

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE SAÚDE MATERNO INFANTIL
MESTRADO EM TOCOGINECOLOGIA**

MARCELO BORGES CAVALCANTE

**CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN HUMANO:
COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS DE CONGELAÇÃO E
TIPOS DE ENVASE**

**FORTALEZA – CE
2004**

MARCELO BORGES CAVALCANTE

**CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN HUMANO:
COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS DE CONGELAÇÃO E
TIPOS DE ENVASE**

Dissertação submetida à Coordenação do curso de Pós-Graduação em Tocoginecologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Eugênio Pacelli de Barreto Teles

**Fortaleza
2004**

C364c Cavalcante, Marcelo Borges.
Criopreservação de Sêmen Humano: comparação entre métodos de congelamento e tipos de envase / Marcelo Borges Cavalcante – Fortaleza, 2004.
90 f.: il
Orientador: Prof. Dr. Eugênio Pacelli de Barreto Teles.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará.
Faculdade de Medicina.
1. Sêmen 2. Criopreservação 3. Reprodução Humana I. Teles, Eugênio Pacelli de Barreto (orient.) II. Título.

CDD.612.6

MARCELO BORGES CAVALCANTE

**CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN HUMANO
COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS DE CONGELAÇÃO E TIPOS DE ENVASE**

Dissertação submetida à Coordenação do curso de Pós-Graduação em Tocoginecologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Tocoginecologia.

Orientador: Prof. Dr. Eugênio Pacelli de Barreto Teles.

Aprovada em 20 de dezembro de 2004.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Eugênio Pacelli de Barreto Teles (Orientador)
Universidade Federal do Ceará - UFC
Presidente da banca examinadora

Prof. Dr. Renato Passini Júnior
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP
Examinador

Prof. Dr. Ricardo Toniolli
Universidade Estadual do Ceará – UECE
Examinador

“O que nos atrai nessa ciência imperfeita, aquilo que de fato cobizamos, à nossa maneira, é o momento alterável – a oportunidade frágil, mas cristalina de que nossos conhecimentos, capacidade ou apenas instinto visceral possam mudar para melhor o curso da vida de uma outra pessoa. O fato de que nossos esforços tenham algum sucesso ainda é algo que por vezes me choca. Mas eles têm. Nem sempre, mas com a frequência bastante razoável”.

(Atul Gawande)

*Aos meus pais, José Caetano (in memoriam) e
Firmina. Em especial ao meu pai, que, por obra divina, nos
deixou precocemente, privando-nos de compartilharmos
bons e maus momentos, mas estamos sempre lado a lado.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, José Caetano Farias Cavalcante (*in memoriam*) e Firmina América Borges Cavalcante, a quem devo toda minha educação e formação moral. Não existe forma de agradecer-lhes, apenas explicito toda a minha gratidão por tê-los como exemplo de família.

A minha noiva e futura esposa, Candice, pelo amor, amizade, amparo e estímulo incessante nas horas mais difíceis.

As minhas irmãs, Michelle e Milena, pela amizade, incentivo, compreensão e apoio em todos os momentos.

Ao restante de minha família, meus cunhados, Nonato e Alberto, meus sobrinhos queridos, Lara, Levi e a futura filha da Milena, por entenderem minha ausência em alguns momentos festivos de nossa família.

Ao Prof. Dr. Ricardo Barini, meu professor, amigo, que muito influenciou na minha formação, e ainda hoje contribui ativamente na minha atuação acadêmica e profissional.

As biólogas da CONCEPTUS, Ana Beatriz e Danielle, pelos momentos de discussões científicas e ajuda nas técnicas de laboratório, de grande importância na concretização desse meu objetivo.

Ao restante da equipe CONCEPTUS, Dr. Marcelo Rocha, Dr. Oswaldo Dias, Dra. Marjorie Mota, Dr. José Carlos Godeiro, Maura, Raquel e Valdênia, pela acolhida, apoio e convivência harmoniosa que temos no dia-a-dia.

Ao Prof. Dr. Eugênio Pacelli, pela orientação e pelo seu empenho em melhorar cada vez mais o nosso Curso de Mestrado.

Ao corpo docente da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará responsável por minha graduação. Ao corpo docente do CAISM da Universidade Estadual de Campinas responsável por minha especialização na área de ginecologia e obstetrícia, em especial ao preceptor Prof. Dr. Renato Passini.

Aos voluntários que ajudaram diretamente na realização deste relatório de mestrado, entendendo o objetivo e a importância do tema.

A todos os que de alguma forma me ajudaram e incentivaram na execução desse trabalho e ficaram ocultos.

SUMÁRIO

	PÁGINA
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
LISTA DE ABREVIATURAS	
1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Antecedentes da Literatura.....	18
1.2 Sêmen Humano.....	22
1.3 Criobiologia.....	23
2 OBJETIVOS.....	28
2.1 Objetivo Geral.....	29
2.2 Objetivos Específicos.....	29
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1 Local do Estudo.....	31
3.2 Desenho do Estudo.....	31
3.3 População Estudada.....	31
3.4 Tamanho da Amostra.....	31
3.5 Critérios e Procedimentos para Seleção e Exclusão dos Sujeitos.....	31
3.5.1 Critérios de inclusão.....	31
3.5.2 Critérios de exclusão.....	31
3.6 Variáveis em Estudo.....	32

3.6.1 Apresentação das variáveis.....	32
3.7 Definição das Variáveis.....	32
3.8 Admissão ao Estudo.....	33
3.9 Coleta de Dados.....	33
3.10 Coleta de Sêmen.....	34
3.11 Técnica Laboratorial.....	34
3.11.1 Avaliação das características físicas e citológicas.....	34
3.11.2 Determinação da concentração da amostra.....	35
3.11.3 Determinação da motilidade da amostra.....	37
3.11.4 Determinação da morfologia da amostra.....	38
3.11.5 Determinação da curva de sobrevivência em três horas.....	39
3.11.6 Adição do crioprotetor.....	39
3.11.7 Envase.....	40
3.11.8 Congelação pelo método lento.....	41
3.11.9 Congelação pelo método rápido.....	42
3.11.10 Manutenção da amostra.....	43
3.11.11 Descongelção das amostras.....	43
3.11.12 Destino final das amostras.....	44
3.12 Processamento dos Dados e Análise Estatística.....	44
3.13 Aspectos éticos.....	45
4 RESULTADOS.....	47
4.1 Análise inicial das Amostras de Sêmen.....	48
4.2 Congelação Rápida com Envase em Palheta (RP).....	51

4.3 Congelação Rápida com Envase em Criotubo (RT).....	53
4.4 Congelação Lenta com Envase em Palheta (LP).....	54
4.5 Congelação Lenta com Envase em Criotubo (LT).....	56
4.6 Análise Comparativa da Morfologia Espermática.....	57
4.7 Análise Comparativa da Motilidade Espermática.....	60
5 DISCUSSÃO.....	69
6 CONCLUSÕES.....	75
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
ANEXOS.....	86
APÊNDICES.....	92

RESUMO

O presente trabalho tem como objetivo determinar o melhor método de congelação e envase de sêmen humano, quando comparado o método rápido com o lento e o envase em palhetas de 0,25ml com criotubos de 2ml, utilizando como variáveis a morfologia e motilidade dos espermatozóides antes e após a criopreservação. Trata-se de um estudo experimental, de validação de técnica laboratorial. Foi desenvolvido no Centro de Reprodução Assistida do Ceará. Foram analisadas dezoito amostras de sêmen de dezoito voluntários. As amostras foram submetidas à análise da morfologia e motilidade espermática prévia à criopreservação. Foi determinada ainda uma curva de motilidade espermática nas primeiras três horas. O meio TEST-YOLK foi utilizado como crioprotetor. Depois de adicionado o crioprotetor, o sêmen foi dividido em partes iguais e envasado em criotubos e palhetas. Metade dos criotubos e das palhetas foi submetida a criopreservação pelo método rápido (RT e RP, respectivamente) e a outra metade pelo método lento (LT e LP, respectivamente). Em seguida, as amostras foram descongeladas e determinadas as morfologias, bem como as motilidades logo após a descongelação e a cada hora durante três horas. Análise estatística foi realizada pelo programa de SPSS for Windows versão 11.0.0. Houve uma queda, estatisticamente significativa, da motilidade após a criopreservação, motilidade inicial de 58,1% e motilidades nos diferentes tratamentos de 30,3% (LT), 21,1% (LP), 27% (RT) e 19,2% (RP). Também houve uma diminuição significativa da morfologia normal após a criopreservação, em relação à morfologia inicial (14,2%), mas não foi observada diferença entre os métodos (12,8%, 12,6%, 12,6% e 12,4%; RP, RT, LP e LT, respectivamente). O método LT foi o que obteve uma curva de motilidade espermática mais próxima da observada no sêmen *in natura*. Conclui-se que o método LT foi o que menos afetou a motilidade espermática e que, apesar de ter sido observada uma piora significativa da morfologia espermática após a criopreservação, não houve diferença entre os métodos.

Palavras-chaves: Criopreservação; Preservação do Sêmen; Espermatozóide; Reprodução

ABSTRACT

This research has as objective determines the best freezing method and storage of human semen, when compared the fast method with the slow method and the storage in 0,25ml straws with cryotubes of 2ml, using as variables the morphology and motility of the spermatozoa before and after the cryopreservation. It is an experimental study, laboratorial technique validation. It was developed in the Assisted Reproduction Center of Ceará. Eighteen semen samples from eighteen men were analyzed. The samples were submitted to the analysis of the morphology and motility previous the cryopreservation. It was still determined a spermatozoa motility curve in the first three hours. TEST-YOLK was used as cryoprotective media. After having added the TEST-YOLK media, the semen was divided in same parts and storage in cryotubes and straws. Half of the cryotubes and of the straws was cryopreserved by the fast method (RT and RP, respectively) and the other half by the slow method (LT and LP, respectively). The samples were thawed and analyzed the morphologies, as well as the motilities soon after the thawed and every hour for three hours. Statistical analysis was done by the SPSS program - Windows version 11.0.0. Motility of spermatozoa decrease after the cryopreservation, initial motility was 58,1% and motilities in the different treatments were 30,3% (LT), 21,1% (LP), 27% (RT) and 19,2% (RP). There was a significant decrease of the normal morphology after the cryopreservation, in relation to the initial morphology, but difference was not observed among the methods (RP=12,8%, RT=12,6%, LP=12,6% e LT=12,4%). The motility of LT method was closer than that obtained in the fresh semen. The method LT showed the best recovery of motile cells after freezing and thawing. There was not difference among the methods when appraised the morphology.

Key-Word: Cryopreservation; Semen preservation; Spermatozoa; Reproduction.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
CONC	Concentração espermática
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
ISCI	Injeção intracitoplasmática de espermatozóide
LT	Método lento com envase em tubo de 2ml
LP	Método lento com envase em palheta de 0,25ml
MESA	Aspiração microcirúrgica de espermatozóides do epidídimo
Morf	Morfologia espermática
ml	Mililitro
Mt	Motilidade espermática
OMS	Organização Mundial de Saúde
PESA	Aspiração percutânea de espermatozóides do epidídimo
RT	Método rápido com envase em tubo de 2ml
RP	Método rápido com envase em palheta de 0,25ml
TESA	Aspiração percutânea de espermatozóides do testículo
TESE	Obtenção de espermatozóides por biópsia testicular

WHO

World Health Organization

μl

Microlitro

LISTA DE FIGURAS

	PÁGINA	
FIGURA 1	Câmara de Makler.	36
FIGURA 2	Preparo da alíquota de sêmen na câmara de Makler.	36
FIGURA 3	Esquema da visão microscópica da câmara de Makler.	37
FIGURA 4	Preparo da lâmina.	39
FIGURA 5	Criotubo de 2ml.	40
FIGURA 6	Palhetas de 0,25ml.	41
FIGURA 7	Freezer Control Cryologic.	42
FIGURA 8	Caixa de isopor utilizada para congelação pelo método rápido.	43
FIGURA 9	Resumo da metodologia do estudo.	44
FIGURA 10	Curva de motilidade espermática prévia a congelação.	51
FIGURA 11	Alteração da motilidade espermática após o tratamento RP.	52
FIGURA 12	Alteração da motilidade espermática após o tratamento RT.	54
FIGURA 13	Alteração da motilidade espermática após o tratamento LP.	55

FIGURA 14	Alteração da motilidade espermática após o tratamento LT.	57
FIGURA 15	Comparação das morfologias nos diferentes tratamentos.	58
FIGURA 16	Comparação da alteração da motilidade inicial nos diferentes tratamentos após trinta minutos de descongelação.	61
FIGURA 17	Comparação da motilidade nos diferentes tratamentos e tempos.	61
FIGURA 18	Curva de motilidade em três horas.	67
FIGURA 19	Motilidade espermática nos diferentes tratamentos e tempos.	67
FIGURA 20	Morfologia espermática nos diferentes tratamentos.	68
FIGURA 21	Morfologia espermática normal, segundo Krüger.	89
FIGURA 22	Morfologia espermática anormal, segundo Krüger.	89
FIGURA 23	Curva de congelação, programa 6.	90
FIGURA 24	Esquema da curva de congelação.	90
FIGURA 25	Esquema para curva rápida.	91

LISTA DE TABELAS

	PÁGINA
TABELA 1	Análise das correlações de monotonicidade (Spearman) entre as variáveis iniciais. 48
TABELA 2	Características seminais iniciais 49
TABELA 3	Análise das regressões em relação à redução de motilidade prévia a congelação. Modelo de análise $Y = \beta X + \varepsilon$. 50
TABELA 4	Análise das regressões em relação à redução de motilidade no tratamento RP. Modelo de análise $Y = \beta X + \varepsilon$. 52
TABELA 5	Análise das regressões em relação à redução de motilidade no tratamento RT. Modelo de análise $Y = \beta X + \varepsilon$. 53
TABELA 6	Análise das regressões em relação à redução de motilidade no tratamento LP. Modelo de análise $Y = \beta X + \varepsilon$. 55
TABELA 7	Análise das regressões em relação à redução de motilidade no tratamento LT. Modelo de análise $Y = \beta X + \varepsilon$. 56
TABELA 8	Comparação da alteração da morfologia inicial nos diferentes tratamentos. 58
TABELA 9	Comparação das morfologias nos diferentes tratamentos. 59
TABELA 10	Comparação da alteração da motilidade inicial nos diferentes tratamentos. 60
TABELA 11	Comparação das motilidades nos tratamentos RP x RT. 62

TABELA 12	Comparação das motilidades nos tratamentos LP x LT.	63
TABELA 13	Comparação das motilidades nos tratamentos RP x LP.	64
TABELA 14	Comparação das motilidades nos tratamentos RT x LT.	64
TABELA 15	Comparação das motilidades nos tratamentos RP x LT e RT x LP.	65
TABELA 16	Características seminais antes e após a criopreservação nos diferentes tratamentos.	66

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Antecedentes da Literatura

O primeiro relato de que o sêmen é resistente a baixas temperaturas é de 1776, quando Spallanzani observou espermatozóides que sobreviveram após a congelação em neve. Em 1866, Mantegazza, médico italiano, observou que espermatozóides humanos apresentavam motilidade após serem congelados a uma temperatura de -15°C e descongelados em seguida, propondo pela primeira vez a estruturação de um banco de sêmen (BUNGE et al., 1954).

A preservação de amostras de sêmen não diluídas e mergulhadas em diferentes meios (álcool resfriado por gelo seco a -79°C , nitrogênio líquido a -196°C e hélio líquido a -296°C) foi descrita em 1940. Observou-se uma diminuição da motilidade, porém os espermatozóides se mantinham móveis após várias horas da descongelação, permanecendo a preocupação com a capacidade de fertilização (SHETTLES, 1940). Em 1942, observaram uma diminuição da motilidade espermática após congelação por imersão direta em nitrogênio líquido e tentaram desidratar as células por plasmólise, expondo-as a diferentes açúcares (HOAGLAND; PINCUS, 1942).

No final dos anos 1940, passaram a ser investigadas diferentes maneiras de congelar amostras de sêmen, tendo como objetivo a manutenção das características dos espermatozóides frescos. Inicialmente, foram testadas as adições de glicerol-albumina aos espermatozóides de aves (POLGE et al., 1949) e de solução de glicerol aos espermatozóides de touro (SMITH; POLGE, 1950). Observou-se uma melhoria na qualidade dos espermatozóides criopreservados, que foi recompensada com o nascimento do primeiro mamífero, um touro, fruto de uma inseminação artificial utilizando sêmen descongelado (STEWART, 1951).

No início da década de 1950, foi descrito o primeiro caso de gravidez e nascimento humano, por técnica de inseminação artificial, utilizando sêmen descongelado, após ter sido estocado por até seis semanas em gelo seco a -70°C (BUNGE et al., 1954). Na década seguinte, em 1964, foram descritos nascimentos de humanos através de inseminação artificial

utilizando sêmen congelado e armazenado em nitrogênio líquido por até cinco meses (PERLOFF et al., 1964).

