646–651, 2001.

ENDO, Y. et al. Successful delivery derived from vitrified-warmed spermatozoa from a patient with nonobstructive azoospermia. **Fertility and Sterility**, v. 98, n. 6, p. 1423–1427, 2012a.

ENDO, Y. et al. Simple vitrification for small numbers of human spermatozoa. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 24, n. 3, p. 301–307, 2012b.

ESTEVEZ, S. C. et al. Improvement in motion characteristics and acrosome status in cryopreserved human spermatozoa by swim-up processing before freezing. **Human Reproduction**, v. 15, n. 10, p. 2173–2179, 2000.

ESTEVEZ, S. C. et al. Effects of the technique of cryopreservation and dilution/centrifugation after thawing on the motility and vitality of spermatozoa of oligoasthenozoospermic men. **International Brazilian Journal of Urology**, v. 29, n. 2, p. 133–140, 2003.

FABOZZI, G. et al. Evaluation of the Efficiency of Two Different Freezing Media and Two Different Protocols to Preserve Human Spermatozoa from Cryoinjury. **International Journal of Reproductive Medicine**, v. 2016, p. 1–6, 2016.

FEINBERG, E. C. Advances in cryopreservation: we are not frozen in time. **Fertility and Sterility**, v. 108, n. 5, p. 763, 2017.

FORTUNATO, A.; LEO, R.; LIGUORI, F. Effects of cryostorage on human sperm chromatin integrity. **Zygote**, v. 21, n. 4, p. 330–336, 2013.

FRAINAIS, C. et al. Impact of freezing/thawing technique on sperm DNA integrity in HIV-1 patients. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 27, n. 7, p. 415–421, 2010.

GADEA, J. et al. Reduced glutathione content in human sperm is decreased after cryopreservation: effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. **Cryobiology**, v. 62, n. 1, p. 40–46, 2011.

GANDINI, L. et al. Cryopreservation and sperm DNA integrity. **Cell and Tissue**

Banking, v. 7, n. 2, p. 91–98, 2006.

GAO, D. Y. et al. Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. **Human Reproduction**, v. 10, n. 5, p. 1109–1122, 1995.

GAVELLA, M. et al. Protective Effect of Gangliosides on DNA in Human Spermatozoa Exposed to Cryopreservation. **Journal of Andrology**, v. 33, n. 5, p. 1016–1024, 2012.

GHORBANI, M. et al. Influence of BHT inclusion on post-thaw attributes of human semen. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, v. 61, n. 1, p. 57–61, 2015.

GIANAROLI, L. et al. DNA integrity is maintained after freeze-drying of human spermatozoa. **Fertility and Sterility**, v. 97, n. 5, p. 1067–1073.e1, 2012.

GILMORE, J. a et al. Effect of cryoprotectant solutes on water permeability of human spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 53, n. 5, p. 985–995, 1995.

GILMORE, J. a et al. Determination of optimal cryoprotectants and procedures for their addition and removal from human spermatozoa. **Human Reproduction**, v. 12, n. 1, p. 112–118, 1997.

GILMORE, J. a et al. Cryoprotective agent and temperature effects on human sperm membrane permeabilities: convergence of theoretical and empirical approaches for optimal cryopreservation methods. **Human Reproduction**, v. 15, n. 2, p. 335–343, 2000.

GÓMEZ-TORRES, M. J. et al. Effectiveness of human spermatozoa biomarkers as indicators of structural damage during cryopreservation. **Cryobiology**, v. 78,

p. 90–94, 2017.

GOSÁLVEZ, J. et al. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation dynamics in fertile donors. **Fertility and Sterility**, v. 92, n. 1, p. 170–173, 2009.

GOSÁLVEZ, J. et al. Dynamics of sperm DNA damage in fresh versus frozen-thawed and gradient processed ejaculates in human donors. **Andrologia**, v. 43, n. 6, p. 373–377, 2011.

GRIZARD, G. et al. Influence of seminal plasma on cryopreservation of human spermatozoa in a biological material-free medium: study of normal and low-quality semen. **International Journal of Andrology**, v. 22, n. 3, p. 190–196, 1999.

GRUNEWALD, S. et al. Sperm caspases become more activated in infertility patients than in healthy donors during cryopreservation. **Archives of Andrology**, v. 51, n. 6, p. 449–460, 2005.

GRUNEWALD, S. et al. Magnetic-activated cell sorting before cryopreservation preserves mitochondrial integrity in human spermatozoa. **Cell and Tissue Banking**, v. 7, n. 2, p. 99–104, 2006.

HALLAK, J. et al. Cryopreservation of human spermatozoa: comparison of TEST-yolk buffer and glycerol. **International Journal of Fertility and Women's Medicine**, v. 45, n. 1, p. 38–42, 2000.

HAMMADEH, M. E. et al. Effect of freeze-thawing procedure on chromatin stability, morphological alteration and membrane integrity of human spermatozoa in fertile and subfertile men. **International Journal of Andrology**, v. 22, n. 3, p. 155–162, 1999.

HAMMADEH, M. E. et al. Association between freezing agent and acrosome damage of human spermatozoa from subnormal and normal semen. **Andrologia**, v. 33, n. 6, p. 331–336, 2001a.

HAMMADEH, M. E. et al. Comparison between human sperm preservation medium and TEST-yolk buffer on protecting chromatin and morphology integrity of human spermatozoa in fertile and subfertile men after freeze-thawing procedure. **Journal of Andrology**, v. 22, n. 6, p. 1012–1018, 2001b.

HAMMADEH, M. E. et al. Comparison between computerized slow-stage and static liquid nitrogen vapour freezing methods with respect to the deleterious effect on chromatin and morphology of spermatozoa from fertile and subfertile men. **International Journal of Andrology**, v. 24, n. 2, p. 66–72, 2001c.

HAMMADEH, M. E. et al. Evaluation of cryoinjury of spermatozoa after slow (programmed biological freezer) or rapid (liquid nitrogen vapour) freeze-thawing techniques. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 18, n. 7, p. 364–370, 2001d.

HENRY, M. A. et al. Cryopreservation of human spermatozoa. IV. The effects of cooling rate and warming rate on the maintenance of motility, plasma membrane integrity, and mitochondrial function. **Fertility and Sterility**, v. 60, n. 5, p. 911–918, 1993.

HEZAVEHEI, M. et al. Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 37, n. 3, p. 327–339, 2018.

INCA. **Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil**. 2017. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/introducao.asp>>.

ISACHENKO, E. et al. Vitrification of mammalian spermatozoa in the absence of cryoprotectants: from past practical difficulties to present success.

Reproductive BioMedicine Online, v. 6, n. 2, p. 191–200, 2003.

ISACHENKO, E. et al. DNA integrity and motility of human spermatozoa after standard slow freezing versus cryoprotectant-free vitrification. **Human Reproduction**, v. 19, n. 4, p. 932–939, 2004.

ISACHENKO, V. et al. Clean technique for cryoprotectant-free vitrification of human spermatozoa. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 10, n. 3, p. 350–354, 2005.

ISACHENKO, V. et al. Cryoprotectant-free vitrification of human spermatozoa in large (up to 0.5 ml) volume: a novel technology. **Clinical Laboratory**, v. 57, n. 9–10, p. 643–650, 2011.

ISACHENKO, V. et al. Vitrification of human ICSI/IVF spermatozoa without cryoprotectants: new capillary technology. **Journal of Andrology**, v. 33, n. 3, p. 462–468, 2012.

ISACHENKO, V. et al. Technologies of cryoprotectant-free vitrification of human spermatozoa: asepticity as criterion of effectiveness. **Andrology**, v. 5, n. 6, p. 1055–1063, 2017.

JEYENDRAN, R. S. et al. Cryopreservation of human sperm in a lecithin-supplemented freezing medium. **Fertility and Sterility**, v. 90, n. 4, p. 1263–1265, 2008.

KALTHUR, G. et al. Effect of cryopreservation on sperm DNA integrity in patients with teratospermia. **Fertility and Sterility**, v. 89, n. 6, p. 1723–1727, 2008.

KARIMFAR, M. H. et al. The protective effects of melatonin against

cryopreservation-induced oxidative stress in human sperm. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 28, n. 1, p. 69–76, 2015.

KLÄVER, R. et al. Routine cryopreservation of spermatozoa is safe - Evidence from the DNA methylation pattern of nine spermatozoa genes. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 29, n. 9, p. 943–950, 2012.

KOBAYASHI, T. et al. Concentrating human sperm before cryopreservation. **Andrologia**, v. 23, n. 1, p. 25–28, 1991.

KOLON, T. F.; PHILIPS, K. A.; BUCH, J. P. Custom cryopreservation of human semen. **Fertility and sterility**, v. 58, n. 5, p. 1020–1023, 1992.

KOTDAWALA, A. P. et al. Addition of zinc to human ejaculate prior to cryopreservation prevents freeze-thaw-induced DNA damage and preserves sperm function. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 29, n. 12, p. 1447–1453, 2012.

KUSAKABE, H.; YANAGIMACHI, R.; KAMIGUCHI, Y. Mouse and human spermatozoa can be freeze-dried without damaging their chromosomes. **Human Reproduction**, v. 23, n. 2, p. 233–239, 2008.

LARSON, J. M. et al. An intrauterine insemination-ready cryopreservation method compared with sperm recovery after conventional freezing and post-thaw processing. **Fertility and Sterility**, v. 68, n. 1, p. 143–148, 1997.

LI, Z. et al. Protective effects of ascorbate and catalase on human spermatozoa during cryopreservation. **Journal of Andrology**, v. 31, n. 5, p. 437–444, 2010.

LIU, J. et al. Supplementation of cryopreservation medium with TAT-Peroxiredoxin 2 fusion protein improves human sperm quality and function.

Fertility and Sterility, v. 110, n. 6, p. 1058–1066, 2018.

MACK, S. R.; ZANEVELD, L. J. D. Acrosomal enzymes and ultrastructure of unfrozen and cryotreated human spermatozoa. **Gamete Research**, v. 18, n. 4, p. 375–383, 1987.

MARTÍNEZ-SOTO, J. C.; LANDERAS, J.; GADEA, J. Spermatozoa and seminal plasma fatty acids as predictors of cryopreservation success. **Andrology**, v. 1, n. 3, p. 365–375, 2013.

MCGONAGLE, L. S. et al. The influence of cryoprotective media and processing procedures on motility and migration of frozen-thawed human sperm. **Asian Journal of Andrology**, v. 4, n. 2, p. 137–141, 2002.

MCLAUGHLIN, E. A. et al. Effects of cryopreservation on the human sperm acrosome and its response to A23187. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 99, n. 1, p. 71–76, 1993.

MCLAUGHLIN, E. A.; FORD, W. C.; HULL, M. G. A comparison of the freezing of human semen in the uncirculated vapour above liquid nitrogen and in a commercial semi-programmable freezer. **Human Reproduction**, v. 5, n. 6, p. 724–728, 1990.

MEAMAR, M. et al. Sperm DNA fragmentation induced by cryopreservation: new insights and effect of a natural extract from *Opuntia ficus-indica*. **Fertility and Sterility**, v. 98, n. 2, p. 326–333, 2012.

MEDEIROS, C. M. O. et al. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 327–344, 2002.

MORSHEDI, M. et al. Comparison of various preparation methods for the use of cryopreserved-thawed spermatozoa in insemination therapy. **Journal of**

Assisted Reproduction and Genetics, v. 18, n. 10, p. 575–577, 2001.

MORTIMER, D. Current and future concepts and practices in human sperm cryobanking. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 9, n. 2, p. 134–151, 2004.

MOUBASHER, A. E. et al. Catalase improves motility, vitality and DNA integrity of cryopreserved human spermatozoa. **Andrologia**, v. 45, n. 2, p. 135–139, 2013.

MUTALIK, S. et al. Liposome encapsulated soy lecithin and cholesterol can efficiently replace chicken egg yolk in human semen cryopreservation medium. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, v. 60, n. 3, p. 183–188, 2014.

NAJAFI, A. et al. Supplementation of freezing and thawing media with brain-derived neurotrophic factor protects human sperm from freeze-thaw-induced damage. **Fertility and Sterility**, v. 106, n. 7, p. 1658–1665.e4, 2016.

NALLELLA, K. P. et al. Cryopreservation of human spermatozoa: Comparison of two cryopreservation methods and three cryoprotectants. **Fertility and Sterility**, v. 82, n. 4, p. 913–918, 2004.

NANGIA, A. K.; KRIEG, S. A.; KIM, S. S. Clinical guidelines for sperm cryopreservation in cancer patients. **Fertility and Sterility**, v. 100, n. 5, p. 1203–1209, 2013.

NARESH, S.; ATREJA, S. K. The protein tyrosine phosphorylation during in vitro capacitation and cryopreservation of mammalian spermatozoa. **Cryobiology**, v. 70, n. 3, p. 211–216, 2015.

NASHTAEI, M. S. et al. Protective features of resveratrol on human spermatozoa cryopreservation may be mediated through 5' AMP-activated

protein kinase activation. **Andrology**, v. 5, n. 2, p. 1–14, 2017.

NIJS, M.; OMBELET, W. Cryopreservation of human sperm. **Human Fertility**, v. 4, n. 3, p. 158–163, 2001.

O'CONNELL, M.; MCCLURE, N.; LEWIS, S. E. M. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. **Human Reproduction**, v. 17, n. 3, p. 704–709, 2002.

OBEROI, B.; KUMAR, S.; TALWAR, P. Study of human sperm motility post cryopreservation. **Medical Journal Armed Forces India**, v. 70, n. 4, p. 349–353, 2014.

OEHNINGER, S. et al. Assessment of sperm cryodamage and strategies to improve outcome. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 169, n. 1–2, p. 3–10, 2000.