Recentemente, foi publicado o caso de um paciente que, em 1979, aos dezessete anos, foi submetido a uma orquiectomia à direita por um câncer de testículo. Durante o seguimento, foram diagnosticadas metástases em linfonodos paraaórticos. Nessa ocasião, o paciente foi orientado a criopreservar seu sêmen. O paciente ainda realizou radioterapia do testículo esquerdo e quimioterapia. Em 1981, foi submetido a uma laparotomia para ressecção de uma massa retroperitoneal. Em 1992, recebeu alta, livre de doença. Em 1995, foi diagnosticada azoospermia. Em 2002, nasceu seu filho, através de reprodução assistida, utilizando o sêmen criopreservado há 21 anos (HORNE et al., 2004).

Atualmente, quinze em cada cem casais, em idade fértil, que desejam um filho apresentam dificuldade em alcançar uma gravidez. Em metade desses casais, a causa da infertilidade decorre de um fator masculino isolado ou associado a outros fatores femininos. Dentre os fatores masculinos, destacam-se a baixa concentração de espermatozóides, alterações na motilidade e na morfologia espermática (JARDIM et al., 1999). Com o avanço no tratamento da infertilidade conjugal, marcado pelo nascimento de Louise Brown no final da década de 70 (STEPOE; EDWARDS, 1978) e com o desenvolvimento da técnica de injeção intracitoplasmática de espermatozóides (ICSI) (PALERMO et al., 1992), disponibilizou-se uma nova perspectiva terapêutica para os casais com fator masculino grave, através da utilização de espermatozóides oriundos de programas de doação de sêmen, ressurgindo a idéia da criação dos bancos de sêmen, já proposta por Mantegazza em 1866, sendo o primeiro estabelecido por Sherman (SHERMAN, 1978).

Desde a criação do primeiro banco de sêmen, diversos autores publicaram suas experiências com a criopreservação de espermatozóides, merecendo destaque os da França (DAVID; LANSAC, 1980), da Austrália (TROUSON et al., 1981), dos Estados Unidos (CRITSER, 1998; CHUNG et al., 2004) e da Itália (COLPI et al., 2004). Em 1997, Lansac e colaboradores publicaram um estudo avaliando um total de 21.597 gestações obtidas por inseminação artificial (período de 1987 a 1994) e 3.381 gestações obtidas através de fertilização *in vitro* (FIV) (período de 1989 a 1994), ambas as técnicas com sêmen criopreservado de doador. Nesse estudo foi utilizado um banco de dados francês que reunia vinte e dois centros de criopreservação de espermatozóides sob as mesmas diretrizes. Concluiu-se que, nas gestações decorrentes de inseminação artificial, as taxas de aborto, de

gestação ectópica, de malformações fetais, o peso ao nascimento e a relação do sexo masculino:feminino foram as mesmas da população em geral, quando a variável idade era controlada nos grupos estudados. Quando comparadas às gestações oriundas por técnica de FIV, utilizando-se sêmen *in natura* ou congelado, não foram observadas diferenças significativas nas variáveis estudadas (LANSAC et al., 1997). Recentemente, esses resultados foram corroborados (MARCUS-BRAUN et al., 2004).

Com o surgimento dos bancos de sêmen, foram publicados vários estudos comparando as taxas de gravidez em processos de inseminação artificial utilizando sêmen *in natura* e criopreservado. Diferentes resultados foram publicados, muitos mostraram não haver diferença nas taxas de gravidez (BORDSON et al., 1986; KEEL; WEBSTER, 1989), outros revelaram taxas de gravidez estatisticamente superiores, quando utilizado sêmen *in natura* (STEINBERGER; SMITH, 1973; RICHTER et al., 1984; DIMARZO et al., 1990; SUBAK et al., 1992). Existe uma grande dificuldade em comparar esses dados, em razão do uso de diferentes técnicas de inseminação artificial e de criopreservação de espermatozóides entre os trabalhos citados.

Taxas de gravidez em ciclos de FIV e de ICSI, quando utilizados espermatozóides criopreservados, também passaram a ser comparadas. Diversos estudos mostraram que a taxa de sucesso em ciclos de reprodução assistida é semelhante quando comparada ao sêmen *in natura* (MORSHEDI et al., 1990; VAN STEIRTEGHEM et al., 1993; LANSAC et al., 1997). Bons resultados foram também obtidos em ciclos de ISCI, utilizando espermatozóides congelados obtidos por punção de epidídimo, bem como de espermátides congeladas (DEVROEY et al., 1995; TESARIK et al., 1996; HOLDEN et al., 1997; TOURNAYE et al., 1999; GIL-SALOM et al., 2000).

Recentemente, com o surgimento da AIDS, os bancos de sêmen de doador passaram a ter grande preocupação com a qualidade e estocagem do sêmen, sendo as amostras liberadas apenas após um prazo de no mínimo seis meses, período em que se completa a investigação sorológica do doador (HALLAK et al., 1999).

Dessa forma, o banco de sêmen está exercendo sua principal função, que é garantir uma fonte de espermatozóides saudáveis e de boa qualidade para uso em técnicas de reprodução assistida, de acordo com as seguintes indicações (HALLAK et al., 1999):

- inseminação com sêmen do parceiro nos casos de ausência temporária ou definitiva dele mesmo, baixa frequência sexual e disfunção erétil.

- Pacientes que necessitam de criopreservação terapêutica de sêmen, a exemplo daqueles que têm alguma doença que induza a infertilidade ou iniba a espermatogênese. Indivíduos em idade reprodutiva e com qualquer tipo de câncer, que serão submetidos à radioterapia e/ou quimioterapia, ou a cirurgias que possam comprometer o potencial fértil (ex: dissecação dos linfonodos retroperitoneais, ressecção endoscópica da próstata, cirurgias envolvendo o colo vesical). Recomenda-se a criopreservação antes do início do tratamento específico.
- Inseminação com sêmen de doadores anônimos: indicada nos casos de infertilidade masculina – depois de esgotadas as possibilidades terapêuticas - em casos de doenças genéticas transmissíveis por parte do homem, em incompatibilidade Rh em que a mulher já está isoimunizada, ou quando, por fatores econômicos, o casal preferir a utilização do banco de sêmen a tentar FIV ou ICSI. É recomendado o uso somente de sêmen criopreservado de doadores anônimos e testados sorologicamente, em virtude do aumento do risco de transmissão de doenças sexualmente transmissíveis, em particular, a AIDS. Isto possibilita a existência de um banco com maior disponibilidade fenotípica.
- Programas de fertilização *in vitro* e micromanipulação de gametas possibilitam inseminações programadas em um mesmo ciclo de tratamento. Permitem, ainda, a coleta fora do dia do procedimento de reprodução assistida, proporcionando maior liberdade ao paciente, evitando o estresse da coleta.
- Criopreservação de sêmen para indivíduos que desejam ser submetidos à vasectomia, objetivando preservar a fertilidade futura.
- Criopreservação dos espermatozóides obtidos durante microcirurgias para reconstrução do sistema reprodutivo (ex: vasovasostomia e vasoepididimostomia).
- Criopreservação dos espermatozóides obtidos por técnicas cirúrgicas do epidídimo ou do testículo (MESA, TESA, TESE, PESA), para utilização em micromanipulação de gametas (ex: ICSI).
- Criopreservação de sêmen de indivíduos que trabalham em profissões de alto risco (ex: mergulhadores de elevada profundidade, indústrias químicas, exposição a agrotóxicos e pesticidas e exposição a radiações ionizantes).

1.2 Sêmen Humano

O sêmen é uma suspensão celular semigelatinosa que contém espermatozóides e secreção de órgãos acessórios do trato reprodutor masculino. A porção fluida dessa suspensão é conhecida como plasma seminal (SCHLEGEL; HARDY, 2002).

Os espermatozóides são formados nos túbulos seminíferos, onde se encontram na forma de células germinativas em diferentes estádios de diferenciação. A forma madura dos espermatozóides é uma célula altamente diferenciada armazenada na cauda do epidídimo e nos ductos deferentes (SCHLEGEL; HARDY, 2002).

O espermatozóide mede aproximadamente 60µm de comprimento, uma célula alongada que se divide em cabeça e cauda. A cabeça do espermatozóide tem formato oval, mede em torno de 4,5µm de comprimento por 3µm de largura, possui um núcleo, com uma cromatina compacta, e o acrossoma, organela localizada entre a membrana plasmática e a porção anterior do núcleo, onde existe uma grande quantidade de enzimas responsáveis pela penetração do espermatozóide no óvulo (SCHLEGEL; HARDY, 2002).

A cauda do espermatozóide é composta por colo, peça intermediária, peça principal e peça terminal. O colo é a região de ligação da cabeça à cauda. A cauda, inicialmente na peça intermediária, possui uma complexa arquitetura de microtúbulos e arranjo de mitocôndrias que conferem ao espermatozóide a sua motilidade (SCHLEGEL; HARDY, 2002).

O espermograma, exame que avalia a qualidade do sêmen, estuda diferentes parâmetros que refletem a capacidade funcional dos espermatozóides, o poder de fertilização do espermatozóide em ciclos naturais ou de reprodução assistida. Dentre as variáveis analisadas, destacam-se a concentração, a motilidade e a morfologia dos espermatozóides.

A concentração é determinada pela quantidade de espermatozóides existentes em um mililitro (ml) de sêmen. Segundo a OMS, valores acima de vinte milhões de espermatozóides por ml são considerados normais (WHO, 1999). Concentrações elevadas de espermatozóides estão relacionadas com maiores taxas de gravidez em ciclos espontâneos e de inseminação artificial (GUZICK et al., 1999).

O interesse da avaliação da morfologia espermática surgiu em 1951, quando MacLeod e Gold mostraram que homens férteis e inférteis tinham a morfologia do espermatozóide diferente. A morfologia espermática é descrita em percentual de formas normais e

determinada mediante uma avaliação, de no mínimo duzentos espermatozóides, de uma lâmina preparada através de uma coloração específica (WHO, 1999). Utilizam-se dois critérios para definir a normalidade dos espermatozóides observados, um proposto pela OMS e outro sugerido por Krüger e colaboradores. A morfologia espermática é um indicador do potencial de fertilização oocitária. Demonstrou-se maior taxa de fertilização durante ciclos de FIV naqueles pacientes com mais que quatorze por cento de formas normais (taxa de fertilização de noventa e um por cento) quando comparados com aqueles de menos de quatorze por cento de formas normais (trinta e sete por cento) (KRÜGER et al., 1986).

A motilidade espermática é necessária para que os espermatozóides percorram todo o útero e trompas para encontrar o óvulo, sendo de fundamental importância no processo de fertilização oocitária. O estudo da motilidade é realizado sob observação microscópica e determina o percentual de espermatozóides móveis. É contado um total de cem espermatozóides, sendo classificados em grau A, B, C ou D, conforme critérios da OMS: grau A (espermatozóides móveis com progressão rápida), grau B (espermatozóides móveis com progressão lenta, linear ou não), grau C (espermatozóides móveis sem progressão) e grau D (espermatozóides imóveis). São considerados valores normais quando no mínimo vinte e cinco por cento dos espermatozóides visualizados são grau A ou a soma dos graus A e B é de no mínimo cinquenta por cento (WHO, 1999). Maiores taxas de gravidez, em ciclos espontâneos, de inseminação artificial e FIV, bem como maiores taxas de fertilização em ciclos de FIV são encontradas quando existe maior percentual de espermatozóides móveis e progressivos (DONNELLY et al, 1998; GUZICK et al., 1999).

A criopreservação afeta a qualidade estrutural e funcional dos espermatozóides. Estudos que utilizaram a técnica de microscopia com transmissão de elétrons revelaram que a membrana plasmática e o acrossoma são as estruturas espermáticas mais vulneráveis ao processo de criopreservação; demonstram também um prejuízo na motilidade, viabilidade e função acrossômica do espermatozóide (CROSS; HANKS, 1991; OETTLÉ et al., 1992; SATHANANTHAN, 2000).

1.3 Criobiologia

A palavra “criobiologia” tem origem do termo grego “*kruos*” (exprime a idéia de frio) e é definida como o estudo da vida a temperatura extremamente baixa. Dessa maneira, fica

claro que os termos criopreservação e congelamento não são sinônimos. O primeiro significa preservar células, guardando-as a baixas temperaturas, enquanto o segundo é a mudança do estado líquido para sólido.

Com o desenvolvimento das técnicas de reprodução assistida, a criobiologia passou a despertar grande interesse, pois exerce papel essencial na manutenção da fertilidade. Participa diretamente na criopreservação de espermatozoides, óvulos, embriões, tecidos testiculares e ovarianos (AGARWAL et al, 1995; HOVATTA, 2000; KASAI et al., 2002; HOVATTA, 2003; ISACHENKO et al., 2003; VEECK, 2003).

A criopreservação tem como principal objetivo: manter a integridade estrutural e viabilidade celular após submeter essas células a baixas temperaturas por um determinado período. Esse processo produz danos celulares conhecidos como crioinjúrias, que surgem em razão de: 1) formação de cristais de gelo intracelular, 2) toxicidade química dos crioprotetores, 3) choque osmótico, 4) dano de fratura e 5) formação de cristais de gelo extracelular (HOLT, 2000; WATSON, 2000; KASAI et al., 2002; WOODS et al., 2004).

A água é o constituinte primário de fluidos biológicos para o transporte de substâncias essenciais. A água pura congela e forma cristais a 0°C, enquanto a água, contendo íons e outras substâncias em solução, congela a temperaturas mais baixas. Como a água na solução é congelada, cristais puros de água são formados, aumentando a pressão osmótica do soluto remanescente, que pode danificar as células (HOLT, 2000; OEHNINGER et al., 2000; KASAI et al., 2002).

A formação de cristais de gelo, predominantemente intra ou extracelular, durante a criopreservação, depende da velocidade de queda da temperatura. O resfriamento lento forma cristais de gelo no meio extracelular, levando a uma desidratação da célula, em virtude da exposição a um meio hiperosmótico por um longo período, fenômeno conhecido como “efeito solução”. No resfriamento rápido, observa-se a formação de cristais de gelo no interior da célula com a lesão de organelas celulares. Ambas as formas de resfriamento causam danos celulares. Assim, a velocidade de resfriamento ideal deveria ser lenta o suficiente para evitar a formação de cristais de gelo no interior da célula, mas, de certa forma, rápida para diminuir o efeito solução (HOLT, 2000; LEIBO et al., 2002).

Na tentativa de diminuir os danos celulares durante a criopreservação, a adição de meios crioprotetores passou a ser utilizada de rotina (POLGE et al., 1949; SMITH; POLGE, 1950). Eles podem ser divididos em dois grupos, permeáveis (glicerol, dimetilsulfóxido,

etanol) e não permeáveis (sacarose, glicose, dextran). Geralmente, são utilizadas composições contendo crioprotetores permeáveis e não permeáveis (KASAI et al., 2002).

Com o surgimento do glicerol como meio crioprotetor, houve melhora nos resultados, porém encontrar o meio crioprotetor ideal é muito difícil. O próprio glicerol é utilizado em diferentes concentrações, dependendo da espécie animal, em consequência da sua agressão tóxica à célula (CRITSER et al., 1988). Por exemplo, a concentração de glicerol é lesiva aos espermatozoides do porco, do boi e do rato se exceder respectivamente 3%, 8% e 1,75% (HOLT, 2000).

Vários meios crioprotetores já foram estudados para o sêmen humano. Em 1986, um estudo, comparando oito meios, demonstrou melhores resultados com o TEST-C-I. O TEST-C-I é composto por solução TEST, citrato de sódio, gema de ovo, frutose e glicerol (concentração final de 6%) (PRINS; WEIDEL, 1986). Outro estudo, em 2000, testando dois meios crioprotetores (TEST-YOLK e HSPM) e três diferentes curvas de congelação (programada lenta, programada rápida e vapor de nitrogênio), obtiveram melhores resultados com o meio TEST YOLK e com uma curva programada lenta, com taxa de recuperação de espermatozoides móveis de $52 \pm 16,8\%$ (STANIC et al., 2000). Foram observados melhores resultados em motilidade, morfologia e integridade da membrana plasmática nas amostras criopreservadas com TEST-YOLK, quando comparadas com as que utilizaram somente glicerol (HALLAK et al., 2000).

Entre indivíduos de uma mesma espécie, pode existir variação na resistência à crioinjúria. Estudando três espécies de ratos, demonstrou-se que apenas a exposição ao meio crioprotetor já reduziu a taxa de fertilização em duas espécies, sendo o mesmo observado após a criopreservação (SONGSASEN; LEIBO, 1997).

Comparando métodos de resfriamento e aquecimento das amostras criopreservadas, observou-se uma melhora da motilidade, quando utilizado um resfriamento lento com aquecimento em temperatura ambiente (TAYLOR et al., 1982; RAGNI et al., 1990; FLORENCIO et al., 1995; STANIC et al., 2000). Observou-se também que a motilidade, integridade da membrana plasmática e função mitocondrial dos espermatozoides não são afetados de maneira diferente para determinada curva de resfriamento e aquecimento (HENRY et al., 1993). Recentemente, resultados obtidos com um processo de resfriamento lento estão sendo comparados com o método de vitrificação, no qual a velocidade de resfriamento é muito elevada (ISACHENKO et al., 2004).