ORTLOFF, C. et al. A new technique to evaluate the ability of cryoprotectors to prevent premature acrosome reaction in human spermatozoa. **Andrologia**, v. 38, n. 6, p. 230–232, 2006.

OZKAVUKCU, S. et al. Effects of cryopreservation on sperm parameters and ultrastructural morphology of human spermatozoa. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 25, n. 8, p. 403–411, 2008.

PAASCH, U. et al. Cryopreservation and thawing is associated with varying extent of activation of apoptotic machinery in subsets of ejaculated human spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 71, n. 6, p. 1828–1837, 2004a.

PAASCH, U. et al. Activation pattern of caspases in human spermatozoa. **Fertility and Sterility**, v. 81, n. SUPPL. 1, p. 802–809, 2004b.

PALOMAR RIOS, A. et al. Sperm preparation after freezing improves motile sperm count, motility, and viability in frozen-thawed sperm compared with sperm preparation before freezing-thawing process. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 35, n. 2, p. 237–245, 2018.

PALOMAR RIOS, A.; MOLINA BOTELLA, I. Sperm parameters that play a major role in the assessment of semen quality after cryopreservation. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 34, n. 10, p. 1271–1276, 2017.

PAOLI, D. et al. Sperm Cryopreservation: effects on Chromatin Structure. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 791, p. 137–150, 2014.

PARAS, L. et al. Cryopreservation technique: comparison of Test yolk buffer versus SpermCryo and vapour versus computerised freezing. **Andrologia**, v. 40, n. 1, p. 18–22, 2008.

PEDERSEN, H.; LEBECH, P. E. Ultrastructural changes in the human spermatozoon after freezing for artificial insemination. **Fertility and Sterility**, v. 22, n. 2, p. 125–133, 1971.

PÉREZ-SÁNCHEZ, F. et al. Improvement in quality of cryopreserved human spermatozoa by swim-up before freezing. **International Journal of Andrology**, v. 17, n. 3, p. 115–120, 1994.

PETRUNKINA, A. M. Fundamental aspects of gamete cryobiology. **Journal für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie**, v. 4, n. 2, p. 78–91, 2007.

PETYIM, S. et al. Sperm preparation before freezing improves sperm motility and reduces apoptosis in post-freezing-thawing sperm compared with post-thawing sperm preparation. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**,

v. 31, n. 12, p. 1673–1680, 2014.

PRINS, G.; WEIDEL, L. A comparative study of buffer systems as cryoprotectants for human spermatozoa. **Fertility and Sterility**, v. 46, n. July, p. 147–149, 1986.

RAAD, G. et al. Cryopreservation media differentially affect sperm motility, morphology and DNA integrity. **Andrology**, p. 1–10, 2018.

REED, M. L. et al. Soy lecithin replaces egg yolk for cryopreservation of human sperm without adversely affecting postthaw motility, morphology, sperm DNA integrity, or sperm binding to hyaluronate. **Fertility and Sterility**, v. 92, n. 5, p. 1787–1790, 2009.

RIVA, N. S. et al. Comparative analysis between slow freezing and ultra-rapid freezing for human sperm cryopreservation. **JBRA Assisted Reproduction**, v. 22, n. 4, p. 331–337, 2018.

ROSSATO, M. et al. Effects of cryopreservation on progesterone-induced ion fluxes and acrosome reaction in human spermatozoa. **Human Reproduction**, v. 15, n. 8, p. 1739–1743, 2000.

ROYERE, D. et al. Chromatin alterations induced by freeze-thawing influence the fertilizing ability of human sperm. **International Journal of Andrology**, v. 14, n. 5, p. 328–332, 1991.

ROYERE, D. et al. Cryopreservation of spermatozoa: a 1996 review. **Human Reproduction Update**, v. 2, n. 6, p. 553–559, 1996.

SAID, T. M. et al. Effects of magnetic-activated cell sorting on sperm motility and cryosurvival rates. **Fertility and Sterility**, v. 83, n. 5, p. 1442–1446, 2005.

SAID, T. M. et al. Assessment of sperm quality, DNA integrity and cryopreservation protocols in men diagnosed with testicular and systemic malignancies. **Andrologia**, v. 41, n. 6, p. 377–382, 2009.

SAID, T. M.; GAGLANI, A.; AGARWAL, A. Implication of apoptosis in sperm cryoinjury. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 21, n. 4, p. 456–462, 2010.

SANCHEZ, R. et al. Live birth after intrauterine insemination with spermatozoa from an oligoasthenozoospermic patient vitrified without permeable cryoprotectants. **Journal of Andrology**, v. 33, n. 4, p. 559–562, 2012.

SARITHA, K. R.; BONGSO, A. Comparative evaluation of fresh and washed human sperm cryopreserved in vapor and liquid phases of liquid nitrogen. **Journal of Andrology**, v. 22, n. 5, p. 857–862, 2001.

SATIRAPOD, C. et al. Comparison of cryopreserved human sperm from solid surface vitrification and standard vapor freezing method: On motility, morphology, vitality and DNA integrity. **Andrologia**, v. 44, n. SUPPL.1, p. 786–790, 2012.

SCHILLER, J. et al. Lipid analysis of human spermatozoa and seminal plasma by MALDI-TOF mass spectrometry and NMR spectroscopy - effects of freezing and thawing. **Chemistry and physics of lipids**, v. 106, n. 2, p. 145–156, 2000.

SCHUFFNER, A; MORSHEDI, M.; OEHNINGER, S. Cryopreservation of fractionated, highly motile human spermatozoa: effect on membrane phosphatidylserine externalization and lipid peroxidation. **Human Reproduction**, v. 16, n. 10, p. 2148–2153, 2001.

SCHUSTER, T. G. et al. Ultra-rapid freezing of very low numbers of sperm

using cryoloops. **Human Reproduction**, v. 18, n. 4, p. 788–795, 2003.

SHARMA, R. et al. Effect of sperm storage and selection techniques on sperm parameters. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, v. 61, n. 1, p. 1–12, 2015.

SHARMA, R. K.; AGARWAL, A. Sperm quality improvement in cryopreserved human semen. **The Journal of Urology**, v. 156, n. 3, p. 1008–1012, 1996.

SION, B. et al. Annexin V binding to plasma membrane predicts the quality of human cryopreserved spermatozoa. **International Journal of Andrology**, v. 27, n. 2, p. 108–114, 2004.

SPANÒ, M. et al. Nuclear chromatin variations in human spermatozoa undergoing swim-up and cryopreservation evaluated by the flow cytometric sperm chromatin structure assay. **Molecular Human Reproduction**, v. 5, n. 1, p. 29–37, 1999.

SRIDHARAN, T. B.; VICKRAM, A. S. Evolving trends in cryopreservation and parameters influencing semen extender preparation - a prospective review. **Cryo Letters**, v. 37, n. 3, p. 196–205, 2016.

STANIC, P. et al. Comparison of protective media and freezing techniques for cryopreservation of human semen. **European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology**, v. 91, n. 1, p. 65–70, 2000.

STANIC, P.; SONICKI, Z.; SUCHANEK, E. Effect of pentoxifylline on motility and membrane integrity of cryopreserved human spermatozoa. **International Journal of Andrology**, v. 25, n. 3, p. 186–190, 2002.

THOMSON, L. K. et al. The DNA integrity of cryopreserved spermatozoa

separated for use in assisted reproductive technology is unaffected by the type of cryoprotectant used but is related to the DNA integrity of the fresh separated preparation. **Fertility and Sterility**, v. 92, n. 3, p. 991–1001, 2009a.

THOMSON, L. K. et al. Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. **Human Reproduction**, v. 24, n. 9, p. 2061–2070, 2009b.

TIWARI, A. et al. A new media without animal component for sperm cryopreservation: motility and various attributes affecting paternal contribution of sperm. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 34, n. 5, p. 647–657, 2017.

VALCARCE, D. G. et al. Analysis of DNA damage after human sperm cryopreservation in genes crucial for fertilization and early embryo development. **Andrology**, v. 1, n. 5, p. 723–730, 2013a.

VALCARCE, D. G. et al. Effect of cryopreservation on human sperm messenger RNAs crucial for fertilization and early embryo development. **Cryobiology**, v. 67, n. 1, p. 84–90, 2013b.

VERHEYEN, G.; PLETINCX, I.; VAN STEIRTEGHEM, A. Effect of freezing method, thawing temperature and post-thaw dilution/washing on motility (CASA) and morphology characteristics of high-quality human sperm. **Human Reproduction**, v. 8, n. 10, p. 1678–1684, 1993.

VIREQUE, A. A. et al. Effects of n-6 and n-3 polyunsaturated acid-rich soybean phosphatidylcholine on membrane lipid profile and cryotolerance of human sperm. **Fertility and Sterility**, v. 106, n. 2, p. 273–283.e6, 2016.

VUTYAVANICH, T.; PIROMLERTAMORN, W.; NUNTA, S. Rapid freezing versus slow programmable freezing of human spermatozoa. **Fertility and Sterility**, v. 93, n. 6, p. 1921–1928, 2010.

WANG, A. W. et al. Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation. **Urology**, v. 49, n. 6, p. 921–925, 1997.

WANG, S. et al. Proteomic characteristics of human sperm cryopreservation. **Proteomics**, v. 14, n. 2–3, p. 298–310, 2014.

WATSON, P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 7, n. 4, p. 871–891, 1995.

WEIDEL, L.; PRINS, G. Cryosurvival of Human Spermatozoa Frozen in Eight Buffer Systems. **Journal of Andrology**, v. 8, n. 1, p. 41–47, 1987.

WIDIASIH, D. et al. Multistep and single-step treatment of human spermatozoa with cryoprotectants. **Fertility and Sterility**, v. 92, n. 1, p. 382–389, 2009.

WOLF, D. P. et al. Intrauterine insemination-ready versus conventional semen cryopreservation for donor insemination: a comparison of retrospective results and a prospective, randomized trial. **Fertility and Sterility**, v. 76, n. 1, p. 181–185, 2001.

WÜNDRICH, K. et al. Activation of caspases in human spermatozoa during cryopreservation - an immunoblot study. **Cell and Tissue Banking**, v. 7, n. 2, p. 81–90, 2006.

YE, Y. et al. Evaluation of human sperm function after being cryopreserved within the zona pellucida. **Fertility and Sterility**, v. 92, n. 3, p. 1002–1008, 2009.

YOGEV, L. et al. Pre-freezing sperm preparation does not impair thawed spermatozoa binding to the zona pellucida. **Human Reproduction**, v. 14, n. 1,

p. 114–117, 1999.

ZAVOS, P. M. et al. Improvements in qualitative characteristics of cryopreserved human spermatozoa following recovery via the SpermPrep II filtration method. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v. 165, n. 4, p. 283–290, 1991.

ZRIBI, N. et al. Effects of cryopreservation on human sperm deoxyribonucleic acid integrity. **Fertility and Sterility**, v. 93, n. 1, p. 159–166, 2010.

ARTIGO EM INGLÊS**EFFECT OF SEMINAL PROCESSING IN FUNCTIONALITY OF
SPERMATOZOIDS BEFORE AND AFTER CRYOPRESERVATION**

Ana Paula de Souza Kussler¹, Helena von Eye Corleta², Ivan Cunha Bustamante

Filho³, Elisa Negri⁴

^{1, 2, 4} Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia,
Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS,
Brasil

^{1, 2} Gerar - Reprodução Humana, Porto Alegre, RS, Brasil

³ Laboratório de Biotecnologia, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia,
Universidade do Vale do Taquari – UNIVATES, Lajeado, RS, Brasil

SHORT TITLE: Seminal Processing in the Sperm Cryopreservation

KEYWORDS: Semen. Spermatozoa. Density gradient. Cryopreservation.
Sperm wash. Seminal plasma.

Corresponding author:

Msc. Ana Paula de Souza Kussler

Generar - Reprodução Humana

Rua General Neto, 295

Porto Alegre, RS, CEP 90560-020, Brazil

Phone/FAX: 0055 51 33112149 - e-mail: paulakussler@yahoo.com.br

ABSTRACT

Background: Seminal cryopreservation causes significant damage to the sperm, therefore, different methods of cryopreservation have been studied.

Objectives: Comparing the effects of density gradient processing and the washed with seminal plasma removal concomitant to cryopreservation in seminal parameters, oxidative damage, DNA fragmentation, cryo-capacitation and acrosome and mitochondrial integrity. **Materials and methods:** The seminal sample of 26 normozoospermic patients was divided into 3 parts, one with seminal plasma, the second one after accomplishing the washed and the third one, after the selection through density gradient. The samples were cryopreserved for at least two weeks. The seminal parameters, ROS production with the DCF probe, plasma membrane peroxidation using the BODIPY probe, DNA fragmentation by TUNEL, acrosome integrity by FITC/PSA probe, the lipid disorder of the plasma membrane by the merocyanine 540 probe and the mitochondrial potential by the JC1 probe were evaluated through flow cytometry and analyzed in the samples before cryopreservation and after thawing.

Results: Density gradient processing selected mobile and viable sperm with

normal morphology ($p < 0,05$). Cryopreservation negatively affected seminal parameters in the processing, and even if the sperm recovery was lower in the density gradient after the thawing, progressive motility, total motility, vitality and morphology remained higher ($p < 0,05$). The density gradient selected cells with lower oxidative damage, lower plasma membrane lipid disorder, higher DNA and acrosome integrity and with higher mitochondrial potential ($p < 0,05$). Cryopreservation did not increase the ROS or the lipid peroxidation of the plasma membrane or damage to the DNA, in parallel, there was damage to the acrosome, the mitochondria and the lipid disorder of the plasma membrane.