A forma de envase do sêmen também pode influenciar nos resultados. Existem poucos estudos com sêmen humano, porém em animais esse já é um fator de relevância no processo de criopreservação (ERIKSSON; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2000; CÓRDOVA et al., 2002). A decisão do melhor recipiente para envase é baseada não somente nos resultados após o descongelamento, mas nas vantagens e desvantagens em seu uso. O sêmen humano pode ser envasado em pequenos tubos plásticos com capacidade de dois mililitros (criotubos) ou em finas estruturas plásticas com capacidade de 0,25 a 0,5 mililitro (palhetas). O criotubo é de fácil preenchimento, fácil identificação, limpo, higiênico e de aceitação internacional, porém apresenta uma dificuldade de controle da temperatura, ocupa muito espaço de armazenamento e um maior investimento de equipamento. A palheta ocupa pouco espaço, o descongelamento é rápido, alíquotas são menores e o congelamento parece ser uniforme, porém seu manejo é trabalhoso, é de identificação difícil, fácil de perder, tem maior sensibilidade à temperatura (ROMERO et al., 1998).

Apesar do grande avanço da criobiologia, a criopreservação de sêmen promove uma perda da viabilidade de até 50% dos espermatozóides depois de descongelados, podendo comprometer resultados em tratamentos de reprodução assistida. As pesquisas de criopreservação de espermatozóides, em sua grande maioria, são empíricas, e procuram estabelecer a melhor maneira de resfriar, armazenar e descongelar as amostras. Inúmeros fatores influenciam esse processo: agentes crioprotetores, centrifugação do sêmen prévia ao congelamento, velocidade de queda da temperatura, envase do sêmen, forma de descongelamento e variações dentro da própria espécie (COHEN et al., 1981; CRITSER et al, 1987; CRITSER et al, 1988; DONNELLY et al., 2001; CÓRDOVA et al., 2002).

A grande evolução da reprodução assistida nas últimas décadas, marcada pela descrição da técnica de ICSI por Palermo e colaboradores em 1992, permitiu o tratamento da infertilidade a um número considerável de casais.

As técnicas de criopreservação de gametas, incluindo os espermatozóides, e os bancos de sêmen se tornaram aliados no tratamento de casais com fator masculino grave (banco de sêmen heterólogo), bem como na manutenção da fertilidade (banco de sêmen homólogo) em situações especiais, como, por exemplo, pacientes submetidos à quimioterapia, radioterapia, cirurgias testiculares, ausência física no período fértil da parceira e a vasectomia.

Recentemente, diversos centros vêm descrevendo a experiência de criopreservação de sêmen em pacientes oncológicos, portadores de câncer testicular, linfomas, leucemias, câncer do aparelho digestivo e outros menos frequentes.

Embora a tecnologia venha sendo aprimorada, porém, os resultados da aplicação dos métodos de conservação do sêmen ainda são insatisfatórios, pois ocorre uma queda importante na qualidade do sêmen durante o processo de congelação-descongelação. Essa má conservação decorre de vários fatores relacionados à técnica de criopreservação e ao indivíduo (intra e inter-espécies).

Apesar de bastante difundida, a criopreservação de espermatozóides ainda não possui uma técnica-padrão, aceita por todos os centros que a realizam. Entre os fatores relacionados à técnica, destacam-se, principalmente: meio crioprotetor utilizado, velocidade de queda da temperatura durante a congelação do sêmen, o envase, a forma de armazenamento e a maneira de descongelação da amostra conservada.

Alterações na qualidade do sêmen criopreservado são observadas, principalmente, na morfologia e na motilidade dos espermatozóides e podem afetar as taxas de sucesso dos tratamentos realizados em casais inférteis.

No intuito de diminuir, cada vez mais, os danos causados na estrutura e na funcionalidade dos espermatozóides durante a criopreservação, tornam-se necessários maiores estudos sobre o processo ideal. Autores discutem sobre qual o melhor meio crioprotetor, qual a melhor velocidade de resfriamento do sêmen, bem como sobre qual a melhor forma de envasar, armazenar e descongelar as amostras.

O presente estudo pretende determinar um método de criopreservação de sêmen que mantenha ao máximo as características originais dos espermatozóides, preservando, principalmente, sua morfologia e motilidade, que são essenciais nos resultados dos tratamentos de reprodução assistida.

Para a definição desse melhor método, é necessário comparar diferentes formas de congelação e tipos de envase das amostras de sêmen.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o desempenho de diferentes métodos de congelação e formas de envase de sêmen humano.

2.2 Objetivos Específicos

Comparar motilidade do espermatozóide no sêmen *in natura* e após descongelação, pelos dois métodos e duas maneiras de envase.

Comparar a curva de sobrevivência em três horas no sêmen *in natura* e após descongelação, pelos dois métodos e duas maneiras de envase.

Comparar a morfologia do espermatozóide no sêmen *in natura* e após descongelação, pelos dois métodos e duas maneiras de envase.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local do Estudo

O estudo foi desenvolvido no período de janeiro a agosto de 2004 no Centro de Reprodução Assistida do Ceará.

3.2 Desenho do Estudo

Estudo experimental, de validação de técnica laboratorial.

3.3 População Estudada

Voluntários com possível interesse em criopreservar sêmen.

3.4 Tamanho da Amostra

Dezoito amostras de sêmen de um total de dezoito voluntários. Cada voluntário colheu uma amostra de sêmen.

3.5 Critérios e Procedimentos para a Seleção e Exclusão dos Sujeitos

3.5.1 Critérios de inclusão

Ser voluntário.

Idade maior que dezoito anos e menor que cinquenta anos.

Período de abstinência sexual entre três a cinco dias.

3.5.2 Critérios de exclusão

Presença de doenças agudas ou crônicas.

Febre nos últimos trinta dias.

Uso de medicações.

Tabagistas.

Usuários de drogas.

3.6 Variáveis em estudo

3.6.1 Apresentação das variáveis

Variáveis independentes

- 1) Método rápido.
- 2) Método lento.
- 3) Palheta de 0,25ml.
- 4) Criotubo de 2ml.

Variáveis dependentes

- 1) Concentração espermática.
- 2) Motilidade espermática.
- 3) Morfologia espermática.

3.7 Definição das Variáveis

- 1) Método rápido (**R**): congelação de espermatozóides realizado em vapor de nitrogênio.
- 2) Método lento (**L**): congelação de espermatozóides realizado em programa de número seis do congelador automático.
- 3) Palheta de 0,25ml (**P**): sêmen envasado em palhetas com capacidade de 0,25ml e depositados em nitrogênio líquido.
- 4) Criotubo de 2ml (**T**): sêmen envasado em tubos com capacidade de 2ml e depositados em nitrogênio líquido.
- 5) Concentração espermática (**CONC**): quantidade de espermatozóides por mililitro (ml) de sêmen.
- 6) Motilidade espermática (**Mt**): classificação da motilidade dos espermatozóides segundo as orientações da OMS - WHO Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Cambridge: Cambridge University Press, 1999.
- 7) Morfologia espermática (**Morf**): classificação da morfologia dos espermatozóides segundo as orientações de Krüger (KRÜGER et al, 1986).
- 8) Motilidade espermática do sêmen *in natura* inicial, após 1 hora, 2 horas e 3 horas (**Mt_i**, **Mt₁**, **Mt₂**, **Mt₃**).
- 9) Motilidade espermática do sêmen pós-descongelação pelo método rápido e envasado na palheta de 0,25ml com 30 minutos, 1 hora, 2 horas e 3 horas (**RP₀**, **RP₁**, **RP₂**, **RP₃**).

- 10) Motilidade espermática do sêmen pós-descongelamento pelo método rápido e envasado no criotubo de 2ml com 30 minutos, 1 hora, 2 horas e 3 horas (**RT0, RT1, RT2, RT3**).
- 11) Motilidade espermática do sêmen pós-descongelamento pelo método lento e envasado na palheta de 0,25ml com 30 minutos, 1 hora, 2 horas e 3 horas (**LP0, LP1, LP2, LP3**).
- 12) Motilidade espermática do sêmen pós-descongelamento pelo método lento e envasado no criotubo de 2ml com 30 minutos, 1 hora, 2 horas e 3 horas (**LT0, LT1, LT2, LT3**).
- 13) Morfologia espermática do sêmen *in natura* (**Morfi**).
- 14) Morfologia espermática do sêmen pós-descongelamento pelo método rápido e envasado na palheta de 0,25ml (**MorfRP**).
- 15) Morfologia espermática do sêmen pós-descongelamento pelo método rápido e envasado no criotubo de 2ml (**MorfRT**).
- 16) Morfologia espermática do sêmen pós-descongelamento pelo método lento e envasado na palheta de 0,25ml (**MorfLP**).
- 17) Morfologia espermática do sêmen pós-descongelamento pelo método lento e envasado no criotubo de 2ml (**MorfLT**).

3.8 Admissão ao Estudo

Os potenciais voluntários ao estudo foram convidados de acordo com uma carta em anexo (APÊNDICE B), onde foi explicada a finalidade do estudo, com um resumo da metodologia. Após a aceitação do convite, foi preenchido e assinado um termo de consentimento informado pelo voluntário, que pode a qualquer momento solicitar sua exclusão do estudo (APÊNDICE C).

3.9 Coleta de Dados

Na admissão ao estudo, foi preenchida uma ficha individual para cada paciente (APÊNDICE A) a qual foi complementada posteriormente com os dados relativos à avaliação seminal pré e pós-congelamento, pelas diferentes técnicas. As fichas foram preenchidas pelo investigador e arquivadas em fichário próprio do autor, sendo preparadas para digitação.

3.10 Coleta de Sêmen

O voluntário, uma vez admitido ao estudo, agendou, conforme sua conveniência e a disponibilidade do Centro de Reprodução Assistida do Ceará, um horário para coleta de sêmen.

Cada participante da pesquisa, depois de observado um período de abstinência sexual entre três a cinco dias, fez a coleta de sêmen por meio de masturbação, em ambiente adequado, no Centro de Reprodução Assistida do Ceará, e em frasco apropriado. Após a coleta, o sêmen foi encaminhado para processamento.

3.11 Técnica Laboratorial

3.11.1 Avaliação das características físicas e citológicas

Características Físicas

Tempo de liquefação: a amostra de sêmen é mantida em uma placa a uma temperatura de trinta e sete graus Celsius e observado o tempo de liquefação. O valor normal é até sessenta minutos.

Aspecto: observado se a amostra está homogênea ou heterogênea se possuir grânulos gelatinosos que não se liquefazem.

Viscosidade: aspirar um pouco de sêmen em uma pipeta e deixar gotejar. Se o gotejamento for fácil (observar formação de gotas) será classificada como normal.

Volume: transferir o sêmen liquefeito para um tubo cônico graduado Corning e medir o volume, com auxílio de uma pipeta graduada.

pH: colocar a fita de mensuração e anotar o resultado. Esta medida deverá ser executada dentro de uma hora da coleta de sêmen.

Cor: observar a cor. Normal é branco opalescente ou branco acinzentado.

Odor: observar o odor. Normal é *sui generis*.

Exame citológico

Uma alíquota de sêmen é colocada em uma lâmina, coberta com lamínula, observada a presença de leucócitos, hemácias, células epiteliais, debris, fungos e

protozoários. Em caso de presença de hemácias e leucócitos, efetuar contagem em câmara de Makler (FIGURA 1).

3.11.2 Determinação da concentração da amostra

A amostra de sêmen é homogeneizada com o uso de um agitador de tubo. Em seguida, uma alíquota (10µl) é colocada na câmara de contagem de Makler, coberta com lamínula (FIGURA 2). A câmara de Makler foi desenhada especialmente para contagem de espermatozóides por mililitro. Consta de uma câmara e uma tampa que tem gravado um pequeno quadrado de um milímetro, subdividido em cem quadrados menores de 0,1 x 0,1 milímetro. É procedida a contagem de espermatozóides no microscópio óptico em dez quadrados numa objetiva de quarenta vezes e ocular de dez vezes, sendo o número de espermatozóides contados igual à concentração em milhões por mililitro (FIGURA 3). São realizadas, no mínimo, duas contagens. A concentração é definida segundo normas da Organização Mundial de Saúde (WHO,1999):

Normozoospermia: $\geq 20 \times 10^6$ espermatozóides/ ml.

Oligozoospermia: $< 20 \times 10^6$ espermatozóides/ ml.

Polizoospermia: $\geq 200 \times 10^6$ espermatozóides/ ml.

Azoospermia: nenhum espermatozóide no ejaculado.

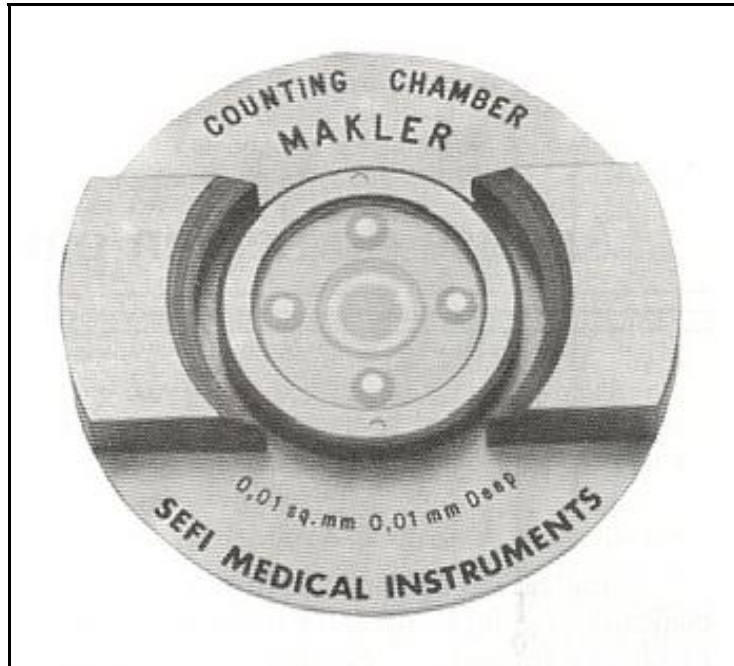


FIGURA 1. Câmara de Makler (Manual do fabricante).

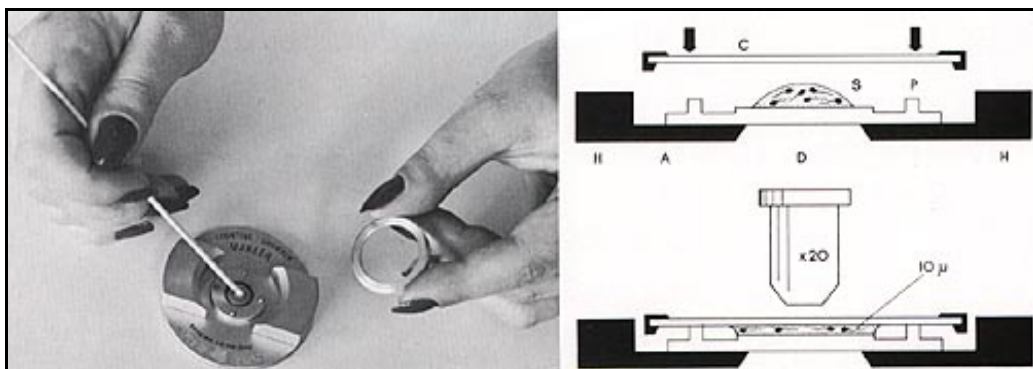


FIGURA 2. Preparo da alíquota de sêmen na câmara de Makler (Manual do fabricante).

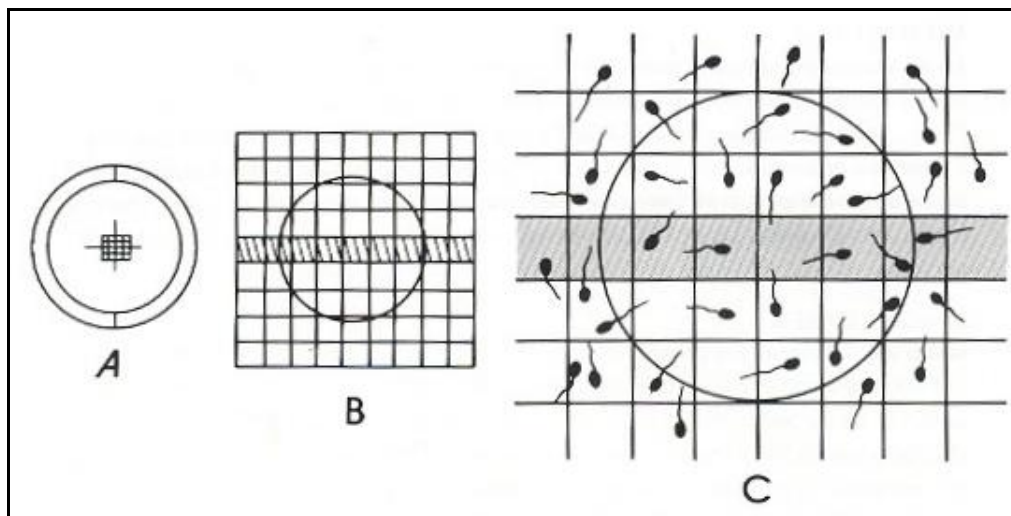


FIGURA 3. Esquema da visão microscópica da câmara de Makler (Manual do fabricante).

3.11.3 Determinação da motilidade da amostra

A grau de motilidade dos espermatozóides também é realizado na câmara de Makler após a determinação da concentração. É contado um total de cem espermatozóides, sendo classificados em grau A, B, C ou D conforme critérios da OMS (ANEXO A), processo feito em duplicata. Caso ocorra uma diferença maior do que dez por cento entre as duas avaliações, deve-se executar uma terceira observação e retirada média das três observações que será relatada como motilidade final. A motilidade é classificada segundo padrões da Organização Mundial de Saúde (WHO,1999):

Grau A: espermatozóides móveis com progressão rápida.

Grau B: espermatozóides móveis com progressão lenta, linear ou não.

Grau C: espermatozóides móveis sem progressão.

Grau D: espermatozóides imóveis.

A amostra será considerada normal ou anormal segundo o critério:

Normal: $\geq 25\%$ grau **A** ou $\geq 50\%$ dos graus **A** e **B**.

Anormal: $< 50\%$ dos graus **A** e **B**.

3.11.4 Determinação da morfologia da amostra

É retirada uma alíquota de sêmen, depois de homogeneizado, para realizar dois esfregaços em lâminas limpas e desengorduradas. Fazer uma coloração de Shorr (ANEXO B) onde, no mínimo, duzentos espermatozóides serão estudados. Classificar os espermatozóides segundo critério de Krüger (ANEXO C).

Técnica para preparo do esfregaço do sêmen (FIGURA 4).

- 1- Colocar 10 μ l de sêmen em uma lâmina.
- 2- Pressionar com uma extensora, formando um ângulo de 30°.
- 3- Deslizar a extensora sobre a lâmina.
- 4- Secar o esfregaço de sêmen ao ar livre.
- 5- Fixar o esfregaço em etanol 75% por um minuto.
- 6- Coloração de Shorr (ANEXO B).

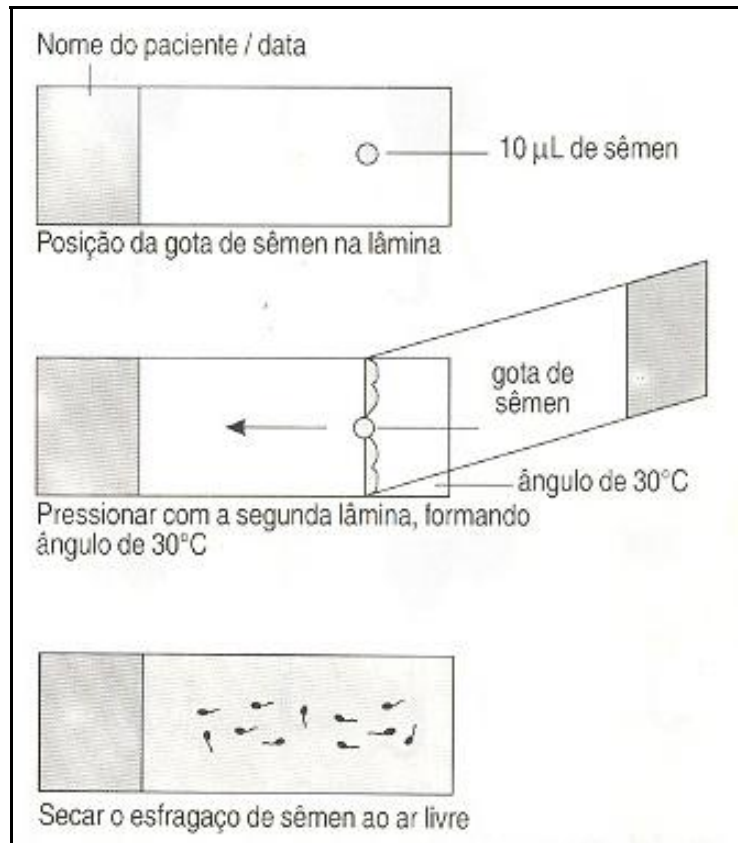


FIGURA 4. Preparo da lâmina.

3.11.5 Determinação da curva de sobrevivência em três horas

Após as análises iniciais, uma nova amostra do sêmen é retirada e mantida a 37°C para a determinação da motilidade com uma, duas e três horas, para determinar curva de sobrevivência dos espermatozóides em três horas. Os valores das variáveis do sêmen *in natura* são utilizados como controle, para comparar com as variáveis após a criopreservação por envase e técnicas diferentes.

3.11.6 Adição do crioprotetor

O meio crioprotetor utilizado é o TEST-YOLK BUFFER, com a seguinte constituição: 48% de solução de TEST (325mOsm de TES com 325mOsm de TRIS), 30% de citrato de sódio, 20% de gema de ovo, 2% de frutose, glicerol com concentração final de 6%, 100.000 unidades de penicilina por mililitro e 100.000µg de sulfato de

estreptomicina por mililitro (PRINS; WEIDEL, 1986) (Irvine Scientific, Califórnia, EUA); estocado, segundo orientação do fabricante, a -10°C e retirado do *freezer* antes de sua utilização, sendo mantido a 37°C .

Terminada a avaliação dos parâmetros do sêmen *in natura* e separada a amostra para determinação da curva de sobrevivência, o meio crioprotetor é adicionado delicadamente, com auxílio de uma seringa e agulha, até uma proporção de 1:1 com a amostra. Finalizada a adição do meio crioprotetor, o sêmen é envasado em palhetas de 0,25 ml e em criotubos de 2ml.

3.11.7 Envase

A solução, sêmen com o crioprotetor, é dividida em partes iguais e envasada em criotubos de 2ml (FIGURA 5) e palhetas de 0,25ml (FIGURA 6), com auxílio de uma seringa. As palhetas são vedadas com um pequeno artefato plástico em uma das extremidades, enquanto os criotubos possuem uma tampa rosqueada. Terminado o envase, as palhetas e criotubos são divididos em dois grupos e encaminhadas para congelação por dois métodos distintos.



FIGURA 5. Criotubo de 2ml.

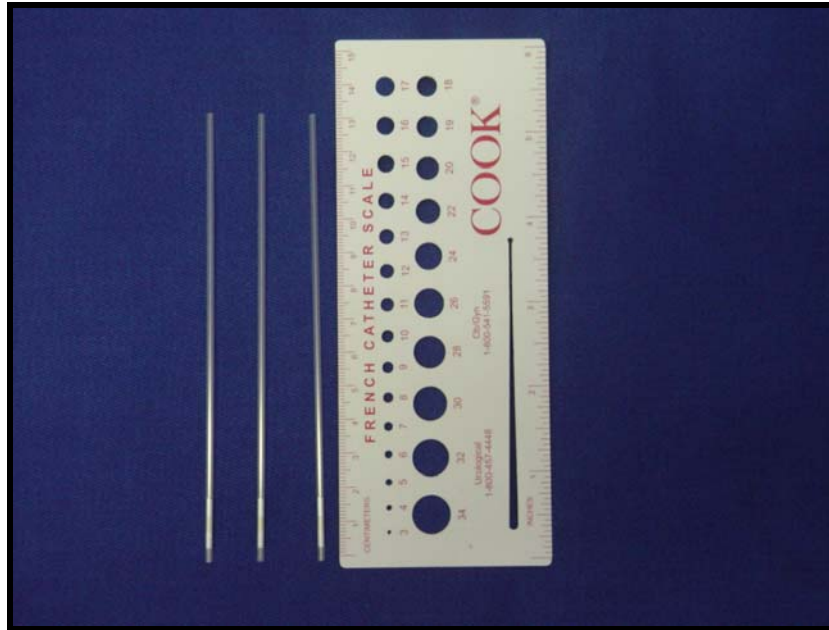


FIGURA 6. Palhetas de 0,25ml.

3.11.8 Congelação pelo método lento (ANEXO D)

Palhetas de 0,25ml e criotubos de 2ml são colocados em compartimento indicado do congelador automático Freezer Control Cryologic, modelo CL8000 (Austrália) e ajustado para o programa de número 6, específico para congelação de sêmen, conforme indicação do fabricante.

O programa de número 6 apresenta as seguintes taxas de resfriamento:

- 1) temperatura inicial da amostra em torno de 25°C.
- 2) Resfriamento inicial de -2°C por minuto até 5°C.
- 3) A amostra permanece a 5°C durante 10 minutos.
- 4) Resfriamento de -1,5°C por minuto de 5°C até -5°C.
- 5) A amostra permanece a -5°C durante 5 minutos.
- 6) Resfriamento de -6°C por minuto de -5°C até -30°C.
- 7) Resfriamento de -4°C por minuto de -30°C até -40°C.
- 8) Após o término do programa, as palhetas e os criotubos são mergulhados em nitrogênio líquido, a uma temperatura de -196°C.



FIGURA 7. Freezer Control Cryologic.

3.11.9 Congelação pelo método rápido (ANEXO E)

Palhetas de 0,25ml e criotubos de 2ml são colocados horizontalmente a cerca de dez centímetros do nitrogênio líquido (vapor de nitrogênio líquido) durante dez minutos. A temperatura inicial da amostra é em torno de 25°C e temperatura final de -80°C, taxa de resfriamento aproximadamente -10°C por minuto e em seguida colocada em nitrogênio líquido a -196°C.



FIGURA 8. Caixa de isopor utilizada para congelação pelo método rápido.

3.11.10 Manutenção da amostra

As amostras são mantidas, por um período de 24 a 48 horas, em botijão de nitrogênio líquido que possui uma temperatura média de -196°C .

3.11.11 Descongelação das amostras

As amostras são descongeladas em temperatura ambiente, variando de 25°C a 30°C , sobre uma bancada do laboratório, por um período de dez minutos e depois mantidas em banho maria a uma temperatura de 37°C por três horas, enquanto são realizadas as análises da motilidade, da curva de sobrevivência e da morfologia. A verificação das motilidades, em cada um dos quatro tratamentos, é realizada com trinta minutos, uma hora, duas horas e três horas. A verificação da morfologia, em cada um dos quatro tratamentos, é realizada com trinta minutos depois da descongelação.

3.11.12 Destino final das amostras

Após a realização de todas as análises pré e pós-congelação, as amostras de sêmen coletadas são descartadas em lixo hospitalar.

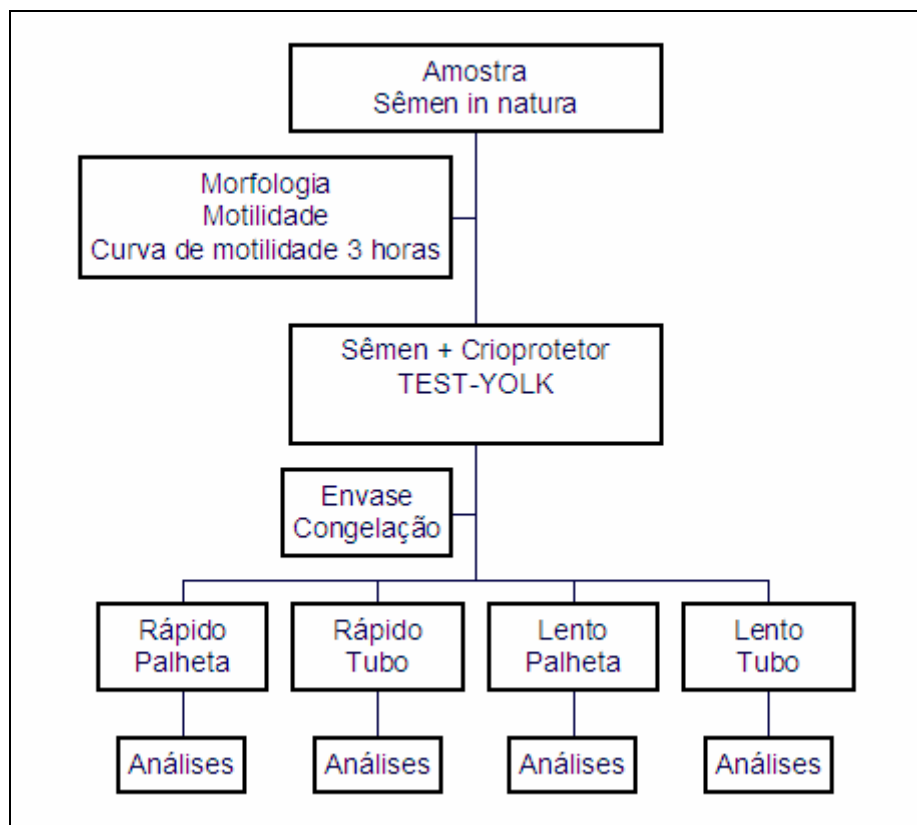


FIGURA 9. Resumo da metodologia do estudo.

3.12 Processamento de dados e análise estatística

As fichas foram preenchidas pelo pesquisador em dois momentos, nas análises do sêmen *in natura* e após a descongelação. Foram arquivadas segundo o número do caso. Os dados coletados foram digitados em programa de computador Microsoft Excel versão 2000 e realizados as análises ao final dos experimentos, utilizando o programa de computador SPSS for Windows versão 11.0.0. Os dados foram expressos como médias e desvios-padrão. Foi calculado o

coeficiente de correlação de Spearman para mensurar a existência de correlação de monotonicidade entre as variáveis (MOOD et al., 1974).

Análise da morfologia

Foi calculado o coeficiente de correlação linear de Pearson, que mensura a existência de relação linear entre as variáveis, e realizado o teste t-Student de médias com dados pareados, que mensura a diferença entre medidas tomadas de uma mesma unidade amostral (MOOD et al., 1974).

Análise da motilidade

Foi calculado o coeficiente de correlação linear de Pearson, que mensura a existência de relação linear entre as variáveis, e realizado o teste t-Student de médias com dados pareados, que mensura a diferença entre medidas tomadas de uma mesma unidade amostral (MOOD et al., 1974).

Análise da motilidade em função do tempo

Foi calculado o coeficiente de correlação linear de Pearson, que mensura a existência de relação linear entre as variáveis e em seguida, em razão da existência de correlação linear, foi estimado o coeficiente angular da reta de regressão linear, existente entre as motilidades de tempos consecutivos, sendo aplicado o teste t-Student para mensurar a existência dessa relação linear (MOOD et al., 1974).

3.13 Aspectos éticos

Os voluntários selecionados para o estudo foram informados sobre os objetivos e metodologia da pesquisa, podendo ou não aceitar dela participar.

Após a informação, pela qual os voluntários souberam que seria colhida uma amostra de sêmen para a realização das análises iniciais, congelamento, descongelamento, análises finais e destino final do sêmen, aqueles que aceitaram participar assinaram um "Termo de Consentimento Pós-

informação" (APÊNDICE C). Foi enfatizado que o sêmen do voluntário seria utilizado somente durante a pesquisa e que, ao final das análises, toda a amostra colhida seria descartada.

A coleta do sêmen foi realizada em ambiente e técnica adequada conforme descrita em material e métodos.

Ao final dos estudos no sêmen do voluntário, foi entregue um relatório com as características de seus espermatozóides pré e pós-criopreservação, realizados os devidos esclarecimentos e sanadas as dúvidas que porventura existiram.

O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, bem como pelo corpo clínico do Centro de Reprodução Assistida do Ceará. Foram resguardados os princípios enunciados na Declaração de Helsinque de 1964 e suas versões posteriores.

Foram seguidas as orientações da resolução de número 196 de 10 de outubro de 1996 do Conselho Nacional de Saúde, que determina as normas e diretrizes regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Análise inicial das amostras de sêmen

O presente estudo analisou dezoito amostras de sêmen de dezoito voluntários, no período de janeiro a agosto de 2004, que apresentavam uma idade média de $33,9 \pm 5,2$ anos, variando de 26 a 44 anos.

As análises das variáveis iniciais, volume, concentração, morfologia e motilidade espermática, por meio do coeficiente de correlação de Spearman, revelaram uma ausência de correlação, sugerindo uma independência entre tais variáveis (TABELA 1).

TABELA 1 – Análise das correlações de monotonicidade (Spearman) entre as variáveis iniciais.