Discussion and Conclusion: The cryopreservation significantly compromises the seminal parameters (motility, morphology, viability); and causes structural damage to the acrosome and to the mitochondria of the spermatozoa. In normozoospermic patients, the gradient was able to select better quality spermatozoa (integrity of DNA, acrosome, and mitochondria, lipid peroxidation and plasma membrane lipid disorder) compared to the other processes, and this benefit was kept after the thawing of the samples.

INTRODUCTION

Sperm cryopreservation is the standard procedure for male fertility preservation. Semen cryopreservation should be offered when the man, who has not established offspring, presenting any kind of disease that causes temporary or permanent loss of fertility, such as before chemotherapy, radiation

therapy and testicles removal. Cryopreservation is also mandatory in heterologous semen banks to provide semen for assisted reproduction programs in cases of azoospermia or homoaffective couples (ANGER; GILBERT; GOLDSTEIN, 2003; MORTIMER, 2004).

Undoubtedly, cryopreservation of semen brings practical benefits to the procedures of assisted reproduction; however, it causes cellular alterations known as cryoinjuries. This phenomenon happens due to the formation of intra and extra cellular ice crystals, chemical toxicity of cryoprotectants, osmotic stress and cold shock. During cryopreservation, sperm cells pass through dramatic changes in intra and extra cellular components. The chemical, physical and osmotic effects of this process are known for decreasing fertilization capacity and may result in loss of structural integrity and functional capacity of at least 50% of spermatozoa. Samples of semen with altered parameters may have the survival rate even more compromised (BENSON et al., 2012; PAOLI et al., 2014; PETRUNKINA, 2007).

Cryopreservation also causes oxidative stress and an increase in apoptotic events that decrease the viability and stability of the plasma membrane, significant reduction of motility and vitality, disruption of mitochondrial membrane potential and DNA fragmentation (DI SANTO et al., 2012; KALTHUR et al., 2008; O'CONNELL; MCCLURE; LEWIS, 2002; TAYLOR et al., 2009).

Studies have shown that the processing and selection of high-quality spermatozoa before freezing, with removal of seminal plasma containing non-viable spermatozoa, leukocytes, bacteria and debris, improves sperm quality

after thawing (ALLAMANENI et al., 2005; COUNSEL; BELLINGE; BURTON, 2004; KOBAYASHI et al., 1991; PÉREZ-SÁNCHEZ et al., 1994). Studies have shown improvement in acrosome integrity (ESTEVEES et al., 2000), lower percentage of apoptotic and necrotic spermatozoa (BRUGNON et al., 2013; PETYIM et al., 2014), higher mitochondrial membrane potential (BRUGNON et al., 2013) and higher nuclear integrity (SPANÒ et al., 1999) after processing and thawing. The "IUI-ready" method, which uses the density gradient in donor samples with normal seminal parameters and a cryoprotectant based on glycerol and sucrose, offers the possibility of the sample being inseminated in the uterine cavity without processing after thawing and showed improvement of seminal parameters after thawing (LARSON et al., 1997; MORSHEDI et al., 2001; WOLF et al., 2001).

However, disadvantages in carrying out the pre-cryopreservation processing, especially related to the cellular damage caused by the manipulation/centrifugation (DONNELLY; MCCLURE; LEWIS, 2001; GRIZARD et al., 1999; MOUBASHER et al., 2013; SARITHA; BONGSO, 2001), and the removal of seminal plasma, which protects cells against oxidative attack, and the presence of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) that increase plasma membrane fluidity, enhancing the resistance of lipoproteins that maintain the lipid composition of the plasma membrane in low temperatures, and heparin-binding proteins (HBPs) that prevent heat shock and peroxidation (ISACHENKO et al., 2017; PALOMAR RIOS et al., 2018; PALOMAR RIOS; MOLINA BOTELLA, 2017; SAID; GAGLANI; AGARWAL, 2010) were demonstrated.

The objective of this paper work was to compare the conventional freezing with freezing after two methods of seminal processing (washed/centrifugation and density gradient) for seminal parameters, DNA fragmentation, oxidative stress markers and functional sperm evaluations.

METHODS

Patients

A cross-sectional prospective study of patients undergoing investigation of infertility at the Generar Reprodução Humana, Brazil and volunteers. Samples with total concentration of sperm less than $30 \times 10^6/\text{mL}$, leucocytes bigger than $1 \times 10^6/\text{mL}$ e volume lower than 2,0 mL were excluded. Semen samples were collected by masturbation from 56 consecutive patients or volunteers. Out of these ones, 30 were excluded (3 oligozoospermic, 1 oligoasthenoteratozoospermic, 1 oligoasthenozoospermic, 2 teratozoospermic, 6 leucocytospermic, 6 hipospermic, 10 exhibited normal seminal parameters, but with low volume for our study e 1 was excluded after thawing due to low recovery of spermatozoa in the fraction of the sample submitted to the density gradient), only being left the 26 patients who were included in the study here reported.

This study followed the Guidelines and Norms Regulating Research Involving Human Subjects (Resolution 466/12 of the National Health Council) and was approved by the Research Ethics Committee of the Research and

Post-Graduate Group of the Hospital de Clinicas de Porto Alegre (17-0314). All patients signed an informed consent form.

Seminal Analysis

Semen samples were collected by masturbation after an abstinence period of 3 to 7 days. Semen analysis was performed following 30 minutes liquefaction at room temperature. The pH, volume, appearance, concentration, motility, vitality (eosin) and morphology were analyzed according to the 2010 World Health Organization (WHO) parameters (WHO, 2010). Then the sample was divided into three parts, one to be analyzed with the seminal plasma, and the other two to be submitted to seminal processing techniques, the simple washed and the density gradient. After processing, the two parts were analyzed again according to the WHO manual. At the end, the three parts were analyzed for DNA fragmentation, potential da membrane mitochondrial, acrossomal damage, reactive oxygen species production, plasma membrane stability and lipoperoxidation by flow cytometry. An aliquot of each of the three parts was cryopreserved.

Sperm Preparation

In the washed/centrifugation, the sample was diluted in the portion 1:1 with Modified HTF Medium - HEPES supplemented with 10% Serum Substitute Supplement (Irvine Scientific, Santa Clara, California) and centrifuged for 10

minutes at 300g. The supernatant was removed and the pellet re-suspended in an appropriate volume of the same medium.

In the density gradient, a density gradient was created by sequential pipetting of 1ml of the 90% gradient, 1ml of the 45% gradient (Irvine Scientific, Santa Clara, California) and then the sample was placed on the top of the gradient. The mixture was centrifuged for 20 min at 300 g and the viable sperm population was recovered from the 90% fraction and washed with Modified HTF Medium - HEPES supplemented with 10% Serum Substitute Supplement and the pellet re-suspended in an appropriate volume of the same medium.

Cryopreservation

First of all, the TEST-yolk Buffer cryoprotectant (TYB, Irvine Scientific, Santa Clara, California) was thawed at room temperature, then the sample was added drop by drop in a 1:1 concentration and left there for ten minutes at room temperature for balancing. After this time, the sample was put into 0.250 ml pallet (IVM) previously identified and sealed through the Poly Sealer P-200 (Fuji Impulse) sealer. The pallets were then left horizontally in the liquid nitrogen vapor at a distance of 10 centimeters from the liquid surface for 10 minutes. After the same pallets were directly immersed in liquid nitrogen. After, at least 2 weeks the pallets were removed from the nitrogen tank and thawed on a heated plate at 37°C for 5 minutes. To remove the cryoprotectant, each fraction of the

thawed specimen was subjected to washing/centrifugation separately and the same analyzes were performed on the fresh sample.

DNA Fragmentation (TUNEL)

The DNA fragmentation was assessed using the Terminal deoxynucleotidyl transferase deoxyuridine triphosphate (dUTP) nick end labeling technique (TUNEL) using the APO-DIRECT Apoptosis Detection Kit (556381, BD Biosciences, San Diego, CA, USA). Samples were analyzed following the manufacturer's instructions. First 2×10^6 sperm/ml were fixed in 1% paraformaldehyde in PBS (pH 7.4) (100501, Synth, Diadema, Brazil) for 60 minutes on ice. After washing with PBS, the sample was re-suspended in 70% ice-cold ethanol and stored at -20°C until use. After two washes in wash solution, $50\mu\text{l}$ of the DNA Labeling Solution were incubated with the spermatozoa for 1 hour in the dark at 37°C . After stopping the enzymatic reaction, spermatozoa were washed twice with rinse buffer, re-suspended with PI/RNase Staining Buffer, incubated for 30 minutes at room temperature in the dark and analyzed by flow cytometry. All experiments included negative and positive controls provided by the manufacturer itself. The results were expressed as the percentage of spermatozoa presenting fragmented DNA.

Production of Reactive Oxygen Species

The levels of reactive oxygen species (ROS) before and after freezing / thawing of semen throughout different types of processing were evaluated according to Mahfouz (MAHFOUZ et al., 2009). 5×10^6 sperm/ml were incubated with 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (H2DFDDA) (D6883, Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri, USA) 25 μ M were added to the sperm suspension and incubated at 25°C for 40 minutes. Apoptotic spermatozoa were excluded by using stain for nucleic acid. We used propidium iodide (PI) 10 μ g / ml (P4170, Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri, USA) as a counter stain dye. The FL-1 was used to measure green fluorescence, and FL-3 was used to measure the shift in red fluorescence upon staining with propidium iodide. Data were expressed as median fluorescence intensity taking into account all spermatozoa and only the alive ones (negative PI). Positive control was performed by incubating with H₂O₂ (500 mM).

Assessment of membrane lipid packing disorder

To detect increases in plasma membrane lipid packing disorder, sperm samples were stained with merocyanine 540 (M540) and Yo-Pro 1 according to Gadea and Martinez-Soto (GADEA et al., 2011; MARTINEZ-SOTO et al., 2010). 5×10^6 sperm/ml were first incubated with the Yo-Pro 1 fluorescent probe (25 nM final concentration) (Y3603, Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, USA) for 15 minutes at 37°C. In the last 5 minutes the M540 fluorescence probe

(2,7 μ M final concentration) (323756, Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri, USA) was added. M540 fluorescence was collected with an FL2 sensor and Yo-Pro 1 fluorescence with an FL-1 sensor. Data were expressed as mean fluorescence intensity taking into account all spermatozoa and only the alive ones (negative Yo-Pro). For the positive Control of Yo-Pro 1 the samples were subjected to the successive freezing and thawing by direct immersion in liquid nitrogen. For positive M540 Control the samples were incubated with H₂O₂ (500 mM).

Assessment of mitochondrial membrane potential

Sperm mitochondrial membrane potential (MMP) was assessed using the JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetramethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide) fluorescence probe according to Amaral (AMARAL et al., 2013). JC-1 is a cationic lipophilic probe that can selectively enter the mitochondria and is able to shift its fluorescent emission from green to red according to MMP. When the MMP is high, the probe accumulates in the matrix forming the so called 'J-aggregates' that emit red fluorescence. In contrast, with low MMP JC-1 remains in its monomeric form displaying green fluorescence.

Sperm samples (5×10^6 sperm/ml) were incubated with JC-1 (T3168, Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, USA) at a final concentration of 2 μ M for 15 min at 37°C. An appropriate control was prepared using CCCP (Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone - 50 μ M) (C2759, Sigma-Aldrich Co., Saint

Louis, Missouri, USA), an uncoupler that disrupts MMP, resulting in a shift from red to green fluorescence. After incubation, samples were washed (600 g, 5 min) with PBS. The red fluorescence was measured using flow cytometry in the FL2 channel. Data were expressed as mean fluorescence intensity.

Assessment Lipid Peroxidation

Lipid peroxidation was assessed using BODIPY (581/591) C₁₁ according to Aitken e Koppers with very small changes (AITKEN et al., 2007; KOPPERS et al., 2008). This probe is incorporated into membranes and when oxidized responds with a fluorescence spectral emission change from red to green (AMARAL et al., 2013). BODIPY (D3861, Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, USA) was added to spermatozoa (5×10^6 sperm/ml) at a final concentration of 5 μ M. Sperm samples were incubated for 30 min at 37°C. The sperm suspension was then washed (600 g, 5 min) and suspended in fresh PBS. At the end of this incubation period, the viability indicator propidium iodide (10 μ g/ml) was added 5 min before the cells being analyzed on a flow cytometer. The FL-1 was used to measure green fluorescence, and FL-3 was used to measure the shift in red fluorescence upon staining with propidium iodide. An appropriate positive control was also prepared by incubating the samples with ferrous sulphate (640 μ M) e H₂O₂ (500 mM). Data were expressed as mean fluorescence intensity taking into account all spermatozoa and only the alive ones (negative PI).

Assessment Acrossome Integrity

To assess the integrity of the acrosome Fluorescein Isothiocyanate-conjugated *Pisum sativum agglutinin* (FITC/PSA), was used, according to D'Cruz & Hass with minor modifications (D'CRUZ; HAAS, 1996). 5×10^6 sperm/ml were incubated with FITC/PSA (10 $\mu\text{g/ml}$) (L0770, Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri, USA) for 15 minutes at room temperature. The sperm suspension was then washed (600 g, 5 min) and suspended in fresh PBS. At the end of this incubation period, the viability indicator propidium iodide (10 $\mu\text{g/ml}$) was added 5 min before the cells being analyzed on a flow cytometer using an excitation wavelength of 488 nm. The FL-1 was used to measure green fluorescence, and FL-3 was used to measure the shift in red fluorescence upon staining with propidium iodide. Data were expressed as median fluorescence intensity taking into account all spermatozoa and only the alive ones (negative PI). For the positive Control the samples were subjected to the successive freezing and thawing by direct immersion in liquid nitrogen

Flow cytometry analysis

All fluorescence signals of labeled spermatozoa were assessed by Becton Dickinson flow cytometer Accuri C6 (Becton Dickinson, San Jose, CA,

USA) controlled by BD Accuri 1.0 software. Cells labeled with fluorescent probes were intercepted at the same time by an argon laser at 488nm and a red laser at 670nm. Fluorescence emission from the probes was captured by channels FL1 (Band Pass - 533/30 nm), FL2 (Band Pass - 585/40 nm) and FL3 (Long Pass > 670 nm). The debris was gated out, by drawing a region on forward versus side scatter dot plot enclosing the population of cells of interest. Single-color stained controls were used for manual compensation. In addition, the sample without any treatment was assigned as a negative control to measure the autofluorescence signals. Samples were processed at an acquisition rate of approximately 600–1000 events/s, acquiring 10,000 cells per analysis.