Variáveis	discriminação	Volume	Concentração	Morfologia	Motilidade
Volume	correlação	1	0,1881	-0,2938	-0,0089
	p-valor	--	0,4549	0,2366	0,9720
Concentração	correlação	0,1881	1	0,3108	0,1628
	p-valor	0,4549	--	0,2093	0,5187
Morfologia	correlação	-0,2938	0,3108	1	-0,2125
	p-valor	0,2366	0,2093	--	0,3973
Motilidade	Correlação	-0,0089	0,1628	-0,2125	1
	p-valor	0,9720	0,5187	0,3973	--

O estudo inicial, prévio à criopreservação, das amostras de sêmen revelou: um volume inicial médio de $3,5 \pm 1$ ml (variando de 2 a 5,5ml), concentração de espermatozóides por ml de $81,4 \pm 46,6$ milhões (20 a 187 milhões), morfologia normal (percentagem de

espermatozoides normais segundo o critério de Krüger) média de $14,2 \pm 4,6\%$ (8 a 24%), motilidade (percentagem de espermatozoides com motilidade progressiva, Grau A + B) inicial média de $58,1 \pm 11,5\%$ (32 a 78%), com uma hora de $52,1 \pm 11\%$, com duas horas $45 \pm 11,2\%$ e com três horas $35,2 \pm 15,7\%$ (TABELA 2).

TABELA 2 - Características seminais iniciais.

Caso	Volume Inicial (ml)	Concentração Inicial ($\times 10^6/\text{ml}$)	Motilidade Inicial (%)	Motilidade 1 hora (%)	Motilidade 2 horas (%)	Motilidade 3 horas (%)	Morfologia (%)
1	4	177	52	52	42	49	17
2	2	183	67	62	52	44	24
3	4,5	115	62	48	42	36	14
4	4	94	54	49	44	41	17
5	3	20	57	45	29	16	8
6	3,5	53	65	45	50	49	15
7	5,5	77	78	61	55	42	8
8	4,8	52	55	57	36	30	10
9	3,5	93	32	40	36	25	18
10	4	48	66	60	63	53	13
11	4	100	56	37	31	7	18
12	2,5	56	71	74	62	61	9
13	4,5	100	54	50	45	45	9
14	2,5	125	68	59	44	26	14
15	2	30	36	31	23	18	9
16	2,5	43	49	47	45	40	18
17	4	51	60	51	56	45	15
18	2,6	48	64	69	55	7	20
Média	3,5	81,4	58,1	52,1	45	35,2	14,2
DP(\pm)	1	46,6	11,5	11	11,2	15,7	4,6

Motilidade: percentual de espermatozoides móveis (Grau A+B). Morfologia: percentual de espermatozoides com morfologia normal segundo os critérios de Krüger.

A análise da motilidade espermática com uma, duas e três horas revelou uma diminuição progressiva com o passar do tempo, porém essa redução não é homogênea, sendo menor nas primeiras duas horas e maior da segunda para a terceira hora. Observou-se uma motilidade de 88,9% da motilidade inicial na primeira hora, na segunda hora existe uma motilidade de 86,2% da motilidade verificada na primeira hora e na terceira hora existe uma motilidade de 79,0% da motilidade apresentada na segunda hora (TABELA 3) (FIGURA 9). Pode-se destacar, ainda, que a redução não pode ser tomada como uma regressão linear em função do tempo, pois, com o passar das horas, a redução tem maior intensidade do que nas primeiras horas.

TABELA 3 - Análise das regressões em relação à redução de motilidade prévia a congelação. Modelo de análise $Y = \beta X + \epsilon$.

Variáveis da regressão	estimativa de β	Valor t-calculado	Significância
M. 1 hora x M. inicial	88,9%	28,962	0,0000
M. 2 horas x M. 1 hora	86,2%	28,395	0,0000
M. 3 horas x M. 2 horas	79,0%	12,969	0,0000

M. 1 hora x M.inicial: percentual de espermatozoides móveis após uma hora, em relação à motilidade inicial. M. 2 horas x M. 1 hora: percentual de espermatozoides móveis após duas horas, em relação à motilidade da primeira hora. M. 3 horas x M. 2 horas: percentual de espermatozoides móveis após três horas, em relação à motilidade da segunda hora.

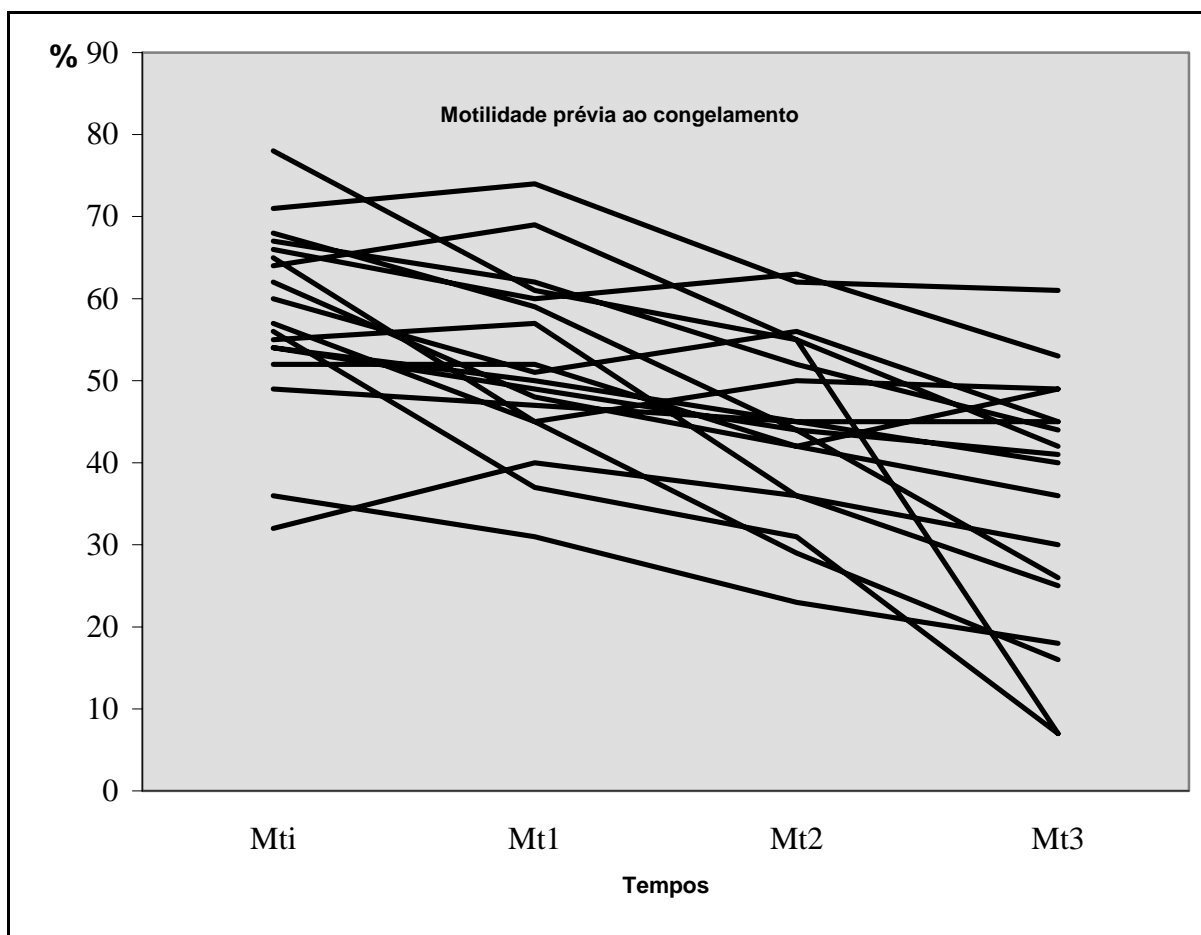


FIGURA 10. Curva de motilidade espermática prévia a congelamento.

4.2 Congelamento Rápido com Envase em Palheta (RP)

Após a descongelamento das amostras submetidas ao processo rápido e envasadas em palheta (RP), foram encontrados os seguintes resultados: morfologia normal média de $12,8 \pm 5,4\%$, motilidade inicial média de $19,2 \pm 13,5\%$, com uma hora $13,5 \pm 12,0\%$, com duas horas $9,2 \pm 8,3\%$ e com três horas $5,7 \pm 5,5\%$ (TABELA 16).

No tratamento RP, o percentual de recuperação de espermatozoides móveis trinta minutos após a descongelamento foi de 32,3% da motilidade inicial, após uma hora foi de 73,5% da motilidade após trinta minutos, após duas horas foi de 63,9% da motilidade após uma hora e após três horas foi de 58,1% da motilidade após duas horas (TABELA 4) (FIGURA 10).

TABELA 4 - Análise das regressões em relação à redução de motilidade no tratamento RP.
 Modelo de análise $Y = \beta X + \varepsilon$.

Variáveis da regressão	estimativa de β	valor t-calculado	Significância
M. 1/2 hora x M.inicial	32,3%	5,936	0,0000
M. 1 hora x M. 1/2 hora	73,5%	13,579	0,0000
M. 2 horas x M. 1 hora	63,9%	10,378	0,0000
M. 3 horas x M. 2 horas	58,1%	9,301	0,0000

M. 1/2 hora x M.inicial: percentual de espermatozoides móveis após trinta minutos de descongelada a amostra, em relação à motilidade inicial. M. 1 hora x M. 1/2 hora: percentual de espermatozoides móveis após uma hora, em relação à motilidade dos primeiros trinta minutos. M. 2 horas x M. 1 hora: percentual de espermatozoides móveis após duas horas, em relação à motilidade da primeira hora. M. 3 horas x M. 2 horas: percentual de espermatozoides móveis após três horas, em relação à motilidade da segunda hora.

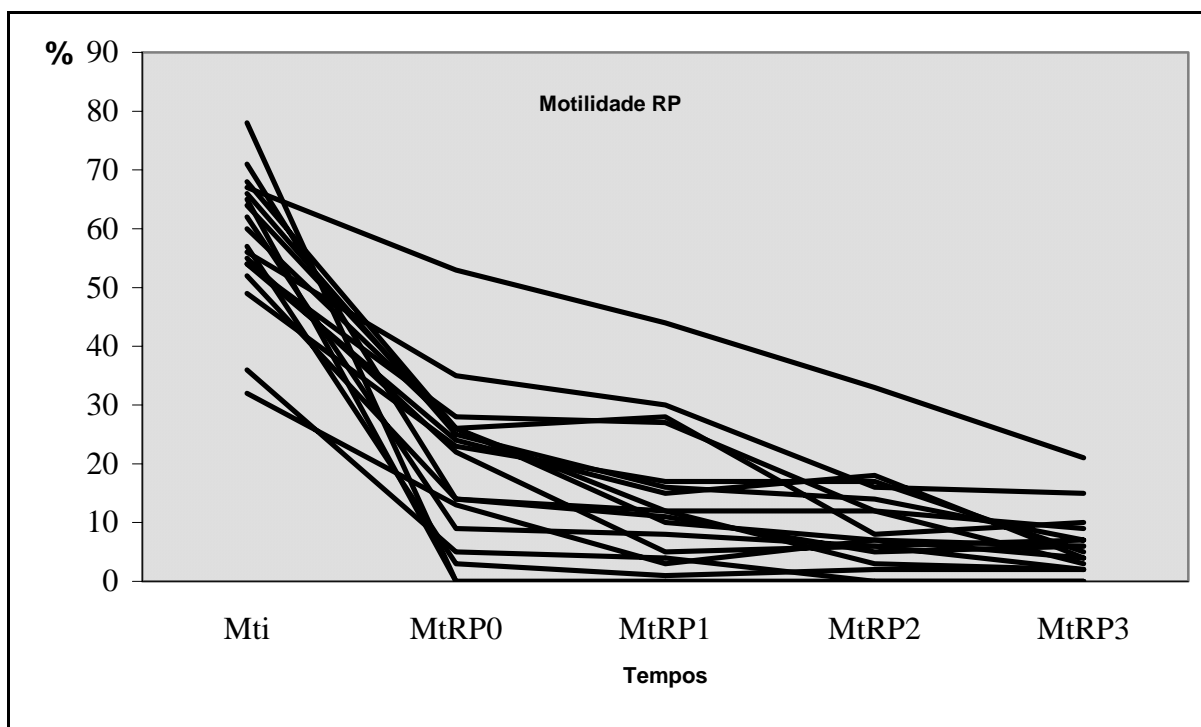


FIGURA 11. Alteração da motilidade espermática após o tratamento RP.

4.3 Congelação Rápida com Envase em Criotubo (RT)

Após a descongelação das amostras submetidas ao processo rápido e envasadas em criotubo (RT), foram encontrados os seguintes resultados: morfologia normal média de $12,6 \pm 5,7\%$, motilidade inicial média de $27,0 \pm 15,4\%$, com uma hora $21,6 \pm 10,1\%$, com duas horas $17,7 \pm 11,2\%$ e com três horas $13,1 \pm 8,0\%$ (TABELA 16).

No tratamento RT, o percentual de recuperação de espermatozóides móveis trinta minutos após a descongelação foi de 46,7% da motilidade inicial, após uma hora foi de 74,1% da motilidade após trinta minutos, após duas horas foi de 81,5% da motilidade após uma hora e após três horas foi de 68,5% da motilidade após duas horas (TABELA 5) (FIGURA 11).

TABELA 5 - Análise das regressões em relação à redução de motilidade no tratamento RT.

Modelo de análise $Y = \beta X + \varepsilon$.

Variáveis da regressão	estimativa de β	Valor t-calculado	Significância
M. 1/2 hora x M.inicial	46,7%	8,211	0,0000
M. 1 hora x M. 1/2 hora	74,1%	12,535	0,0000
M. 2 horas x M. 1 hora	81,5%	12,201	0,0000
M. 3 horas x M. 2 horas	68,5%	10,572	0,0000

M. 1/2 hora x M.inicial: percentual de espermatozóides móveis após trinta minutos de descongelada a amostra, em relação à motilidade inicial. M. 1 hora x M. 1/2 hora: percentual de espermatozóides móveis após uma hora, em relação à motilidade dos primeiros trinta minutos. M. 2 horas x M. 1 hora: percentual de espermatozóides móveis após duas horas, em relação à motilidade da primeira hora. M. 3 horas x M. 2 horas: percentual de espermatozóides móveis após três horas, em relação à motilidade da segunda hora.

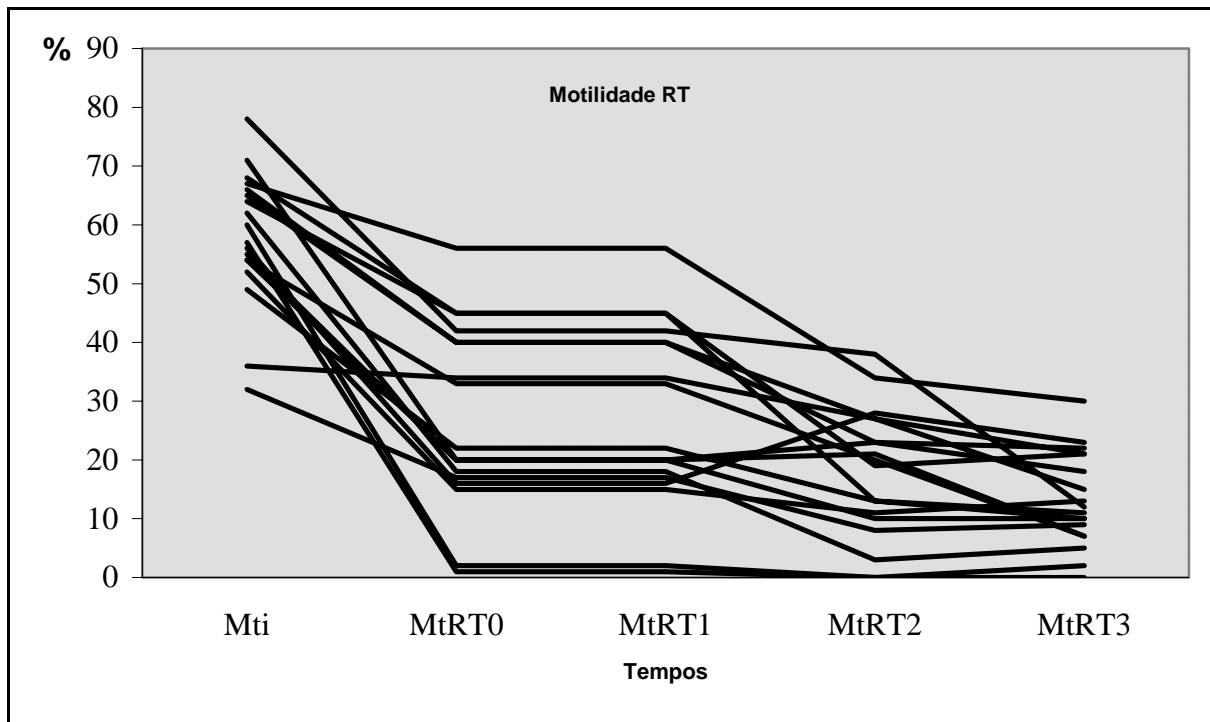


FIGURA 12. Alteração da motilidade espermática após o tratamento RT.

4.4 Congelação Lenta com Envase em Palheta (LP)

Após a descongelação das amostras submetidas ao processo lento e envasadas em palheta (LP), foram encontrados os seguintes resultados: morfologia normal média de $12,6 \pm 5,8\%$, motilidade inicial média de $21,1 \pm 16,2\%$, com uma hora $18,3 \pm 15,7\%$, com duas horas $13,9 \pm 14,3\%$ e com três horas $9,2 \pm 9,0\%$ (TABELA 16).