Statistical Analysis

The variables were described by mean and standard deviation or standard error. In order to evaluate the effect of the freezing/thawing and processes on the parameters, the Generalized Estimates Equations (GEE) model was applied with the Bonferroni correction for multiple comparisons. For the variables with symmetric distribution, a linear model was used. For the asymmetrical, the Gama model (median fluorescence intensity for the DCF and FITC/PSA probe and sperm DNA fragmentation) was used and for the discrete ones, the Poisson model (morphological changes: macrocephalous, short tail, bent tail and coiled) was also used. The significance level adopted was 5% ($p \leq 0.05$) and the analyzes were performed in the SPSS program version 21.0. The sample size calculation was based on the study of Yogev and collaborators (1999)(YOGEV et al., 1999). For a significance level of 5%, 80% power and

effect size of 0.4 on progressive motile post-thawing of the sample, comparing the traditional freezing method with the washed and the pre-freezing gradient, the sample calculation resulted in a minimum of 22 patients in each group.

Results

Semen Characteristics

26 samples from 26 patients were included in this study. The mean age of the participants was 25.5 ± 6.36 years old and the baseline seminal parameters are presented in Table 1. According to the World Health Organization criteria, all patients presented seminal parameters within normal range.

Effect of sperm selection protocols and cryopreservation on seminal characteristics

Table 2 presents the effects of seminal preparations and cryopreservation on the samples. There was a decrease in the recovery of spermatozoa after processing, and the gradient have presented the lowest concentration ($37,73 \pm 2,19 \times 10^6/\text{ml}$; $p < 0,05$). After thawing, the raw sample and the washed sample showed a significant decrease in concentration, which did not occur with the gradient.

In the fresh samples, progressive motility was better after preparation by density gradient ($60,69 \pm 1,04$ %; $p < 0,05$), which did not occur with the washed compared to the baseline analysis ($45,07 \pm 1,04$ e $46,42 \pm 1,11$ % respectively). Cryopreservation/thawing reduced both progressive and total motility in the three groups (raw: $22,11 \pm 1,48$ e $32,76 \pm 1,67$; washed: $22,69 \pm 1,57$ e $32,53 \pm 1,89$ e gradient: $31,30 \pm 1,47$ e $41,26 \pm 1,57$ % respectively), the density gradient being able to keep significantly better evaluated motilities. The percentage of immotile sperm decreased with density gradient selection ($p < 0,05$), while washed resulted in an increase in these cells ($p < 0,05$). After cryopreservation, there was a significant increase in immotile sperm in all groups; in the density gradient group, the percentage of immotile spermatozoa was lower when compared to raw and washed semen ($p < 0,05$).

The analysis of progressive motile sperm concentration/ml in the samples showed a decrease in washed when compared to the raw one ($p < 0,05$), there being no difference between the raw and the gradient or washed and gradient. After cryopreservation, progressive motile sperm concentration decreased significantly in the 3 groups, with no difference among them. The total motile sperm concentration/ml in the raw sample was higher than the preparations in the fresh sample ($p < 0,05$). Cryopreservation significantly decreased total motility ($\times 10^6/\text{ml}$), in the 3 groups, in the unprocessed sample the highest total motile sperm concentration was kept in relation to the gradient ($p < 0,05$), and was similar to washed ($p > 0,05$).

The total and progressive motile sperm count (PMSC and TMSC) were higher in the fresh raw sample compared to the preparations, after the thawing,

the PMSC was not different among the three groups ($p>0,05$). The total motile sperm count (TMSC) after thawing of the raw sample remained better compared to the gradient ($p<0,05$).

As for sperm viability (Table 3), the gradient selected a higher number of viable spermatozoa when compared to the raw one ($77,50 \pm 1,02$ versus $68,38 \pm 1,04$ %; $p<0,05$), while in the washed there was a decrease compared to the raw ($62,00 \pm 1,14$ %; $p<0,05$), the cryopreservation decreased the viability of the cells in the three groups, being the density gradient the one remaining with the largest number of viable cells ($44,23 \pm 1,63$ versus $39,61 \pm 1,65$ raw and $38,00 \pm 1,93$ % washed).

The recovery rates after the sample freezing and thawing of the 3 groups are shown in Table 4. No significant difference was found among the 3 groups for progressive and total motile recovery and neither in the concentration of motile spermatozoa with progressive and total motility. The recovery rate of viable and morphologically normal spermatozoa was significantly higher in the samples after washed, with a higher recovery rate when compared to samples after density gradient.

Related to morphology, the gradient was able to select a greater number of morphologically normal fresh spermatozoa even though the cryopreservation has decreased the percentage of normal cells, the gradient kept more cells with normal forms ($p<0,05$) (table 3). The main morphological changes among the processes and after cryopreservation are inserted in Table 5.

Effect of sperm selection protocols and cryopreservation on oxidative stress parameters

Figure 1 shows the production of the reactive oxygen species (ROS) through the DCF fluorescent probe in the 3 different groups, the density gradient processing decreased these radicals when compared to the washed process ($p < 0,05$), without any difference with the raw samples ($p > 0,05$). There was not any increase in the production of reactive oxygen species and no difference among the groups after thawing ($p > 0,05$).

The lipid peroxidation in the sperm membrane was evaluated by the BODIPY probe (figure 2), both the density gradient and the washed selected less oxidized cells when compared to the raw sample, considering the total population and only the viable cells ($p < 0,05$). Cryopreservation did not increase lipid peroxidation in any of the groups, however, in the thawed washed, the lipid peroxidation was higher when compared to the raw and the gradient ($p < 0,05$) (total population). Considering only the live cells, the thawed washed remained with higher lipid peroxidation when compared to the raw one ($p < 0,05$), however, there was no difference when compared to the gradient.

Effect of sperm selection protocols and cryopreservation on cell structural integrity

Acrosomal integrity results are shown in figure 3. In the fresh samples the acrosomal damage was significantly higher in the washed compared to the other two groups ($p < 0,05$). Cryopreservation caused damage to the acrosomal membrane only in the raw sample ($p < 0,05$) and the density gradient samples maintained greater acrosomal integrity after the thawing process. When only living cells were considered (figure 3B), cryopreservation caused significant damage to the acrosome in all three groups and the gradient was efficient in selecting cells without acrosome damage after thawing ($p < 0,05$).

The plasma membrane instability of the sperm, evaluated by the fluorescent probe Merocyanine 540, was lower in the gradient group when compared to the raw or washed sample ($p < 0,05$) (figure 4). Cryopreservation destabilized the plasma membrane in the processed (washed and gradient) samples, which did not occur in the frozen sample with seminal plasma. After the thawing process, there was less destabilization of the plasma membrane in the gradient group when compared to the raw and washed samples both in the analysis of the total population (Figure 4A) and only in the live cells ($p < 0,05$).

The evaluation of mitochondrial membrane potential performed by flow cytometry before and after the freezing process (fig. 5) showed cells with higher mitochondrial potential in the gradient group ($p < 0,05$), followed by the washed that presented this capacity when compared to raw sample ($p < 0,05$). The potential of the mitochondrial membrane was significantly impaired in the three processes, with no differences among the groups.

As for the sperm DNA fragmentation of sperm DNA evaluated by TUNEL (fig.6), the density gradient selected a higher percentage of spermatozoa with

intact DNA. The washed showed greater DNA fragmentation compared to raw and to the gradient ($p < 0,05$). Cryopreservation did not affect DNA integrity in any group, and the gradient group kept significant fewer spermatozoa with fragmented DNA.

Discussion

The semen freezing process is the standard method of preserving male fertility, and although advances have been achieved in this area, lethal and sub-lethal cryodamage associated with a 50% reduction in vitality remain a major challenge, justifying that different methods of seminal cryopreservation have been studied (GRIZARD et al., 1999; OEHNINGER et al., 2000). In this paper, we evaluated the performance of different selection methods and sperm cryopreservation in seminal parameters, sperm recovery rates, and oxidative stress and structural markers (acrosome, mitochondria and DNA integrity) in normozoospermic patients.

The density gradient processing was effective in the selection of mobile, viable and normal spermatozoa before freezing and this difference was kept after thawing process, corroborating previous results that demonstrated the superiority of this technique (ALLAMANENI et al., 2005; BRUGNON et al., 2013; KOBAYASHI et al., 1991; LARSON et al., 1997; SHARMA; AGARWAL, 1996; YOGEV et al., 1999). Despite the lower concentration of spermatozoa after the gradient, the progressive motile sperm concentration and PMSC were

comparable after the thawing process among the treatments, indicating that the gradient plays an important role in normozoospermic patients for intrauterine insemination (IUI) and storage for semen banks (MORSHEDI et al., 2001; SHARMA; AGARWAL, 1996; WOLF et al., 2001).

The analysis of the seminal parameters after cryopreservation (recovery rate) showed that the gradient samples presented lower vitality and morphology when compared to the washed ones and were similar to the traditional freezing (with seminal plasma), in contrast to Donnelly's findings et al. (2001) that showed lower recovery rates of morphology in the gradient over traditional freezing (DONNELLY et al., 2001). Recovery rates for motility and progressive motile sperm concentration were similar among the preparations, suggesting that the improvement in the seminal parameters is proportional to the selection performed by the gradient previous to freezing. Other authors, however, have already found better recovery rates (motility and concentration) in the gradient group when compared to the traditional method (BRUGNON et al., 2013; MORSHEDI et al., 2001) and to swim up (ALLAMANENI et al., 2005).

The accomplishment of the washed process before the sample freezing, aiming for the removal of seminal plasma was studied by Grizard *et al.* in 1999 and by Fabozzi *et al.* in 2016. In these studies, the seminal parameters at the thawing processes were significantly lower comparing to freezing with seminal plasma (FABOZZI et al., 2016; GRIZARD et al., 1999) and to density gradient (YOGEV et al., 1999). Our results corroborate with other authors results, who did not find a difference between the traditional method and the washed in

relation to motility, viability and morphology (BANDULARATNE; BONGSO, 2002; CROSS; HANKS, 1991; MACK; ZANEVELD, 1987).

The protective role of seminal plasma over spermatozoa during the cryopreservation has been reported (BEN et al., 1997; GRIZARD et al., 1999; KOLON; PHILIPS; BUCH, 1992). The presence of an antioxidant system preventing the formation of ROS during cryopreservation, besides containing polyunsaturated fatty acids (ALVAREZ; STOREY, 1992; LEWIS et al., 1997; MARTÍNEZ-SOTO; LANDERAS; GADEA, 2013; SMITH et al., 1996) which increase the fluidity and resistance of plasma membrane lipoproteins at low temperatures, would improve the viability and cryostability of spermatozoa stabilizing mitochondrial membranes and heparin-binding proteins that prevent thermal shock and peroxidation (ISACHENKO et al., 2017; PALOMAR RIOS; MOLINA BOTELLA, 2017).

ROS production by either spermatozoa or seminal leukocytes increases during the freezing and thawing process. Cryopreservation decreases the antioxidant activity of the spermatozoa, making them more susceptible to ROS induced damage (GADEA et al., 2011; NAJAFI et al., 2016; NASHTAEI et al., 2017; WANG et al., 1997). One of the first manifestations of ROS induced damage is the oxidative attack on the sperm plasma membrane, causing lipid peroxidation, since the sperm membrane is high in polyunsaturated fatty acids, sterols, phosphatidylcholines and sphingomyelins (AITKEN; FISHER, 1994; ALVAREZ; STOREY, 1992; AMIDI et al., 2016; OEHNINGER et al., 2000). In this study, density gradient processing was effective in the removal of ROS when compared to washed, as it was previously demonstrated (MARCHETTI et

al., 2002; TAKESHIMA et al., 2017). This is the first study that evaluated the lipid peroxidation before and after different processing and cryopreservation, and the gradient samples presented lower oxidative damage. The cryopreservation did not increase ROS production or lipid peroxidation according to other authors (SCHUFFNER; MORSHEDI; OEHNINGER, 2001; WANG et al., 1997; WANG; SHARMA; AGARWAL, 1997). The lipid peroxidation in the washed group was significantly higher than in the traditional method. Possibly this finding was generated by centrifugation and removal of seminal plasma with consequent concentration of immotile, dead spermatozoa, in addition to leukocytes, bacteria and debris that cause lipid peroxidation to the spermatozoa (AITKEN; CLARKSON, 1988; ALVAREZ et al., 1993; IWASAKI; GAGNON, 1992; MORTIMER, 1991, 2000).