No tratamento LP, o percentual de recuperação de espermatozóides móveis trinta minutos após a descongelação foi de 38,2% da motilidade inicial, após uma hora foi de 87,6% da motilidade após trinta minutos, após duas horas foi de 81,3% da motilidade após uma hora e após três horas foi de 62,6% da motilidade após duas horas (TABELA 6) (FIGURA 12).

TABELA 6 - Análise das regressões em relação à redução de motilidade no tratamento LP.

Modelo de análise $Y = \beta X + \varepsilon$.

Variáveis da regressão	estimativa de β	valor t-calculado	Significância
M. 1/2 hora x M.inicial	38,2%	6,931	0,0000
M. 1 hora x M. 1/2 hora	87,6%	15,005	0,0000
M. 2 horas x M. 1 hora	81,3%	22,876	0,0000
M. 3 horas x M. 2 horas	62,6%	16,557	0,0000

M. 1/2 hora x M.inicial: percentual de espermatozoides móveis após trinta minutos de descongelada a amostra, em relação à motilidade inicial. M. 1 hora x M. 1/2 hora: percentual de espermatozoides móveis após uma hora, em relação à motilidade dos primeiros trinta minutos. M. 2 horas x M. 1 hora: percentual de espermatozoides móveis após duas horas, em relação à motilidade da primeira hora. M. 3 horas x M. 2 horas: percentual de espermatozoides móveis após três horas, em relação à motilidade da segunda hora.

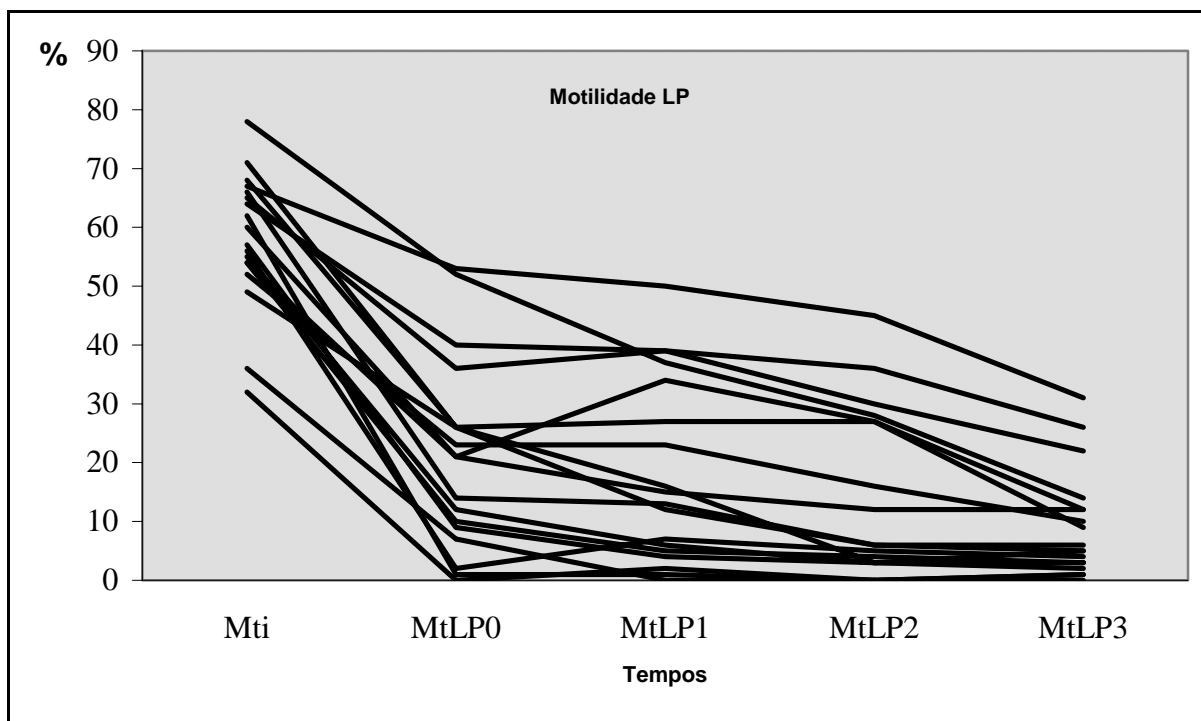


FIGURA 13. Alteração da motilidade espermática após o tratamento LP.

4.5 Congelação Lenta com Envase em Criotubo (LT)

Após a descongelação das amostras submetidas ao processo lento e envasadas em criotubo (LT), foram encontrados os seguintes resultados: morfologia normal média de $12,4 \pm 4,7$ %, motilidade inicial média de $30,3 \pm 14,2$ %, com uma hora $28,7 \pm 11,2$ %, com duas horas $25,1 \pm 12,7$ % e com três horas $16,7 \pm 9,0$ % (TABELA 16).

No tratamento LT, o percentual de recuperação de espermatozóides móveis trinta minutos após a descongelação foi de 50,4% da motilidade inicial, após uma hora foi de 87,8% da motilidade após trinta minutos, após duas horas foi de 89,4% da motilidade após uma hora e após três horas foi de 63,8% da motilidade após duas horas (TABELA 7) (FIGURA 13).

TABELA 7 - Análise das regressões em relação à redução de motilidade no tratamento LT. Modelo de análise $Y = \beta X + \varepsilon$.

Variáveis da regressão	estimativa de β	valor t-calculado	Significância
M. 1/2 hora x M.inicial	50,4%	8,270	0,0000
M. 1 hora x M. 1/2 hora	87,8%	13,230	0,0000
M. 2 horas x M. 1 hora	89,4%	20,307	0,0000
M. 3 horas x M. 2 horas	63,8%	12,131	0,0000

M. 1/2 hora x M.inicial: percentual de espermatozóides móveis após trinta minutos de descongelada a amostra, em relação à motilidade inicial. M. 1 hora x M. 1/2 hora: percentual de espermatozóides móveis após uma hora, em relação à motilidade dos primeiros trinta minutos. M. 2 horas x M. 1 hora: percentual de espermatozóides móveis após duas horas, em relação à motilidade da primeira hora. M. 3 horas x M. 2 horas: percentual de espermatozóides móveis após três horas, em relação à motilidade da segunda hora.

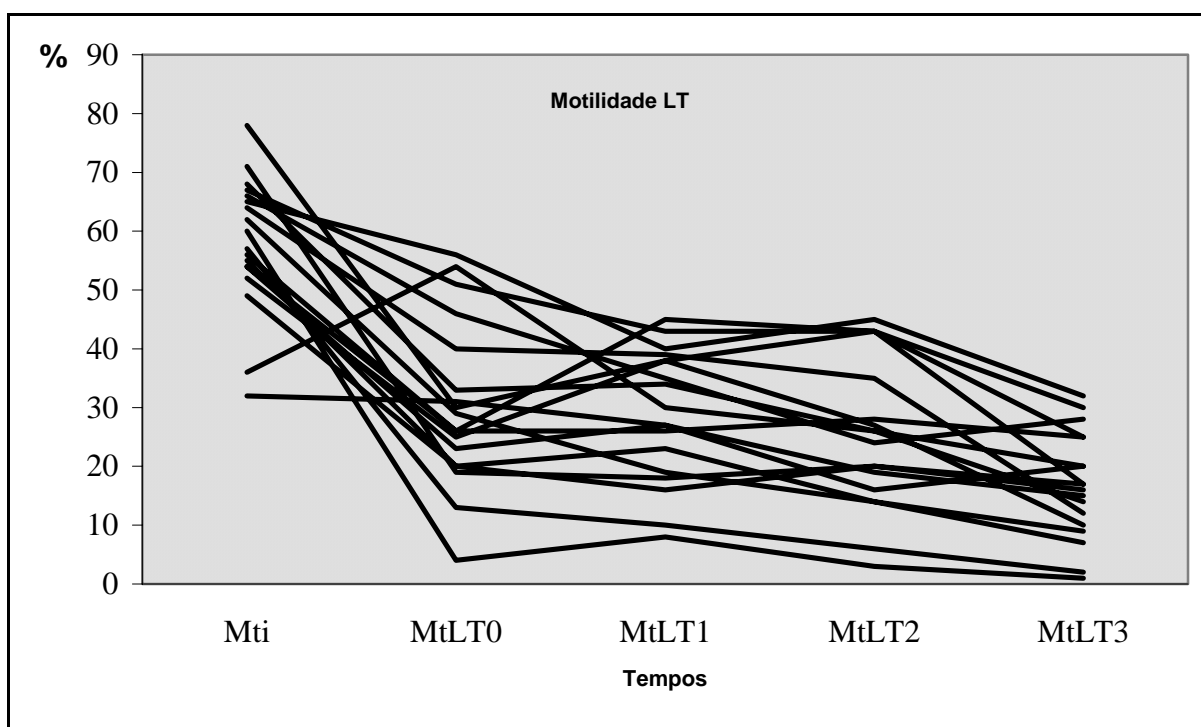


FIGURA 14. Alteração da motilidade espermática após o tratamento LT.

4.6 Análise Comparativa da Morfologia Espermática

O estudo da morfologia inicial comparada com a morfologia após cada tratamento, RP, RT, LP e LT, revelou uma diminuição dos espermatozoides morfologicamente normais, sendo os níveis de significância, do teste de diferença de médias pareadas, dados respectivamente por: 0,0467; 0,0963; 0,0141 e 0,0090 (TABELA 8). Observa-se também uma forte correlação linear positiva (Pearson) entre as morfologias após os tratamentos e a morfologia inicial (FIGURA 14), sendo, após o processo de congelamento e descongelamento, a morfologia mantida em valores em torno de 90% dos valores iniciais.

TABELA 8 - Comparação da alteração da morfologia inicial nos diferentes tratamentos.

Tipos	média	desvio-padrão	Correlação linear	p-valor	diferença média	desvio-padrão	valor t-Student	p-valor
Inicial	14,2	4,647	--	--	--	--	--	--
RP	12,8	5,415	0,8618	0,0000	-1,39	2,747	-2,15	0,0467
RT	12,6	5,689	0,7355	0,0005	-1,61	3,883	-1,76	0,0963
LP	12,6	5,832	0,9106	0,0000	-1,61	2,500	-2,73	0,0141
LT	12,4	4,754	0,8425	0,0000	-1,83	2,640	-2,95	0,0090

Nota: dados apresentados estão relacionados com a morfologia inicial.

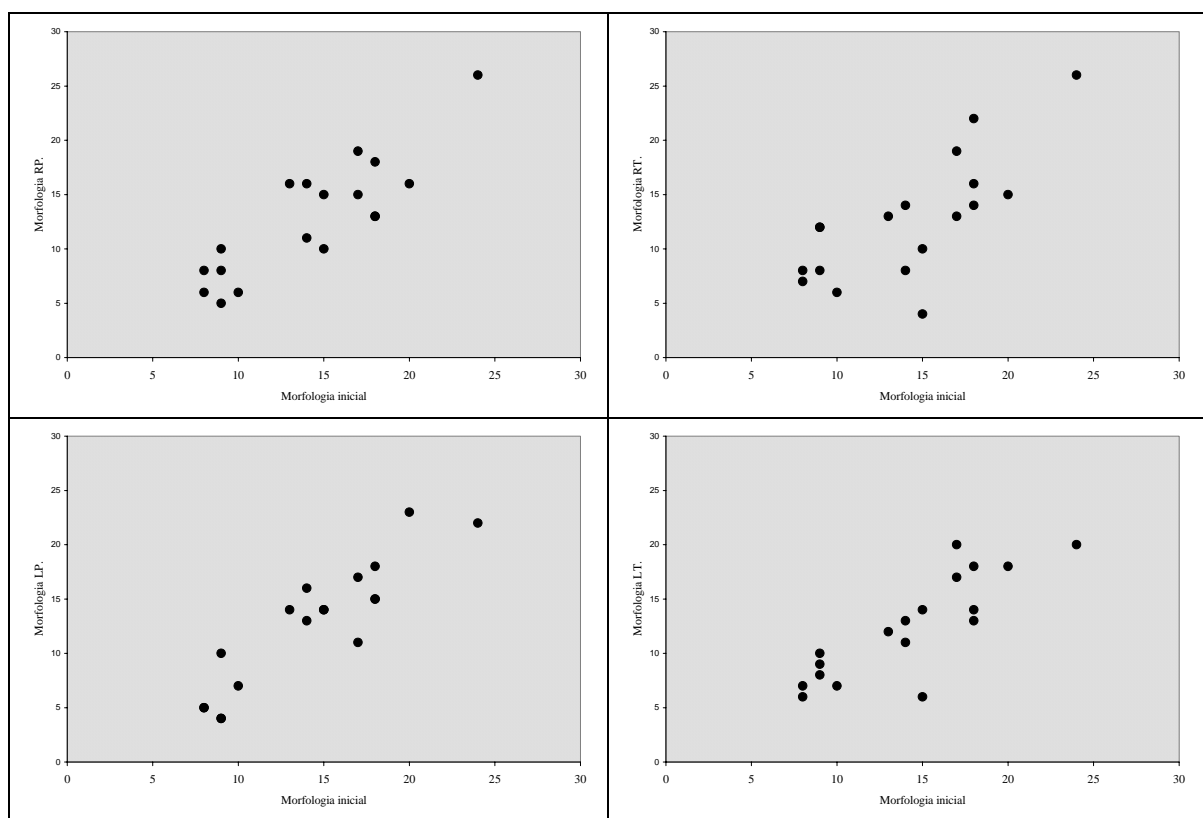


FIGURA 15. Comparação das morfologias nos diferentes tratamentos.

Quando analisadas entre os tratamentos, as morfologias não apresentam diferenças estatísticas (TABELA 9). As morfologias, nos diversos tratamentos, apresentam forte correlação linear positiva. Isso significa que valores de morfologia mais altos em um tratamento estão associados a valores altos nos demais tratamentos ($p < 0,0030$).

TABELA 9 - Comparação das morfologias nos diferentes tratamentos.

Tipos	média	desvio-padrão	correlação linear	p-valor	diferença média	desvio-padrão	valor t	p-valor
RP	12,8	5,415	0,7653	0,0002	0,22	3,813	0,25	0,8076
RT	12,6	5,689						
LP	12,6	5,832	0,7461	0,0004	0,22	3,904	0,24	0,8121
LT	12,4	4,754						
RP	12,8	5,415	0,8397	0,0000	0,22	3,209	0,29	0,7725
LP	12,6	5,832						
RT	12,6	5,689	0,8540	0,0000	0,22	2,962	0,32	0,7541
LT	12,4	4,754						
RP	12,8	5,415	0,8366	0,0000	0,44	2,975	0,63	0,5346
LT	12,4	4,754						
RT	12,6	5,689	0,6582	0,0030	0,00	4,765	0,00	1,0000
LP	12,6	5,832						

4.7 Análise Comparativa da Motilidade Espermática

O estudo da motilidade inicial comparada à motilidade medida com trinta minutos após a descongelação apresenta valores menores em todos os tratamentos ($p=0,0000$) (TABELA 10). No método LP, existe uma correlação linear positiva (coeficiente de correlação de Pearson 0,6413 com $p=0,0041$) (FIGURA 15).

TABELA 10 – Comparação da alteração da motilidade inicial nos diferentes tratamentos

Tipos	média	desvio- padrão	Correlação linear	p-valor	diferença média	desvio- padrão	valor t- Student	p-valor
Inicial	58,1	11,48	--	--	--	--	--	--
RP	19,2	13,47	0,0907	0,7204	-38,89	16,89	-9,77	0,0000
RT	27,0	15,45	0,3857	0,1139	-31,11	15,29	-8,64	0,0000
LP	21,1	16,17	0,6413	0,0041	-37,06	12,45	-12,62	0,0000
LT	30,3	14,25	0,0195	0,9387	-27,78	18,12	-6,50	0,0000

Nota: os dados apresentados estão relacionados com a morfologia inicial, com exceção da média e desvio-padrão.

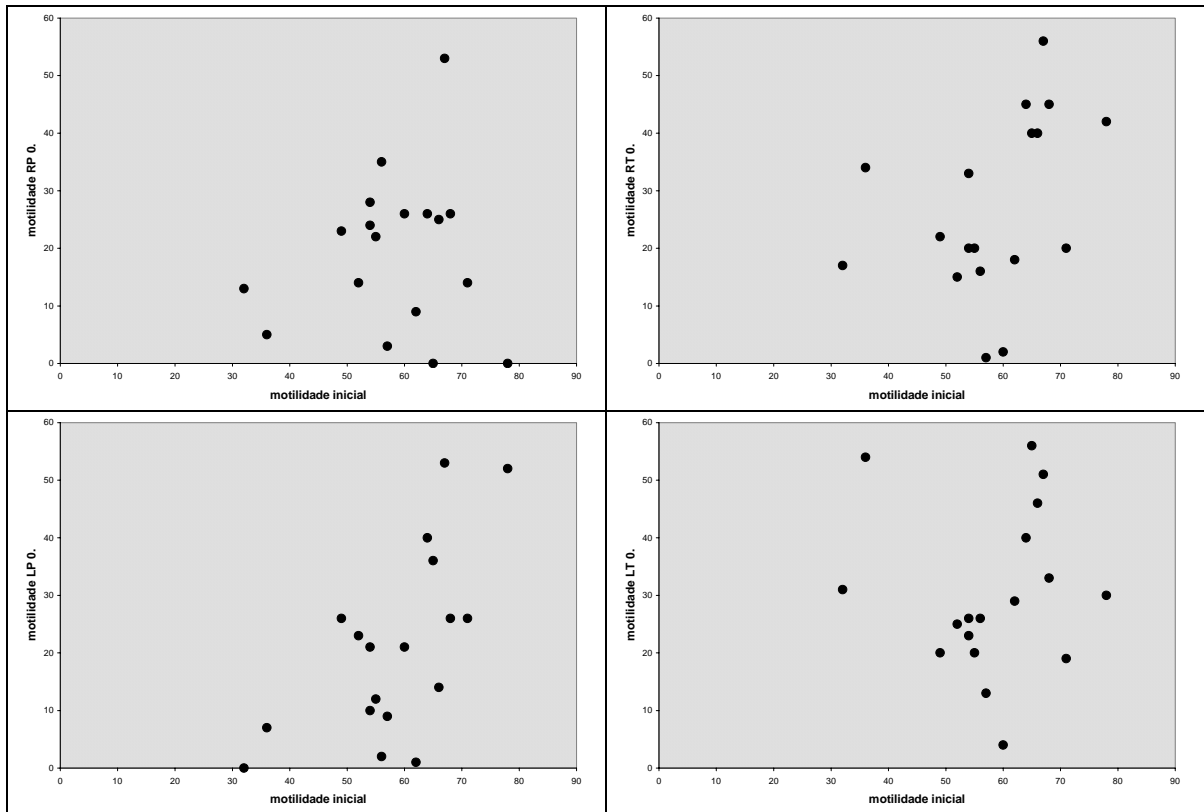


FIGURA 16. Comparação da alteração da motilidade inicial nos diferentes tratamentos após trinta minutos de descongelamento.

Em relação às correlações entre os valores de motilidade, pode-se destacar que os tratamentos RT e LT apresentam uma forte correlação linear (Pearson), em todos os tempos analisados, sendo verificadas algumas correlações positivas entre os outros tratamentos somente em alguns tempos analisados (FIGURA 16).

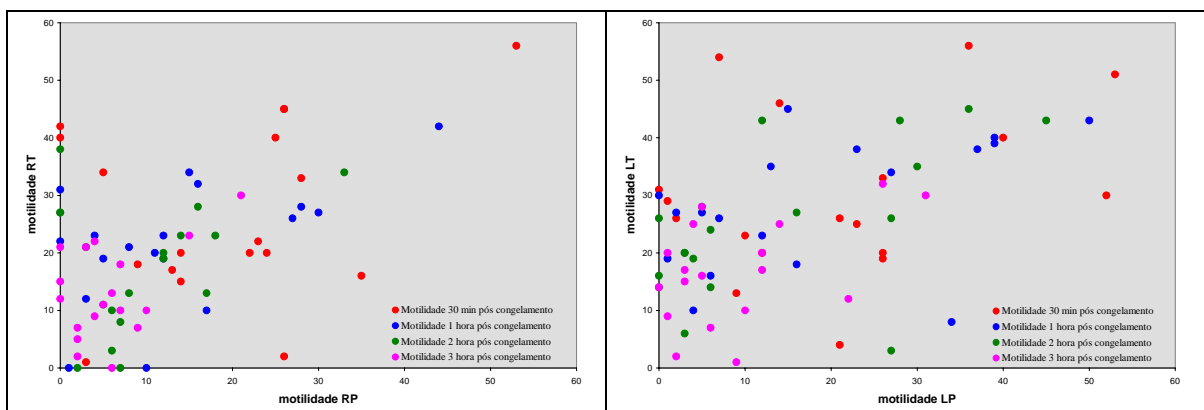


FIGURA 17. Comparação da motilidade nos diferentes tratamentos e tempos.

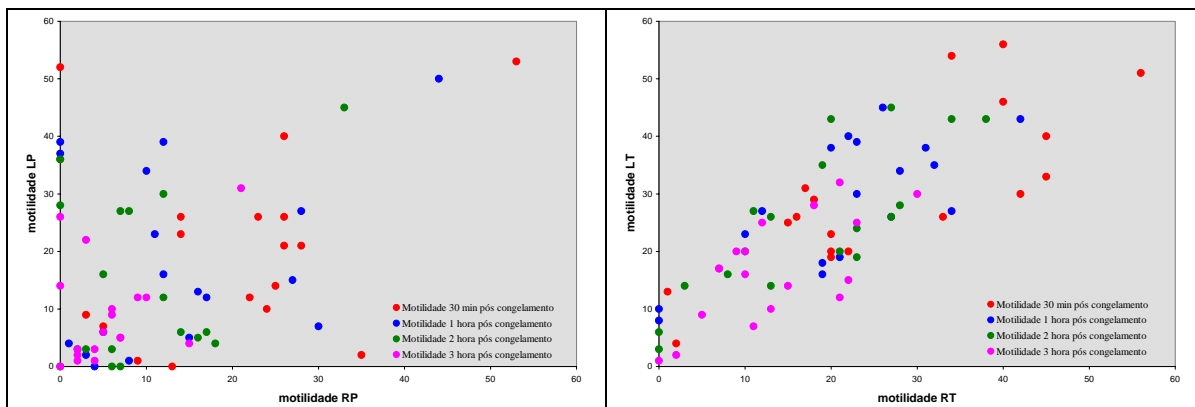


FIGURA 17 (continuação). Comparação da motilidade nos diferentes tratamentos e tempos.

O envase em criotubo (T) está relacionado a uma recuperação maior da motilidade após criopreservação do que o envase em palheta (P), em todos os tempos analisados, em ambos os métodos, rápido e lento (TABELA 11) (TABELA 12).

TABELA 11 - Comparação das motilidades nos tratamentos RP x RT.

Tipos	média	desvio-padrão	correlação linear	p-valor	diferença média	desvio-padrão	Valor t	p-valor
RP0	19,2	13,47	0,2753	0,2688	-7,78	17,478	-1,888	0,0762
RT0	27,0	15,45						
RP1	13,5	12,04	0,5357	0,0220	-8,11	11,114	-3,096	0,0066
RT1	21,6	10,94						
RP2	9,2	8,34	0,2644	0,2890	-8,44	12,035	-2,977	0,0085
RT2	17,7	11,16						
RP3	5,7	5,45	0,4463	0,0634	-7,39	7,413	-4,229	0,0006
RT3	13,1	8,01						

TABELA 12 - Comparação das motilidades nos tratamentos LP x LT.

Tipos	média	desvio- padrão	correlação linear	p-valor	diferença média	desvio- padrão	valor t	p-valor
LP0	21,1	16,17	0,2936	0,2369	-9,28	18,139	-2,170	0,0445
LT0	30,3	14,25						
LP1	18,3	15,72	0,4873	0,0402	-10,33	14,180	-3,092	0,0066
LT1	28,7	11,22						
LP2	13,9	14,35	0,5870	0,0104	-11,17	12,382	-3,826	0,0014
LT2	25,1	12,70						
LP3	9,2	9,01	0,4712	0,0484	-7,44	9,288	-3,401	0,0034
LT3	16,7	9,05						

Sendo comparados os mecanismos de congelação Rápido (R) e Lento (L), quando o envase foi realizado em palheta, a recuperação da motilidade não apresentou valores com diferenças significativas (TABELA 13), porém o envase em criotubo com congelação lenta apresentou motilidade superior que congelação rápida (TABELA 14).

TABELA 13 – Comparação das motilidades nos tratamentos RP x LP.

Tipos	média	Desvio-padrão	correlação linear	p-valor	diferença média	Desvio-padrão	valor t	p-valor
RP0	19,2	13,47	0,1763	0,4840	-1,83	19,132	-0,407	0,6894
LP0	21,1	16,17						
RP1	13,5	12,04	0,2811	0,2585	-4,83	16,898	-1,213	0,2415
LP1	18,3	15,72						
RP2	9,2	8,34	0,2605	0,2966	-4,72	14,604	-1,372	0,1879
LP2	13,9	14,35						
RP3	5,7	5,45	0,3555	0,1476	-3,50	8,719	-1,703	0,1068
LP3	9,2	9,01						

TABELA 14 – Comparação das motilidades nos tratamentos RT x LT.

Tipos	média	Desvio-padrão	correlação linear	p-valor	diferença média	Desvio-padrão	valor t	p-valor
RT0	27,0	15,45	0,7950	0,0001	-3,33	9,573	-1,477	0,1579
LT0	30,3	14,25						
RT1	21,6	10,94	0,7285	0,0006	-7,06	8,171	-3,664	0,0019
LT1	28,7	11,22						
RT2	17,7	11,16	0,8024	0,0001	-7,44	7,641	-4,134	0,0007
LT2	25,1	12,70						
RT3	13,1	8,01	0,6844	0,0017	-3,56	6,845	-2,204	0,0416
LT3	16,7	9,05						

Quando a motilidade é comparada entre os tratamentos analisados, observa-se que LT possui valores de recuperação de motilidade superior a todos os outros tratamentos, em todos os tempos, porém essa diferença é menor no tempo de trinta minutos após a descongelação, quando comparado com o tratamento RT ($p=0,1579$) (TABELA 14). O tratamento RT possui valores superiores à RP em todos os tempos analisados (TABELA 11). O tratamento RT possui valores superiores à LP, nos tempos trinta minutos após a descongelação ($p=0,0705$) e três horas após a descongelação ($p=0,0600$), não apresentando diferença significativa nos tempos uma hora após a descongelação ($p=0,4080$) e duas horas após a descongelação ($p=0,2930$) (TABELA 15). Na comparação entre LP e RP, não são verificadas diferenças estatisticamente significativas entre as motilidades (TABELA 13).

TABELA 15 – Comparação das motilidades nos tratamentos RP x LT e RT x LP.

Tipos	média	Desvio- padrão	correlação linear	p-valor	Diferença		valor t	p-valor
					Média	desvio- padrão		
RP0	19,2	13,47	0,0119	0,9628	-11,11	19,490	-2,419	0,0271
LT0	30,3	14,25						
RP1	13,5	12,04	0,3720	0,1285	-15,17	13,049	-4,931	0,0001
LT1	28,7	11,22						
RP2	9,2	8,34	0,1680	0,5052	-15,89	13,974	-4,824	0,0002
LT2	25,1	12,70						
RP3	5,7	5,45	0,3365	0,1721	-10,94	8,855	-5,244	0,0001
LT3	16,7	9,05						
RT0	27,0	15,45	0,6591	0,0029	5,94	13,068	1,930	0,0705
LP0	21,1	16,17						
RT1	21,6	10,94	0,2853	0,2511	3,28	16,392	0,848	0,4080
LP1	18,3	15,72						
RT2	17,7	11,16	0,3709	0,1298	3,72	14,551	1,085	0,2930
LP2	13,9	14,35						
RT3	13,1	8,01	0,5428	0,0199	3,89	8,188	2,015	0,0600
LP3	9,2	9,01						

TABELA 16 - Características seminais antes e após a criopreservação nos diferentes tratamentos.

	Sêmen <i>in natura</i>	Pós-descongelção			
		Método Rápido		Método Lento	
		Palheta (RP)	Tubo (RT)	Palheta (LP)	Tubo (LT)
Volume (ml)	3,5 ± 1,0	-	-	-	-
Conc.(x10 ⁶ /ml)	81,4 ± 46,6	-	-	-	-
Mot.inicial (%)	58,1 ± 11,5	19,2 ± 13,5	27,0 ± 15,4	21,1 ± 16,2	30,3 ± 14,2
1 hora	52,1 ± 11	13,5 ± 12,0	21,6 ± 10,9	18,3 ± 15,7	28,7 ± 11,2
2 horas	45 ± 11,2	9,2 ± 8,3	17,7 ± 11,2	13,9 ± 14,3	25,1 ± 12,7
3 horas	35,2 ± 15,7	5,7 ± 5,4	13,1 ± 8,0	9,2 ± 9,0	16,7 ± 9,0
Morfologia (%)	14,2 ± 4,6	12,8 ± 5,4	12,6 ± 5,7	12,6 ± 5,8	12,4 ± 4,7

Conc.: concentração de espermatozoides em milhões por mililitro. Mot.: percentual de espermatozoides móveis (Grau A+B). Morfologia: percentual de espermatozoides com morfologia normal segundo os critérios de Krüger.

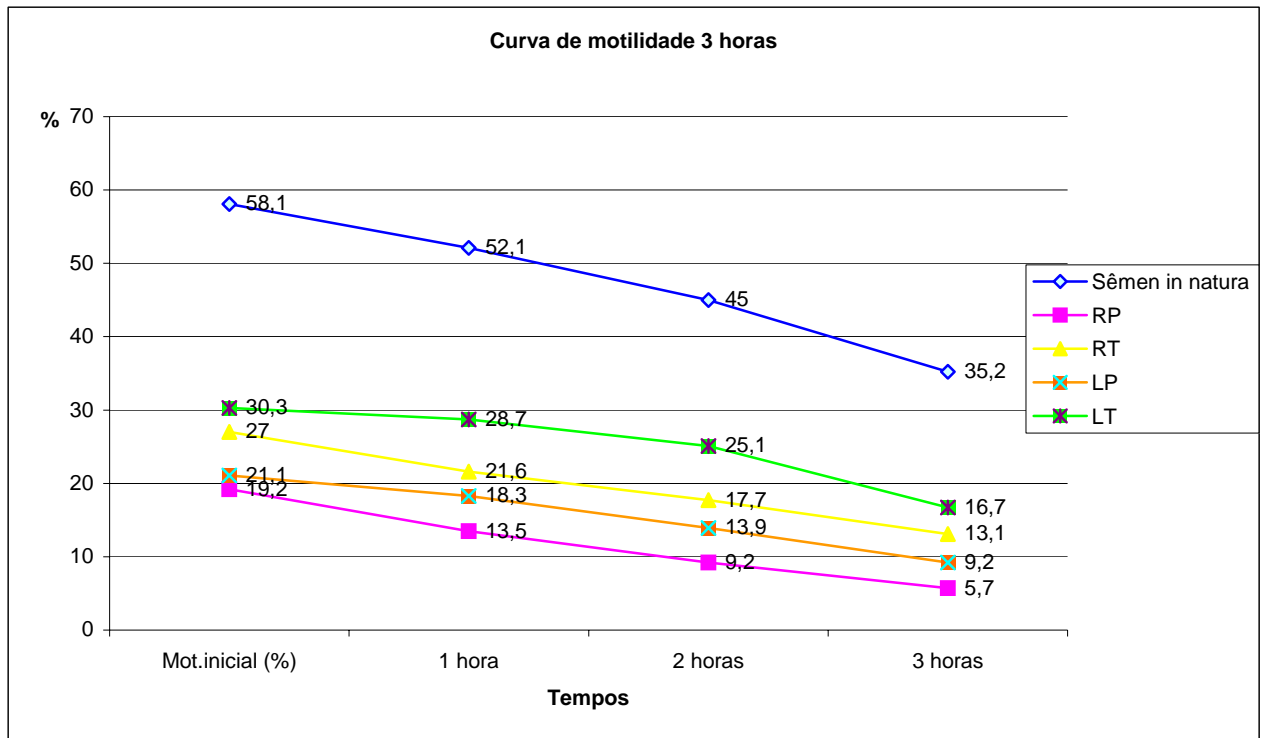


FIGURA 18. Curva de motilidade em três horas.