Several sperm organelles, including mitochondria and acrosome, are involved by membranes sensitive to cryopreservation. The acrosome structure is vulnerable to the physical and chemical effects of freezing and thawing processes. The partial removal of the outer acrosome membrane, acrosome disintegration and depletion of its contents are common alterations related to the cryopreservation (GÓMEZ-TORRES et al., 2017; HAMMADEH et al., 2001; LIU et al., 2018; MCLAUGHLIN, 1993; ROSSATO et al., 2000; WANG et al., 2014). This process induces an event known as cryocapacitation, in which plasma membrane is reorganized, increased intracellular Ca^{2+} concentration and phosphorylation of the protein tyrosine (GÓMEZ-TORRES et al., 2017; NARESH; ATREJA, 2015). Our results demonstrated that the acrosome was significantly affected by cryopreservation, regardless of the processing

performed, the density gradient, however, caused less damage to spermatozoa both fresh and after thawing. Esteves *et al.* (2000) have reported a higher percentage of spermatozoa with intact acrosomes in the cryopreserved samples with previous swim up use (ESTEVEZ *et al.*, 2000). Differences in acrosomal integrity between the traditional method of freezing and washed were not found, corroborating the results of two studies in which the presence of seminal plasma in the freezing did not interfere in the integrity of the acrosome (CROSS; HANKS, 1991; MACK; ZANEVELD, 1987). However, Barthelemy *et al.* (1990) found superiority in samples without seminal plasma (BARTHELEMY *et al.*, 1990). Plasma membrane lipid disorder was considered as a cryocapacitation marker, the density gradient selected cells with less lipid disorder both fresh and after thawing, compared to the other processes. It is important to notice that cryopreservation did not provoke lipidic disorder of the plasma membrane in the samples with seminal plasma, different from the cryopreserved samples after the processing. Future studies evaluating the impact of cryocapacitation on sperm survival and fertilization capacity would be relevant. Animal studies have shown that centrifugation and density gradient affect the spermatozoa's ability to respond to calcium and bicarbonate, making them more sensitive (HENNING; NGO; WABERSKI, 2015).

The mitochondrial potential was better in the gradient group, according to Ghaleno *et al.* and Marchetti *et al.* (GHALENO *et al.*, 2014; MARCHETTI *et al.*, 2002). This study presented that cryopreservation, regardless of the processing performed, harmed the mitochondrial function, Brugnon and the co-workers, however, found superiority when the samples were frozen with gradient prior

use (BRUGNON et al., 2013). Previous studies, where there was no prior processing, also found that freezing impaired mitochondrial function (HENRY et al., 1993; LI et al., 2010; NASHTAEI et al., 2017; PAASCH et al., 2004; PEDERSEN; LEBECH, 1971; WANG et al., 2014).

The role of different preparations on DNA integrity remains controversial, some studies do not report impacts of preparations techniques (OGUZ et al., 2018; ZINI et al., 2000) while other ones report an increase in DNA damage (GHALENO et al., 2014; PETYIM et al., 2014). In this study, the density gradient decreased the percentage of sperm with fragmented DNA corroborating results that show the efficiency of this process in selecting cells with DNA intact (BRAHEM et al., 2011; JAYARAMAN et al., 2012; MARCHETTI et al., 2002; ROUGIER et al., 2013; SAKKAS, 2000; XUE et al., 2014).

In our samples, cryopreservation did not damage sperm DNA, this can be explained by our results of ROS and lipid peroxidation, which also did not alter with cryopreservation, being the main cause of DNA fragmentation (THOMSON et al., 2009a). Other authors have reported that freezing/thawing processes do not increase the DNA fragmentation (DURU et al., 2001; PAASCH et al., 2004), and according to Thompson *et al.*, some samples showed decreased DNA fragmentation after thawing (THOMSON et al., 2009b). At the same time, there are results with increased DNA sperm fragmentation, especially in samples with altered seminal parameters (DE PAULA et al., 2006; GANDINI et al., 2006; KALTHUR et al., 2008; TORO et al., 2009; ZRIBI et al., 2010), in addition, the DNA of the thawed sperm would degrade faster than in fresh samples (GOSÁLVEZ et al., 2009, 2011). One possible hypothesis is that

due to the normality of our sample (normozoospermic patients) there were no significant injuries to the DNA.

The cryopreserved samples selected by the density gradient presented less damage when compared to the other groups, the result is similar to that one found before the freezing/thawing process. Our results showed that selected sperm, both mature and mobile, are more resistant to cryoinjury, according to other publications (BRUGNON et al., 2013; DONNELLY et al., 2001; FRAINAIS et al., 2010; PETYIM et al., 2014), divergent from Donnelly *et al.* who found better results when the sample is frozen with seminal plasma (DONNELLY; MCCLURE; LEWIS, 2001).

Normozoospermic samples, processed by the density gradient, presented significantly higher seminal parameters, oxidative stress and structural markers (acrosomal, mitochondrial and plasma membrane integrity). Cryopreservation affected seminal and integrity parameters, without any oxidative and DNA damage. The impact of cryopreservation was similar in all types of processing. Samples with better parameters previous to cryopreservation kept their superiority after the thawing. In the samples with normal seminal parameters, the cryopreservation with previous density gradient selection proved to be effective and may be a safe option for homologous freezing or sperm freezing bank.

ACKNOWLEDGMENTS

This work had financial support from Programa de Pós-graduação em Ciência da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia, UFRGS (PPGGO) and Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Ana Paula S. Kussler and Elisa Negri were scholarship recipient from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES.

REFERENCES

AITKEN, J.; FISHER, H. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. **BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology**, v. 16, n. 4, p. 259–267, 1994.

AITKEN, R. J. et al. Analysis of lipid peroxidation in human spermatozoa using BODIPY C11. **Molecular Human Reproduction**, v. 13, n. 4, p. 203–211, 2007.

AITKEN, R. J.; CLARKSON, J. S. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. **Journal of andrology**, v. 9, n. 6, p. 367–376, 1988.

ALLAMANENI, S. S. R. et al. Comparative study on density gradients and swim-up preparation techniques utilizing neat and cryopreserved spermatozoa. **Asian Journal of Andrology**, v. 7, n. 1, p. 86–92, 2005.

ALVAREZ, J. G. et al. Centrifugation of human spermatozoa induces sublethal damage; separation of human spermatozoa from seminal plasma by a dextran swim-up procedure without centrifugation extends their motile lifetime. **Human Reproduction**, v. 8, n. 7, p. 1087–1092, 1993.

ALVAREZ, J. G.; STOREY, B. T. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. **Journal of Andrology**, v. 13, n. 3, p. 232–241, 1992.

AMARAL, S. et al. UVB irradiation as a tool to assess ROS-induced damage in human spermatozoa. **Andrology**, v. 1, n. 5, p. 707–714, 2013.

AMIDI, F. et al. The role of antioxidants in sperm freezing: a review. **Cell and Tissue Banking**, v. 17, n. 4, p. 745–756, 2016.

ANGER, J. T.; GILBERT, B. R.; GOLDSTEIN, M. Cryopreservation of sperm: indications, methods and results. **The Journal of Urology**, v. 170, n. 4, p. 1079–1084, 2003.

BANDULARATNE, E.; BONGSO, A. Evaluation of human sperm function after repeated freezing and thawing. **Journal of Andrology**, v. 23, n. 2, p. 242–249, 2002.

BARTHELEMY, C. et al. Ultrastructural changes in membranes and acrosome of human sperm during cryopreservation. **Archives of Andrology**, v. 25, n. 1, p. 29–40, 1990.

BEN, W. X. et al. Effects of various concentrations of native seminal plasma in cryoprotectant on viability of human sperm. **Archives of Andrology**, v. 39, n. 3, p. 211–216, 1997.

BENSON, J. D. et al. The cryobiology of spermatozoa. **Theriogenology**, v. 78, n. 8, p. 1682–1699, 2012.

BRAHEM, S. et al. Semen processing by density gradient centrifugation is useful in selecting sperm with higher double-strand DNA integrity. **Andrologia**, v. 43, n. 3, p. 196–202, 2011.

BRUGNON, F. et al. Density gradient centrifugation prior to cryopreservation and hypotaurine supplementation improve post-thaw quality of sperm from infertile men with oligoasthenoteratozoospermia. **Human Reproduction**, v. 28, n. 8, p. 2045–2057, 2013.

COUNSEL, M.; BELLINGE, R.; BURTON, P. Vitality of oligozoospermic semen samples is improved by both swim-up and density gradient centrifugation before cryopreservation. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 21, n. 5, p. 137–142, 2004.

CROSS, N. L.; HANKS, S. E. Effects of cryopreservation on human sperm acrosomes. **Human Reproduction**, v. 6, n. 9, p. 1279–1283, 1991.

D'CRUZ, O. J.; HAAS, G. G. Fluorescence-labeled fucolectins are superior markers for flow cytometric quantitation of the human sperm acrosome reaction. **Fertility and Sterility**, v. 65, n. 4, p. 843–851, 1996.

DE PAULA, T. S. et al. Effect of cryopreservation on sperm apoptotic deoxyribonucleic acid fragmentation in patients with oligozoospermia. **Fertility and Sterility**, v. 86, n. 3, p. 597–600, 2006.

DI SANTO, M. et al. Human sperm cryopreservation: Update on techniques, effect on DNA integrity, and implications for ART. **Advances in Urology**, v. 2012, 2012.

DONNELLY, E. T. et al. Assessment of DNA integrity and morphology of ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men before and after cryopreservation. **Human Reproduction**, v. 16, n. 6, p. 1191–1199, 2001.

DONNELLY, E. T.; MCCLURE, N.; LEWIS, S. E. M. Cryopreservation of human semen and prepared sperm: Effects on motility parameters and DNA integrity. **Fertility and Sterility**, v. 76, n. 5, p. 892–900, 2001.

DURU, N. K. et al. Cryopreservation-thawing of fractionated human spermatozoa is associated with membrane phosphatidylserine externalization and not DNA fragmentation. **Journal of Andrology**, v. 22, n. 4, p. 646–651, 2001.

ESTEVEZ, S. C. et al. Improvement in motion characteristics and acrosome status in cryopreserved human spermatozoa by swim-up processing before freezing. **Human Reproduction**, v. 15, n. 10, p. 2173–2179, 2000.

FABOZZI, G. et al. Evaluation of the Efficiency of Two Different Freezing Media and Two Different Protocols to Preserve Human Spermatozoa from Cryoinjury. **International Journal of Reproductive Medicine**, v. 2016, p. 1–6, 2016.

FRAINAI, C. et al. Impact of freezing/thawing technique on sperm DNA integrity in HIV-1 patients. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 27, n. 7, p. 415–421, 2010.

GADEA, J. et al. Reduced glutathione content in human sperm is decreased after cryopreservation: effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. **Cryobiology**, v. 62, n. 1, p. 40–46, 2011.

GANDINI, L. et al. Cryopreservation and sperm DNA integrity. **Cell and Tissue Banking**, v. 7, n. 2, p. 91–98, 2006.

GHALENO, L. R. et al. Evaluation of conventional semen parameters, intracellular reactive oxygen species, DNA fragmentation and dysfunction of mitochondrial membrane potential after semen preparation techniques: A flow cytometric study. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 289, n. 1, p.

173–180, 2014.

GÓMEZ-TORRES, M. J. et al. Effectiveness of human spermatozoa biomarkers as indicators of structural damage during cryopreservation. **Cryobiology**, v. 78, p. 90–94, 2017.

GOSÁLVEZ, J. et al. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation dynamics in fertile donors. **Fertility and Sterility**, v. 92, n. 1, p. 170–173, 2009.

GOSÁLVEZ, J. et al. Dynamics of sperm DNA damage in fresh versus frozen-thawed and gradient processed ejaculates in human donors. **Andrologia**, v. 43, n. 6, p. 373–377, 2011.

GRIZARD, G. et al. Influence of seminal plasma on cryopreservation of human spermatozoa in a biological material-free medium: study of normal and low-quality semen. **International Journal of Andrology**, v. 22, n. 3, p. 190–196, 1999.

HAMMADEH, M. E. et al. Association between freezing agent and acrosome damage of human spermatozoa from subnormal and normal semen. **Andrologia**, v. 33, n. 6, p. 331–336, 2001.

HENNING, H.; NGO, T. T.; WABERSKI, D. Centrifugation stress reduces the responsiveness of spermatozoa to a capacitation stimulus in in vitro-aged semen. **Andrology**, v. 3, n. 5, p. 834–842, 2015.

HENRY, M. A. et al. Cryopreservation of human spermatozoa. IV. The effects of cooling rate and warming rate on the maintenance of motility, plasma membrane integrity, and mitochondrial function. **Fertility and Sterility**, v. 60, n. 5, p. 911–918, 1993.

ISACHENKO, V. et al. Technologies of cryoprotectant-free vitrification of human spermatozoa: asepticity as criterion of effectiveness. **Andrology**, v. 5, n. 6, p. 1055–1063, 2017.

IWASAKI, A.; GAGNON, C. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. **Fertility and Sterility**, v. 57, n. 2, p. 409–416, 1992.

JAYARAMAN, V. et al. Sperm processing by swim-up and density gradient is effective in elimination of sperm with DNA damage. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 29, n. 6, p. 557–563, 2012.

KALTHUR, G. et al. Effect of cryopreservation on sperm DNA integrity in patients with teratospermia. **Fertility and Sterility**, v. 89, n. 6, p. 1723–1727, 2008.

KOBAYASHI, T. et al. Concentrating human sperm before cryopreservation. **Andrologia**, v. 23, n. 1, p. 25–28, 1991.

KOLON, T. F.; PHILIPS, K. A.; BUCH, J. P. Custom cryopreservation of human semen. **Fertility and sterility**, v. 58, n. 5, p. 1020–1023, 1992.

KOPPERS, A. J. et al. Significance of Mitochondrial Reactive Oxygen Species in the Generation of Oxidative Stress in Spermatozoa. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 93, n. 8, p. 3199–3207, 2008.

LARSON, J. M. et al. An intrauterine insemination-ready cryopreservation method compared with sperm recovery after conventional freezing and post-thaw processing. **Fertility and Sterility**, v. 68, n. 1, p. 143–148, 1997.

LEWIS, S. E. M. et al. Comparison of individual antioxidants of sperm and

seminal plasma in fertile and infertile men. **Fertility and Sterility**, v. 67, n. 1, p. 142–147, 1997.

LI, Z. et al. Protective effects of ascorbate and catalase on human spermatozoa during cryopreservation. **Journal of Andrology**, v. 31, n. 5, p. 437–444, 2010.

LIU, J. et al. Supplementation of cryopreservation medium with TAT-Peroxiredoxin 2 fusion protein improves human sperm quality and function. **Fertility and Sterility**, v. 110, n. 6, p. 1058–1066, 2018.

MACK, S. R.; ZANEVELD, L. J. D. Acrosomal enzymes and ultrastructure of unfrozen and cryotreated human spermatozoa. **Gamete Research**, v. 18, n. 4, p. 375–383, 1987.

MAHFOUZ, R. et al. Evaluation of chemiluminescence and flow cytometry as tools in assessing production of hydrogen peroxide and superoxide anion in human spermatozoa. **Fertility and Sterility**, v. 92, n. 2, p. 819–827, 2009.

MARCHETTI, C. et al. Study of mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species, DNA fragmentation and cell viability by flow cytometry in human sperm. **Human Reproduction**, v. 17, n. 5, p. 1257–1265, 2002.

MARTINEZ-SOTO, J. C. et al. Effect of genistein supplementation of thawing medium on characteristics of frozen human spermatozoa. **Asian Journal of Andrology**, v. 12, n. 3, p. 431–441, 2010.

MARTÍNEZ-SOTO, J. C.; LANDERAS, J.; GADEA, J. Spermatozoa and seminal plasma fatty acids as predictors of cryopreservation success. **Andrology**, v. 1, n. 3, p. 365–375, 2013.

MCLAUGHLIN, E. A. et al. Effects of cryopreservation on the human sperm acrosome and its response to A23187. **Journal of Reproduction and Fertility**,

v. 99, n. 1, p. 71–76, 1993.

MORSHEDI, M. et al. Comparison of various preparation methods for the use of cryopreserved-thawed spermatozoa in insemination therapy. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 18, n. 10, p. 575–577, 2001.

MORTIMER, D. Sperm preparation techniques and iatrogenic failures of in-vitro fertilization. **Human Reproduction**, v. 6, n. 2, p. 173–176, 1991.

MORTIMER, D. Sperm Preparation Methods. **Journal of Andrology**, v. 21, n. 3, p. 357–366, 2000.

MORTIMER, D. Current and future concepts and practices in human sperm cryobanking. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 9, n. 2, p. 134–151, 2004.

MOUBASHER, A. E. et al. Catalase improves motility, vitality and DNA integrity of cryopreserved human spermatozoa. **Andrologia**, v. 45, n. 2, p. 135–139, 2013.

NAJAFI, A. et al. Supplementation of freezing and thawing media with brain-derived neurotrophic factor protects human sperm from freeze-thaw-induced damage. **Fertility and Sterility**, v. 106, n. 7, p. 1658–1665.e4, 2016.

NARESH, S.; ATREJA, S. K. The protein tyrosine phosphorylation during in vitro capacitation and cryopreservation of mammalian spermatozoa. **Cryobiology**, v. 70, n. 3, p. 211–216, 2015.

NASHTAEI, M. S. et al. Protective features of resveratrol on human spermatozoa cryopreservation may be mediated through 5' AMP-activated protein kinase activation. **Andrology**, v. 5, n. 2, p. 1–14, 2017.

O'CONNELL, M.; MCCLURE, N.; LEWIS, S. E. M. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. **Human Reproduction**, v. 17, n. 3, p. 704–709, 2002.

OEHNINGER, S. et al. Assessment of sperm cryodamage and strategies to improve outcome. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 169, n. 1–2, p. 3–10, 2000.

OGUZ, Y. et al. The effect of swim-up and gradient sperm preparation techniques on deoxyribonucleic acid (DNA) fragmentation in subfertile patients. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 35, n. 6, p. 1083–1089, 2018.

PAASCH, U. et al. Cryopreservation and thawing is associated with varying extent of activation of apoptotic machinery in subsets of ejaculated human spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 71, n. 6, p. 1828–1837, 2004.

PALOMAR RIOS, A. et al. Sperm preparation after freezing improves motile sperm count, motility, and viability in frozen-thawed sperm compared with sperm preparation before freezing-thawing process. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 35, n. 2, p. 237–245, 2018.

PALOMAR RIOS, A.; MOLINA BOTELLA, I. Sperm parameters that play a major role in the assessment of semen quality after cryopreservation. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 34, n. 10, p. 1271–1276, 2017.

PAOLI, D. et al. Sperm Cryopreservation: effects on Chromatin Structure. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 791, p. 137–150, 2014.

PEDERSEN, H.; LEBECH, P. E. Ultrastructural changes in the human

spermatozoon after freezing for artificial insemination. **Fertility and Sterility**, v. 22, n. 2, p. 125–133, 1971.

PÉREZ-SÁNCHEZ, F. et al. Improvement in quality of cryopreserved human spermatozoa by swim-up before freezing. **International Journal of Andrology**, v. 17, n. 3, p. 115–120, 1994.

PETRUNKINA, A. M. Fundamental aspects of gamete cryobiology. **Journal für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie**, v. 4, n. 2, p. 78–91, 2007.

PETYIM, S. et al. Sperm preparation before freezing improves sperm motility and reduces apoptosis in post-freezing-thawing sperm compared with post-thawing sperm preparation. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 31, n. 12, p. 1673–1680, 2014.

ROSSATO, M. et al. Effects of cryopreservation on progesterone-induced ion fluxes and acrosome reaction in human spermatozoa. **Human Reproduction**, v. 15, n. 8, p. 1739–1743, 2000.

ROUGIER, N. et al. Changes in DNA fragmentation during sperm preparation for intracytoplasmic sperm injection over time. **Fertility and Sterility**, v. 100, n. 1, p. 69–74, 2013.

SAID, T. M.; GAGLANI, A.; AGARWAL, A. Implication of apoptosis in sperm cryoinjury. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 21, n. 4, p. 456–462, 2010.

SAKKAS, D. The use of two density gradient centrifugation techniques and the swim-up method to separate spermatozoa with chromatin and nuclear DNA anomalies. **Human Reproduction**, v. 15, n. 5, p. 1112–1116, 2000.

SARITHA, K. R.; BONGSO, A. Comparative evaluation of fresh and washed

human sperm cryopreserved in vapor and liquid phases of liquid nitrogen. **Journal of Andrology**, v. 22, n. 5, p. 857–862, 2001.

SCHUFFNER, A; MORSHEDI, M.; OEHNINGER, S. Cryopreservation of fractionated, highly motile human spermatozoa: effect on membrane phosphatidylserine externalization and lipid peroxidation. **Human Reproduction**, v. 16, n. 10, p. 2148–2153, 2001.

SHARMA, R. K.; AGARWAL, A. Sperm quality improvement in cryopreserved human semen. **The Journal of Urology**, v. 156, n. 3, p. 1008–1012, 1996.

SMITH, R. et al. Total antioxidant capacity of human seminal plasma. **Human Reproduction**, v. 11, n. 8, p. 1655–1660, 1996.

SPANÒ, M. et al. Nuclear chromatin variations in human spermatozoa undergoing swim-up and cryopreservation evaluated by the flow cytometric sperm chromatin structure assay. **Molecular Human Reproduction**, v. 5, n. 1, p. 29–37, 1999.

TAKESHIMA, T. et al. Effect of density gradient centrifugation on reactive oxygen species in human semen. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, v. 63, n. 3, p. 192–198, 2017.

TAYLOR, K. et al. Effect of antioxidant supplementation of cryopreservation medium on post-thaw integrity of human spermatozoa. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 18, n. 2, p. 184–189, 2009.

THOMSON, L. K. et al. Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. **Human Reproduction**, v. 24, n. 9, p. 2061–2070, 2009a.

THOMSON, L. K. et al. The DNA integrity of cryopreserved spermatozoa

separated for use in assisted reproductive technology is unaffected by the type of cryoprotectant used but is related to the DNA integrity of the fresh separated preparation. **Fertility and Sterility**, v. 92, n. 3, p. 991–1001, 2009b.

TORO, E. et al. Processing of semen can result in increased sperm DNA fragmentation. **Fertility and Sterility**, v. 92, n. 6, p. 2109–2112, 2009.

WANG, A. W. et al. Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation. **Urology**, v. 49, n. 6, p. 921–925, 1997.

WANG, S. et al. Proteomic characteristics of human sperm cryopreservation. **Proteomics**, v. 14, n. 2–3, p. 298–310, 2014.

WANG, Y.; SHARMA, R. K.; AGARWAL, A. Effect of cryopreservation and sperm concentration on lipid peroxidation in human semen. **Urology**, v. 50, n. 3, p. 409–413, 1997.

WOLF, D. P. et al. Intrauterine insemination-ready versus conventional semen cryopreservation for donor insemination: a comparison of retrospective results and a prospective, randomized trial. **Fertility and Sterility**, v. 76, n. 1, p. 181–185, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen**. 5th. ed. Geneva: World Health Organization, 2010.

XUE, X. et al. Efficacy of swim-up versus density gradient centrifugation in improving sperm deformity rate and DNA fragmentation index in semen samples from teratozoospermic patients. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 31, n. 9, p. 1161–1166, 2014.

YOGEV, L. et al. Pre-freezing sperm preparation does not impair thawed spermatozoa binding to the zona pellucida. **Human Reproduction**, v. 14, n. 1, p. 114–117, 1999.

ZINI, A. et al. Influence of semen processing technique on human sperm DNA integrity. **Urology**, v. 56, n. 6, p. 1081–1084, 2000.

ZRIBI, N. et al. Effects of cryopreservation on human sperm deoxyribonucleic acid integrity. **Fertility and Sterility**, v. 93, n. 1, p. 159–166, 2010.

Table 1 – Seminal Characteristics (mean ± standard deviation)

| Seminal characteristics | Raw |
|---|----------------|
| Days of abstinence | 3,96 ± 1,03 |
| pH | 7,8 ± 0 |
| Volume (ml) | 3,85 ± 1,43 |
| Sperm concentration (x 10 ⁶ /ml) | 55,61 ± 19,56 |
| Total sperm number (x 10 ⁶) | 206,94 ± 87,75 |
| Progressive motility (a+b) (%) | 46,41 ± 5,78 |
| Total sperm motility (a+b+c) (%) | 60,46 ± 5,72 |
| Imotility (d) (%) | 39,57 ± 5,72 |
| PMSC (x 10 ⁶) | 95,72 ± 44,32 |
| TMSC (x 10 ⁶) | 122,82 ± 63,52 |
| Live sperm (%) | 68,38 ± 5,45 |
| Normal sperm morphology (%) | 14,88 ± 3,91 |

PMSC progressive motile sperm count, TMSC Total motile sperm count.

Table 2 – Effect of sperm selection protocols and cryopreservation on seminal characteristics

| Parameters | Raw | Washed | Density Gradient | Effects (p) | | |
|---|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------|------------------|-------------------------------|
| | Mean ± SEM | Mean ± SEM | Mean ± SEM | Processing | Cryopreservation | Processing x Cryopreservation |
| Sperm concentration (x 10 ⁶ /ml) | | | | <0,001 | <0,001 | 0,164 |
| Fresh | 55,61 ± 3,76 ^c | 48,08 ± 3,48 ^b | 37,73 ± 2,19 ^a | | | |
| Frozen-thawed | 46,28 ± 3,48 ^c | 41,98 ± 3,14 ^b | 31,63 ± 3,14 ^a | | | |
| Difference (IC95%) | 9,33 (2,35 a 16,32) | 6,09 (1,15 a 11,03) | 6,09 (-0,47 a 12,66) | | | |
| P | 0,001 | 0,004 | 0,097 | | | |
| Progressive motility (a+b) (%) | | | | <0,001 | <0,001 | <0,001 |
| Fresh | 46,42 ± 1,11 ^a | 45,07 ± 1,04 ^a | 60,69 ± 1,04 ^b | | | |
| Frozen-thawed | 22,11 ± 1,48 ^a | 22,69 ± 1,57 ^a | 31,30 ± 1,47 ^b | | | |
| Difference (IC95%) | 24,30 (19,57 a 29,94) | 22,38 (19,97 a 27,79) | 29,38 (24,12 a 34,64) | | | |
| P | <0,001 | <0,001 | <0,001 | | | |
| Total motility (a+b+c) (%) | | | | <0,001 | <0,001 | <0,001 |
| Fresh | 60,46 ± 1,10 ^b | 56,26 ± 1,13 ^a | 73,50 ± 1,19 ^c | | | |
| Frozen-thawed | 32,76 ± 1,67 ^a | 32,53 ± 1,89 ^a | 41,26 ± 1,57 ^b | | | |
| Difference (IC95%) | 27,69 (23,16 a 32,22) | 23,73 (18,36 a 29,10) | 32,23 (26,79 a 37,66) | | | |
| P | <0,001 | <0,001 | <0,001 | | | |
| Non- progressive motility (%) | | | | <0,001 | 0,002 | 0,001 |
| Fresh | 14,03 ± 0,85 ^b | 11,19 ± 0,80 ^a | 12,73 ± 0,87 ^{a,b} | | | |
| Frozen-thawed | 10,69 ± 0,47 ^a | 9,88 ± 0,56 ^a | 9,96 ± 0,55 ^a | | | |
| Difference (IC95%) | 3,34 (0,70 a 5,98) | 1,30 (-1,38 a 3,99) | 2,76 (0,007 a 5,53) | | | |
| P | 0,003 | 1,0 | 0,049 | | | |
| Immotility (%) | | | | <0,001 | <0,001 | <0,001 |
| Fresh | 39,57 ± 1,10 ^b | 43,76 ± 1,14 ^c | 26,50 ± 1,19 ^a | | | |
| Frozen-thawed | 67,19 ± 1,68 ^b | 67,30 ± 1,94 ^b | 58,80 ± 1,52 ^a | | | |
| Difference (IC95%) | -27,61 (-23,03 a -32,19) | -23,53 (-18,06 a -29,01) | -32,30 (-27,00 a -37,61) | | | |
| P | <0,001 | <0,001 | <0,001 | | | |

^{a,b,c} Equivalent letters do not differ by the Bonferroni test at 5% significance

Tabela 3 – Effect of sperm selection protocols and cryopreservation on concentration of motile spermatozoa, PMSC, TMSC, vitality and normal morphology

| Parameters | Raw | Washed | Density Gradient | Effects (valor-p) | | |
|--|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------|------------------|-------------------------------|
| | Mean ± SEM | Mean ± SEM | Mean ± SEM | Processing | Cryopreservation | Processing x Cryopreservation |
| Progressive motile sperm concentration (x 10 ⁶ /ml) | | | | 0,001 | <0,001 | 0,013 |
| Fresh | 25,71 ± 1,97 ^b | 21,62 ± 1,61 ^a | 22,95 ± 1,45 ^{a,b} | | | |
| Frozen-thawed | 11,14 ± 1,39 ^a | 10,27 ± 1,21 ^a | 10,60 ± 1,36 ^a | | | |
| Difference (IC95%) | 14,57 | 11,34 | 12,35 | | | |
| P | (9,97 a 19,16) | (8,25 a 14,44) | (8,70 a 15,99) | | | |
| P | <0,001 | <0,001 | <0,001 | | | |
| Total motile sperm concentration (x 10 ⁶ /ml) | | | | <0,001 | <0,001 | <0,001 |
| Fresh | 34,12 ± 2,67 ^b | 27,27 ± 2,18 ^a | 27,85 ± 1,78 ^a | | | |
| Frozen-thawed | 16,19 ± 1,81 ^b | 14,71 ± 1,69 ^{a,b} | 13,85 ± 1,73 ^a | | | |
| Difference (IC95%) | 17,92 | 12,56 | 13,99 | | | |
| P | (12,37 a 23,48) | (9,04 a 16,07) | (9,72 a 18,26) | | | |
| P | <0,001 | <0,001 | <0,001 | | | |
| PMSC (x 10 ⁶ /ml) | | | | <0,001 | <0,001 | <0,001 |
| Fresh | 95,72 ± 8,52 ^b | 16,44 ± 1,17 ^a | 17,21 ± 1,09 ^a | | | |
| Frozen-thawed | 5,56 ± 0,69 ^a | 5,13 ± 0,60 ^a | 5,29 ± 0,68 ^a | | | |
| Difference (IC95%) | 90,15 | 11,31 | 11,91 | | | |
| P | (65,71 a 114,58) | (8,83 a 13,78) | (9,38 a 14,44) | | | |
| P | <0,001 | <0,001 | <0,001 | | | |
| TMSC (x 10 ⁶ /ml) | | | | <0,001 | <0,001 | <0,001 |
| Fresh | 122,82 ± 12,21 ^b | 20,75 ± 1,60 ^a | 20,89 ± 1,33 ^a | | | |
| Frozen-thawed | 8,09 ± 0,90 ^b | 7,35 ± 0,84 ^{a,b} | 6,94 ± 0,86 ^a | | | |
| Difference (IC95%) | 114,73 | 13,40 | 13,94 | | | |
| P | (79,89 a 149,56) | (10,36 a 16,44) | (11,00 a 16,87) | | | |
| P | <0,001 | <0,001 | <0,001 | | | |
| Live Sperm (%) | | | | <0,001 | <0,001 | <0,001 |
| Fresh | 68,38 ± 1,04 ^b | 62,00 ± 1,14 ^a | 77,50 ± 1,02 ^c | | | |
| Frozen-thawed | 39,61 ± 1,65 ^a | 38,00 ± 1,93 ^a | 44,23 ± 1,63 ^b | | | |
| Difference (IC95%) | 28,76 | 24,00 | 33,26 | | | |
| P | (24,68 a 32,85) | (19,44 a 28,55) | (28,76 a 37,77) | | | |
| P | <0,001 | <0,001 | <0,001 | | | |
| Normal Morphology (%) | | | | <0,001 | <0,001 | <0,001 |

| | | | |
|--------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Fresh | 14,88 ± 0,75 ^a | 14,30 ± 0,77 ^a | 20,50 ± 0,84 ^b |
| Frozen-thawed | 11,65 ± 0,44 ^a | 11,53 ± 0,48 ^a | 15,88 ± 0,61 ^b |
| Difference (IC95%) | 3,23 (1,23 a 5,22) | 2,76 (0,72 a 4,81) | 4,61 (1,87 a 7,35) |
| P | <0,001 | 0,001 | <0,001 |

^{a,b,c} Letras iguais não diferem pelo teste de Bonferroni a 5% de significância

Table 4 – Motility recovery, motile sperm concentration, vitality and morphology rate

^{a,b,c} Equivalent letters do not differ by the Bonferroni test at 5% significance

| Parameters | Raw | Washed | Density Gradient | Effects (p) |
|--|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------|
| | Mean ± SEM | Mean ± SEM | Mean ± SEM | |
| Progressive motility recovery rate (%) | | | | Processing 0,060 |
| | 47,87 ± 3,24 ^a | 50,85 ± 3,68 ^a | 52,08 ± 2,58 ^a | |
| Total motility recovery rate (%) | | | | 0,085 |
| | 53,99 ± 2,55 ^a | 57,71 ± 3,07 ^a | 56,41 ± 2,26 ^a | |
| Progressive motile sperm concentration recovery rate (%) | | | | 0,659 |
| | 43,26 ± 4,40 ^a | 45,51 ± 3,62 ^a | 44,71 ± 4,23 ^a | |
| Total motile sperm concentration recovery rate (%) | | | | 0,228 |
| | 47,43 ± 4,05 ^a | 51,60 ± 3,48 ^a | 48,30 ± 4,35 ^a | |
| Vitality recovery rate (%) | | | | 0,021 |
| | 58,33 ± 2,05 ^{a,b} | 60,93 ± 2,78 ^b | 57,06 ± 1,98 ^a | |
| Morphology recovery rate (%) | | | | 0,020 |
| | 80,63 ± 3,27 ^{a,b} | 82,74 ± 3,52 ^b | 79,26 ± 3,66 ^a | |

Table 5 – Effect of sperm selection protocols and cryopreservation on morphological changes

| Parameters | Raw | Washed | Density Gradient | Effects (p) | | |
|--------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------|------------------|-------------------------------|
| | Mean ± SEM | Mean ± SEM | Mean ± SEM | Processing | Cryopreservation | Processing x Cryopreservation |
| Macrocephalous | | | | | | |
| Fresh | 4,00 ± 0,56 ^a | 3,73 ± 0,55 ^a | 4,88 ± 0,69 ^b | | | |
| Frozen-thawed | 8,92 ± 1,09 ^a | 9,30 ± 1,09 ^a | 9,26 ± 1,06 ^a | | | |
| Difference (IC95%) | -4,92 (-2,50 a -7,34) | -5,57 (-3,34 a -7,80) | -4,38 (-2,20 a -6,56) | <0,001 | <0,001 | 0,001 |
| P | <0,001 | <0,001 | <0,001 | | | |
| Short Tail | | | | | | |
| Fresh | 1,76 ± 0,19 ^a | 3,73 ± 0,39 ^b | 3,92 ± 0,36 ^b | | | |
| Frozen-thawed | 3,65 ± 0,32 ^a | 3,69 ± 0,30 ^a | 3,69 ± 0,32 ^a | | | |
| Difference (IC95%) | -1,88 (-0,88 a -2,88) | 0,038 (-0,89 a 0,97) | 0,23 (-0,64 a 1,11) | <0,001 | 0,001 | <0,001 |
| P | <0,001 | 1,00 | 1,00 | | | |
| Bent tail | | | | | | |
| Fresh | 3,26 ± 0,30 ^a | 5,69 ± 0,36 ^c | 4,80 ± 0,29 ^b | | | |
| Frozen-thawed | 9,26 ± 0,49 ^a | 9,19 ± 0,44 ^a | 9,61 ± 0,45 ^a | | | |
| Difference (IC95%) | -6,00 (-4,33 a -7,66) | -3,50 (-2,03 a -4,96) | -4,80 (-3,21 a -6,40) | <0,001 | <0,001 | <0,001 |
| P | <0,001 | <0,001 | <0,001 | | | |
| Coiled tail | | | | | | |
| Fresh | 7,03 ± 0,83 ^{a,b} | 8,34 ± 0,92 ^b | 5,61 ± 1,02 ^a | | | |
| Frozen-thawed | 16,19 ± 1,18 ^a | 17,34 ± 1,42 ^a | 15,30 ± 1,32 ^a | | | |
| Difference (IC95%) | -9,15 (-6,26 a -12,04) | -9,00 (-6,02 a -11,97) | -9,69 (-6,68 a -12,69) | 0,001 | <0,001 | 0,121 |
| P | <0,001 | <0,001 | <0,001 | | | |

^{a,b,c} Equivalent letters do not differ by the Bonferroni test at 5% significance

Figure 1

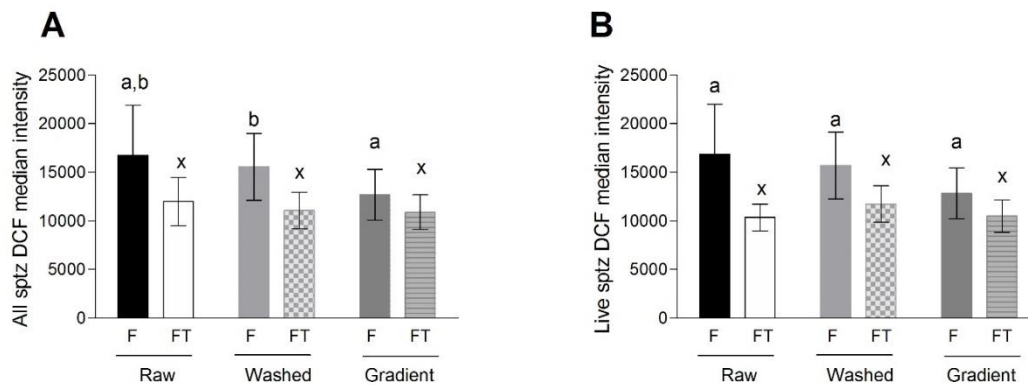


Figure 1 - Effect of different sperm selection techniques used before semen cryopreservation on production of reactive oxygen species assessed by flow cytometry using DCF probe. A - DCF fluorescence intensity of spermatozoa regardless PI staining. B - DCF fluorescence intensity of live spermatozoa (not stained with PI). Letters a, b denote difference between fresh (F) samples ($p < 0.01$). Letter x denote difference between frozen-thawed (FT) samples ($p < 0.01$). Data presented as mean \pm SEM.

Figure 2

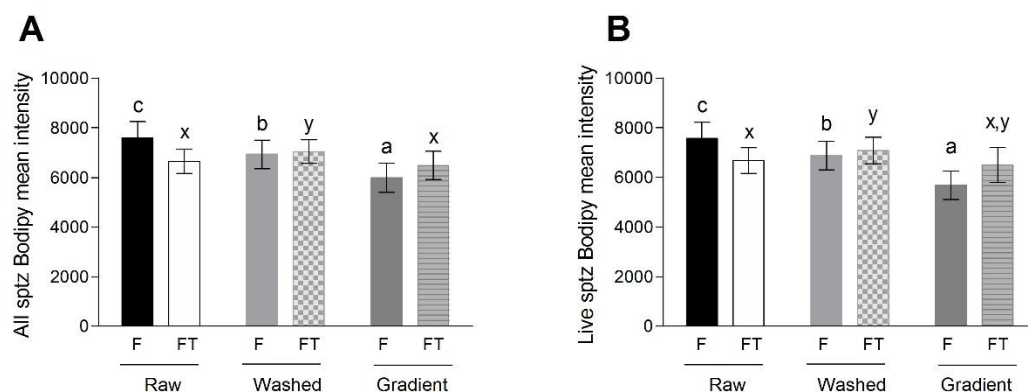


Figure 2 - Effect of different sperm selection techniques used before semen cryopreservation on sperm membrane lipoperoxidation assessed by flow cytometry using Bodipy probe. A - Bodipy fluorescence intensity of spermatozoa regardless PI staining. B - Bodipy fluorescence intensity of live spermatozoa (not stained with PI). Letters a, b, c denote difference between

fresh (F) samples ($p < 0.01$). Letters x, y, z denote difference between frozen-thawed (FT) samples ($p < 0.01$). Data presented as mean \pm SEM.

Figure 3

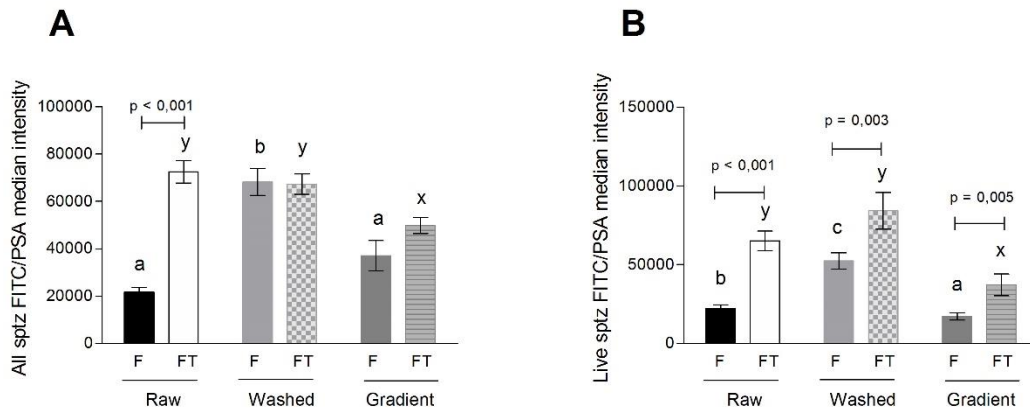


Figure 3 - Effect of different sperm selection techniques used before semen cryopreservation on acrosome damage assessed by flow cytometry using FITC/PSA probe. A - FITC/PSA fluorescence intensity of spermatozoa regardless PI staining. B - FITC/PSA fluorescence intensity of live spermatozoa (not stained with PI). Letters a, b, c denote difference between fresh (F) samples ($p < 0.01$). Letters x, y denote difference between frozen-thawed (FT) samples ($p < 0.01$). Data presented as mean \pm SEM.

Figure 4

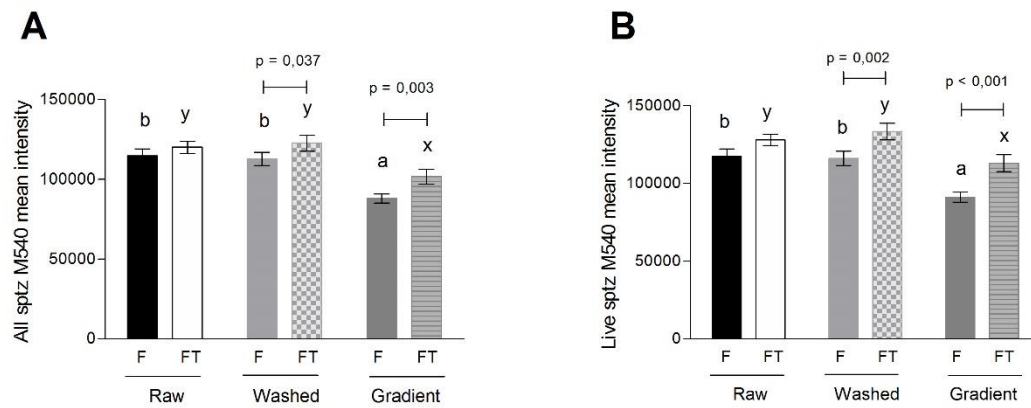


Figure 4 - Effect of different sperm selection techniques used before semen cryopreservation on destabilization of the plasma membrane assessed by flow cytometry using M540 probe. A - M540 fluorescence intensity of spermatozoa regardless YoPro staining. B - M540 fluorescence intensity of live spermatozoa (not stained with YoPro). Letters a, b denote difference between fresh (F) samples ($p < 0.01$). Letters x, y denote difference between frozen-thawed (FT) samples ($p < 0.01$). Data presented as mean \pm SEM.

Figure 5

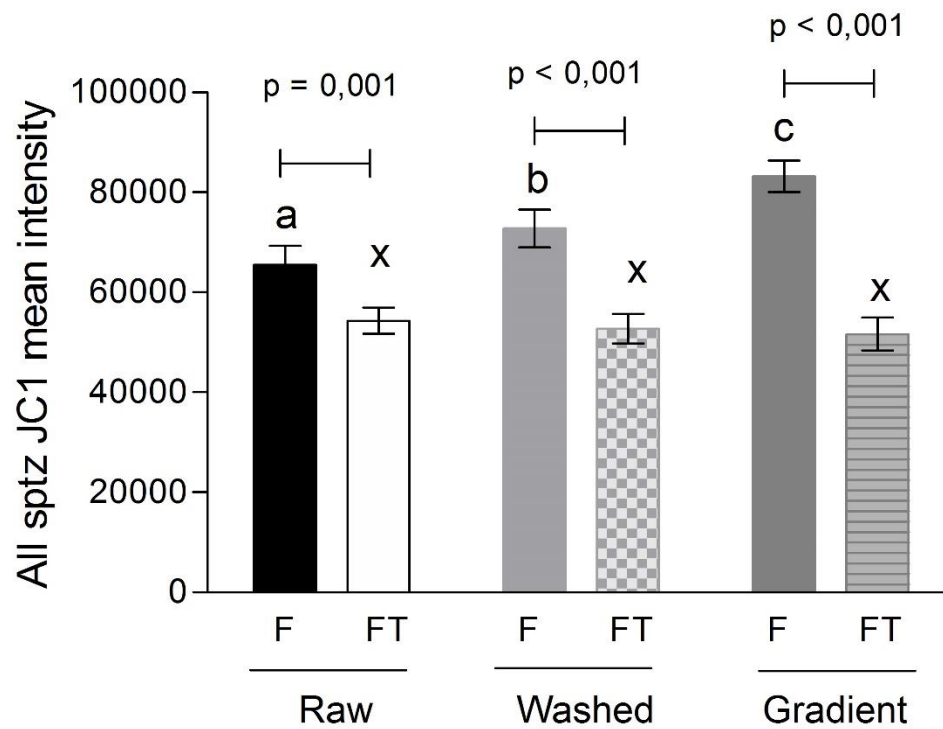


Figure 5 - Effect of different sperm selection techniques used before semen cryopreservation on potential of the mitochondrial membrane assessed by flow cytometry using JC1 probe. Letters a, b, c denote difference between fresh (F) samples ($p < 0.01$). Letter x denote difference between frozen-thawed (FT) samples ($p < 0.01$). Data presented as mean \pm SEM.

Figure 6

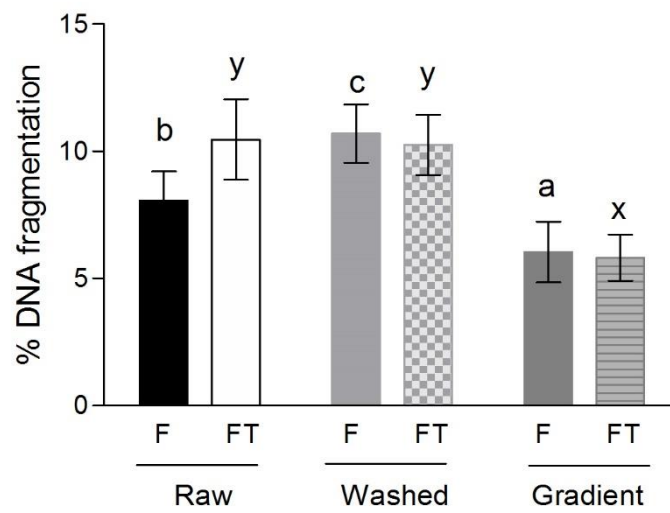


Figure 6 - Effect of different sperm selection techniques used before semen cryopreservation on DNA fragmentation assessed by flow cytometry using TUNEL. Letters a, b, c denote difference between fresh (F) samples ($p < 0.01$). Letters x, y denote difference between frozen-thawed (FT) samples ($p < 0.01$). Data presented as mean \pm SEM.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho analisou pela primeira vez 3 métodos de processamento do sêmen antes e após o congelamento em amostras de pacientes normozoospermicos avaliando diferentes marcadores de estresse oxidativo e danos estruturais. Nossos resultados corroboram estudos não tão bem controlados. As técnicas de seleção espermática são utilizadas de forma rotineira, com o objetivo de selecionar os melhores espermatozoides para as técnicas de reprodução assistida. Ao avaliar os efeitos das técnicas sobre a população de espermatozoides selecionados, de modo geral, o gradiente de densidade foi capaz de isolar efetivamente espermatozoides maduros de qualidade e de remover células potencialmente danosas, o que não foi observado após a realização do lavado da amostra. A criopreservação, não causou aumento do dano oxidativo e ao DNA. Provavelmente as mudanças geradas nos espermatozoides, são devido ao processo de resfriamento, congelamento e descongelamento em si, como o choque térmico, a formação de cristais de gelo intra e extracelulares, a toxicidade química dos crioprotetores, a desidratação celular e o estresse osmótico. Ainda que os danos provocados pelo congelamento/descongelamento, tenham ocorrido independente do processamento realizado, as amostras submetidas a seleção pelo gradiente de densidade demonstraram, na maioria dos parâmetros analisados, superioridade sugerindo que em pacientes com parâmetros seminais normais, o congelamento com plasma seminal não seja essencial, reforçando que o gradiente pode ser utilizado na rotina clínica previamente a criopreservação. Como as taxas de recuperação após o descongelamento

foram semelhantes entre os processamentos, é plausível que os espermatozoides recuperados após o gradiente de densidade apresentem parâmetros melhores após o descongelamento porque estes eram superiores antes da criopreservação.

PERSPECTIVAS

Acreditamos que as conclusões deste estudo não podem ser estendidas para pacientes com parâmetros seminais alterados, permanecendo a dúvida de qual método de processamento seria o ideal em pacientes com parâmetros comprometidos. Futuramente, estudos avaliando o processamento após a criopreservação, incluindo outros marcadores para a criocapacitação, como a fosforilação da tirosina seriam interessantes.

ANEXOS

Anexo 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PACIENTES)

Nº do projeto GPPG ou CAAE: 17-0314

Título do Projeto: Comparação de Diferentes Métodos de Processamento de Sêmen antes do Congelamento através de Avaliações Funcionais do Espermatozoide

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa cujo objetivo é analisar e comparar 3 (três) técnicas de congelamento de sêmen. Além disso, vamos realizar testes específicos para avaliar a função, a integridade e a estrutura do espermatozoide. Esta pesquisa está sendo realizada pelo Serviço de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

O senhor, que já possui indicação assistencial para realização do espermograma, se aceitar participar da pesquisa, os procedimentos envolvidos em sua participação são os seguintes: O senhor irá coletar a amostra de sêmen por masturbação, com uma abstinência sexual de 2 a 7 dias, conforme já indicado pelo seu médico. A coleta será realizada na Clínica Gerar, em um local reservado, onde você permanecerá sozinho. Para a realização do espermograma, apenas alguns microlitros do sêmen são analisados e o restante do material é descartado. Por isso, estamos solicitando permissão para utilizar este material, que seria descartado, em nossas análises com fins de pesquisa. A utilização deste material não prejudicará a análise de seu espermograma.

Não são conhecidos riscos pela participação na pesquisa. O possível desconforto apresentado será na entrega dos resultados, diferente do laudo do espermograma que será entregue 1 (um) dia após a coleta, os demais testes podem demorar até 7 (sete) dias para serem entregues. Além disso, poderá haver algum constrangimento no retorno dos resultados que será realizado de forma presencial.

O possível benefício decorrente da participação na pesquisa é um resultado mais completo do que o espermograma, incluindo a avaliação de parâmetros importantes da avaliação seminal que será realizada pela pesquisa.

Sua participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não participar, ou ainda, desistir de participar e retirar seu consentimento, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que você recebe ou possa vir a receber na instituição.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela sua participação na pesquisa e você não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos. Por isso, despesas de transporte e alimentação, serão de sua responsabilidade.

Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante de sua participação na pesquisa, você receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal.

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem

Rubrica do participante _____ Rubrica do pesquisador _____ Página 1 de 2

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(PACIENTES)**

a identificação dos participantes, ou seja, o seu nome não aparecerá na publicação dos resultados.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com a pesquisadora responsável Prof. Dra. Helena von Eye Corleta e com a pesquisadora Ana Paula Kussler pelo telefone (51) 33112149, ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 33597640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e outra para os pesquisadores.

Nome do participante da pesquisa

Assinatura

Nome do pesquisador que aplicou o Termo

Assinatura

Local e Data: _____

Rubrica do participante _____

Rubrica do pesquisador _____

Página 2 de 2

CEP Hospital de Clínicas de Porto Alegre (MR 05/11/2015)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (POPULAÇÃO GERAL)

Nº do projeto GPPG ou CAAE: 17-0314

Título do Projeto: Comparação de Diferentes Métodos de Processamento de Sêmen antes do Congelamento através de Avaliações Funcionais do Espermatozoide

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa cujo objetivo é analisar e comparar 3 (três) técnicas de congelamento de sêmen. Além disso, vamos realizar testes específicos para avaliar a função, a integridade e a estrutura do espermatozoide. Esta pesquisa está sendo realizada pelo Serviço de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Se você aceitar participar da pesquisa, os procedimentos envolvidos em sua participação são os seguintes: O senhor irá coletar a amostra de sêmen por masturbação, com uma abstinência sexual de 2 a 7 dias. A coleta será realizada na Clínica Generar, em um local reservado, onde você permanecerá sozinho. Para a realização do espermograma, apenas alguns microlitros do sêmen são analisados e o restante do material será utilizado para as demais análises com fins de pesquisa.

Não são conhecidos riscos pela participação na pesquisa. Os possíveis desconfortos apresentados serão na coleta da amostra e na entrega dos resultados, os quais podem demorar até 7 (sete) dias para serem entregues. Além disso, poderá haver algum constrangimento no retomo dos resultados que será realizado de forma presencial.

A participação na pesquisa não trará benefícios diretos aos participantes, porém você receberá o resultado dos exames pela pesquisa sobre parâmetros importantes da avaliação seminal.

Sua participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não participar, ou ainda, desistir de participar e retirar seu consentimento, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que você recebe ou possa vir a receber na instituição.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela sua participação na pesquisa e você não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos. Por isso, despesas de transporte e alimentação, serão de sua responsabilidade.

Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante de sua participação na pesquisa, você receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal.

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, o seu nome não aparecerá na publicação dos resultados.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com a pesquisadora responsável Prof. Dra. Helena von Eye Corleta e com a pesquisadora Ana Paula Kussler pelo telefone (51) 33112149, ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51)

Rubrica do participante _____ Rubrica do pesquisador _____ Página 1 de 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(POPULAÇÃO GERAL)

33597640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e outra para os pesquisadores.

Nome do participante da pesquisa

Assinatura

Nome do pesquisador que aplicou o Termo

Assinatura

Local e Data: _____