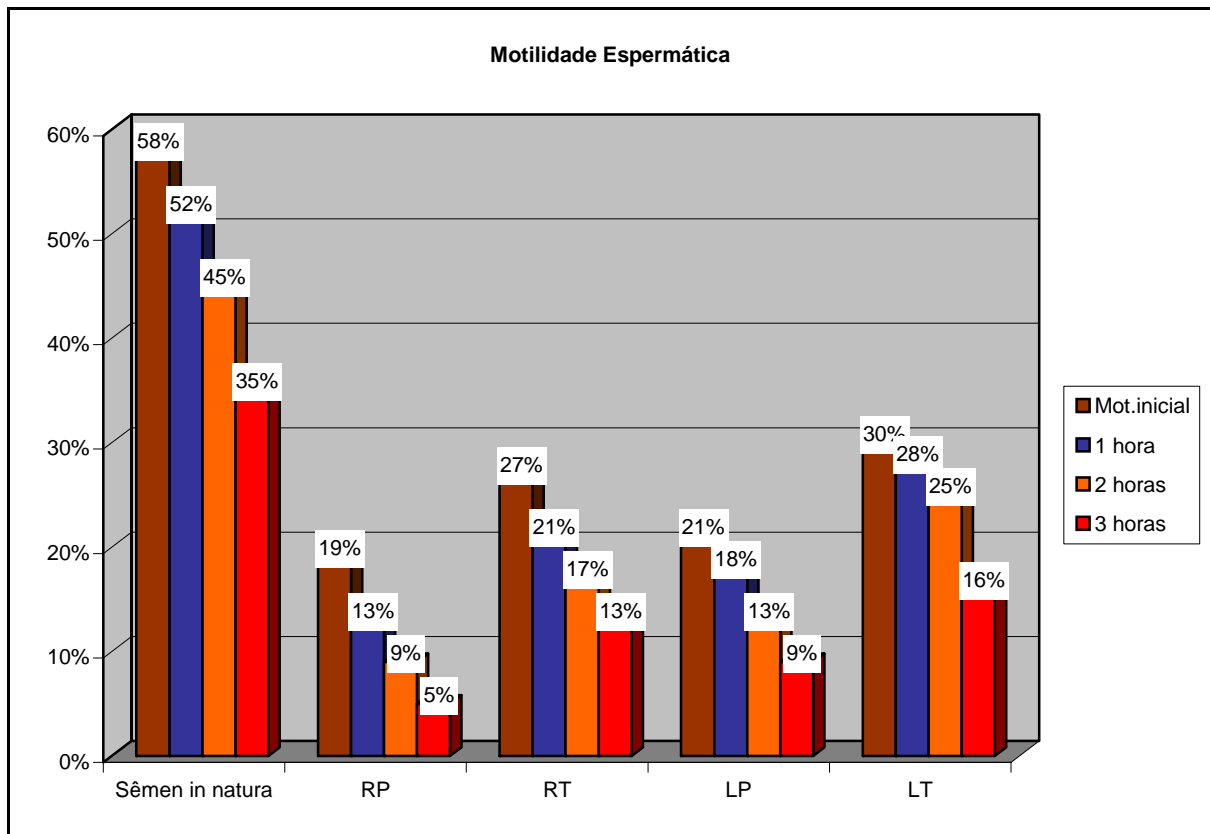


FIGURA 19. Motilidade espermática nos diferentes tratamentos e tempos.

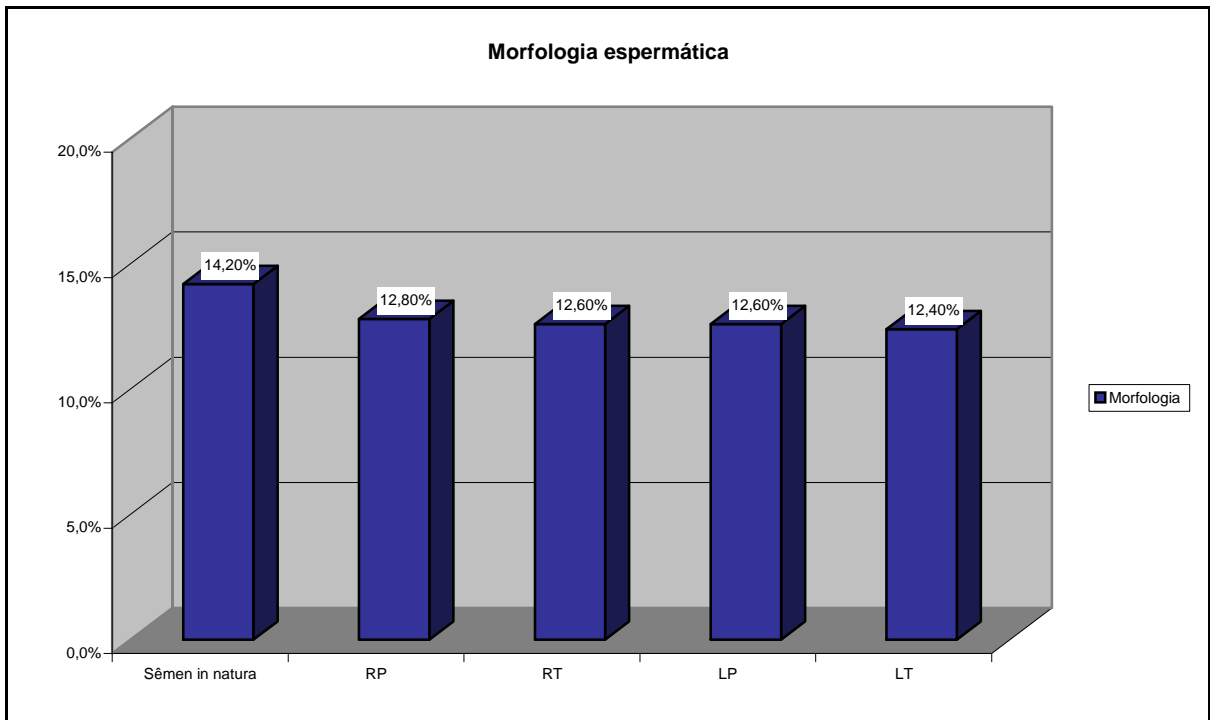


FIGURA 20. Morfologia espermática nos diferentes tratamentos.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

A criopreservação promove danos funcionais e estruturais aos espermatozóides, que se refletem em uma perda da motilidade e morfologia espermática depois de descongeladas as amostras de sêmen. Esse prejuízo funcional nos espermatozóides reduz o sucesso gestacional nos tratamentos de reprodução assistida. Inúmeros trabalhos visam a melhorar os resultados de criopreservação (WANG et al., 1987; HOLT, 2000; OEHNINGER et al., 2000; KASAI et al., 2002). Ainda não existe um consenso sobre qual o melhor método de criopreservação de sêmen.

O presente estudo tem como objetivo encontrar uma forma de criopreservação que diminua as crioinjúrias que ocorrem no sêmen no processo de congelação e descongelação. Foram comparadas duas maneiras de congelar as amostras de sêmen, método lento e método rápido, e duas formas de envasar o sêmen, em palhetas, com capacidade para 0,25ml, e em criotubos, com capacidade para 2ml.

O surgimento dos meios crioprotetores propiciou uma melhoria no processo de criopreservação espermática, porém é também descrito o efeito tóxico lesivo desses meios (CRITSER et al., 1988; HOLT, 2000). O meio crioprotetor utilizado no presente estudo foi o TEST-YOLK, por vários trabalhos terem revelado sua superioridade perante os outros meios atualmente em uso (PRINS; WEIDEL, 1986; STANIC et al., 2000; NALLELLA et al., 2004).

Foram estudadas dezoito amostras de sêmen de dezoito voluntários, com interesse em criopreservar sêmen. O volume inicial médio foi de $3,52 \pm 1,01$ ml (variando de 2 a 5,5ml), a concentração de espermatozóides por ml de $81,39 \pm 46,56$ milhões (20 a 187 milhões), o percentual de espermatozóides com morfologia normal, apresentou uma média de $14,2 \pm 4,64\%$ (8 a 24%), o percentual de espermatozóides com motilidade progressiva teve uma média de $58,1 \pm 11,48\%$ (32 a 78%).

A amostra estudada foi composta por indivíduos com motilidade e morfologia normal e também alterada. É discutido se a qualidade da amostra dos espermatozóides a serem criopreservados exerce influência nos resultados pós-descongelação. Estudos na literatura revelam que, utilizando amostras de sêmen de alta qualidade, não se observam diferenças nos resultados pós-descongelação quando comparados métodos de congelação lento com um

método de congelação rápido (VERHEYEN et al., 1993). Foi relatado que valores, de motilidade e morfologia, alterados apresentam resultados semelhantes após a criopreservação (RAGNI et al., 1990; STANIC et al., 2000).

A avaliação da morfologia espermática demonstrou uma queda, estatisticamente significativa, depois da criopreservação em todos os métodos, quando comparada com a morfologia inicial (14,2%), método RP (12,8%, $p=0,0467$), método RT (12,6%, $p=0,0963$), método LP (12,6%, $p=0,0141$) e método LT (12,4%, $p=0,0090$). Quando analisadas entre os diferentes métodos, as morfologias não apresentam diferenças estatísticas. Pode-se concluir também que as morfologias, nos diversos métodos, apresentaram forte correlação linear positiva. Isso significa que valores de morfologia mais altos em um tratamento estão associados a valores altos nos demais tratamentos ($p<0,0030$).

A comparação das morfologias nos diferentes métodos demonstrou que a alteração morfológica, segundo os critérios de Krüger e colaboradores, decorre do processo de criopreservação e não recebe influência do método de congelação ou envase (FIGURA 10) (TABELA 8) (TABELA 9). Essa queda da morfologia normal foi calculada em torno de 10%, em todos os métodos.

Em relação ao estudo da morfologia espermática no processo de criopreservação, a literatura descreve resultados semelhantes, variando a diminuição da morfologia normal de 3% (método com programa lento) a 8% (vapor de nitrogênio), porém sem diferença estatística entre os métodos (STANIC et al., 2000). Dados semelhantes também foram obtidos por um estudo brasileiro (FLORÊNCIO et al., 1995).

A avaliação da morfologia espermática foi realizada através dos critérios de Krüger e colaboradores, que predizem a capacidade de fertilização oocitária (KRÜGER et al., 1986), parâmetro bastante utilizado na prática clínica. Porém, a avaliação através de microscopia com transmissão de elétrons é mais apropriada para detecção de defeitos estruturais, que são observados, principalmente, na membrana plasmática e acrossoma (SATHANANTHAN, 2000).

O percentual médio de espermatozóides com motilidade progressiva, motilidade inicial média, foi de 58,1% e, após a criopreservação, houve queda significativa dos espermatozóides móveis nos quatro tratamentos. Foram obtidas as seguintes motilidades trinta minutos depois de descongeladas as amostras, nos diferentes métodos: 19,2% (RP), 27% (RT), 21,1% (LP) e 30,3% (LT) (FIGURA 9) (TABELA 10). Constatou-se que houve maior

motilidade no método lento quando utilizado o criotubo como forma de envase, observadas tanto nos trinta minutos depois de descongeladas as amostras, bem como na primeira, segunda e terceira hora.

Analisando isoladamente os métodos de congelação, rápido e lento, observou-se que, apesar de ter piores taxas de espermatozóides móveis depois da descongelação, o método rápido obteve melhores resultados quando o sêmen foi envasado em criotubos, em todos os momentos ($p=0,0762$, com trinta minutos) ($p=0,0066$, com uma hora) ($p=0,0085$, com duas horas) ($p=0,0006$, com três horas) (TABELA 11). Demonstrou-se que a forma de envase influenciou os resultados quando foi utilizado o método rápido. Dessa forma, aqueles centros de reprodução assistida, que não possuem recursos técnicos para a criopreservação automatizada, teriam melhores resultados se utilizassem o criotubo como forma de envase.

O método lento demonstrou as maiores taxas de espermatozóides móveis, após a criopreservação, principalmente, quando o sêmen foi envasado em criotubo, em todos os momentos ($p=0,0445$, com trinta minutos) ($p=0,0066$, com uma hora) ($p=0,0014$, com duas horas) ($p=0,0034$, com três horas) (TABELA 12). Demonstrou-se que a forma de envase também influenciou os resultados quando foi utilizado o método lento. Tendo a combinação, método lento com envase em criotubo, apresentado o melhor resultado.

Em razão das diferentes metodologias no processo de criopreservação observadas na literatura e uma pequena quantidade de trabalhos que avaliem a influência das formas de envase, torna-se difícil a comparação dos resultados. Poucos estudaram a influência dos tipos de envase na qualidade espermática no processo de criopreservação de sêmen humano. Há quem afirme, que utilizando um bom meio crioprotetor e uma curva de congelação ideal, a forma de envase em palhetas de 0,1ml, 0,5ml ou 1ml não interfere nos resultados (WEIDEL; PRINS, 1987). Esse dado foi confirmado pelo presente estudo, pois, quando a palheta de 0,25ml foi utilizada, os métodos lento e rápido obtiveram resultados semelhantes. Porém, a utilização de criotubos de 2ml influenciou os resultados. Essa forma de envase, criotubo de 2ml, não foi testada no estudo citado anteriormente. Em animais, as diferentes formas de envase exercem influência nos resultados de criopreservação, sendo um fator bastante estudado (ERIKSSON; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2000; CÓRDOVA et al., 2001).

As menores taxas de recuperação de espermatozóides móveis, após a criopreservação, foram observadas com envase em palheta. Utilizando-se a palheta como forma de envase e variando os métodos de congelação, rápido e lento, não houve diferença estatística, em

nenhum momento analisado ($p=0,0894$, com trinta minutos) ($p=0,2415$, com uma hora) ($p=0,1879$, com duas horas) ($p=0,1068$, com três horas) (TABELA 13).

Esses dados sugerem que quando o sêmen é envasado em palheta de 0,25ml o tipo de congelação, lento ou rápido, não interfere no resultado do processo de criopreservação. A literatura é contraditória, relata estudos em que os pesquisadores, ao utilizarem a palheta como forma de envase, observaram maior motilidade espermática através do método lento (TAYLOR et al., 1982; RAGNI et al., 1990; FLORÊNCIO et al., 1995), dado que não foi constatado no presente estudo. Ainda há relatos de trabalhos que não observaram diferença estatística ao comparar os dois métodos utilizando palheta (THACHIL; JEWETT, 1981), corroborando os dados apresentados.

As maiores motilidades, após a criopreservação, foram observadas quando o sêmen foi envasado em criotubos. Utilizando-se o criotubo como forma de envase e variando os métodos de congelação, rápido e lento Encontrou-se uma motilidade, estatisticamente superior, no método lento, principalmente, após a primeira hora ($p=0,1579$, com trinta minutos) ($p=0,0029$, com uma hora) ($p=0,0007$, com duas horas) ($p=0,0416$, com três horas) (TABELA 14). Esse dado revela que, ao envasar o sêmen em criotubos de 2ml, os melhores resultados de descongelação são obtidos com o método lento. Autores, que também compararam os dois métodos de congelação e utilizaram criotubos como forma de envase, obtiveram resultados semelhantes, melhores motilidades com a queda gradual da temperatura (SERAFINI; MARRS, 1986; STANIC et al., 2000). Um estudo, que avaliou indivíduos com oligoastenozoospermia, não observou diferença entre os métodos (ESTEVES et al., 2003).

Ao avaliar indivíduos portadores de tumores testiculares e linfoma de Hodgkin, observou-se que os espermatozóides sofrem de forma semelhante os fenômenos da crioinjúria e o método lento revelou melhores resultados (RAGNI et al., 1990; AGARWAL et al., 1995; CHUNG et al., 2004).

A forma de descongelação da amostra também parece influenciar no processo de criopreservação (HENRY et al., 1993). O presente estudo descongelou as amostras de sêmen em temperatura ambiente, variando de 25°C a 30°C, sobre uma bancada do laboratório, por um período de dez minutos e depois mantidas em banho maria a uma temperatura de 37°C por três horas, enquanto foram realizadas as análises restantes. Novamente, a literatura é dividida nesse questionamento. Estudos revelaram melhores resultados quando utilizada a temperatura ambiente (FLORÊNCIO et al., 1995; STANIC et al., 2000), sendo o primeiro um estudo

brasileiro e o segundo um estudo croata, ambos não citaram as variações da temperatura ambiente. Outros autores defendem que os melhores resultados ocorrem quando a descongelação é feita a uma temperatura de 37°C (VERHEYEN et al., 1993; AGARWAL et al., 1995).

A taxa de recuperação de espermatozóides móveis após o processo de criopreservação é definida como o percentual de espermatozóides que se mantiveram móveis após a descongelação. A avaliação, realizada trinta minutos após a descongelação, revelou as seguintes taxas: 32,3% (RP), 46,7% (RT), 38,2% (LP) e 50,4% (LT). Um estudo croata, em 2000, utilizando o mesmo meio crioprotetor, com envase em criotubo e comparando métodos de resfriamento parecidos encontrou taxas de recuperação semelhantes, 49% (vapor de nitrogênio) e 52% (programa lento) (STANIC et al., 2000).

Analisando a diminuição da motilidade ao longo do tempo na amostra de sêmen *in natura*, observou-se uma queda gradual dos espermatozóides móveis, variando de 11%, 14% e 21% na primeira, segunda e terceira hora, respectivamente. Após a criopreservação, o método que mais se aproximou ao sêmen *in natura* foi o LT, principalmente nas duas primeiras horas, com taxas de queda da motilidade espermática de 12%, 10% e 36% na primeira, segunda e terceira hora após a descongelação, respectivamente. Os métodos RP e RT apresentaram uma queda mais acentuada, com taxas de queda da motilidade de 26%, quando avaliada a primeira hora. Este fato também foi descrito na literatura (CRITSER et al., 1987; NALLELLA et al., 2004).

A queda, do percentual de espermatozóides móveis, observada nas curvas de motilidade ao longo de três horas, do sêmen *in natura* e nos quatro diferentes tratamentos, não pode ser considerada como uma regressão linear em função do tempo, pois, não é homogênea, a redução é mais acentuada com o passar das horas.

O envase em criotubo mostrou-se superior em todas as situações, tanto na congelação rápida quanto na lenta, devendo ser o tipo de envase de escolha para o processo de criopreservação de sêmen, além de serem relatadas outras vantagens, como: fácil preenchimento, fácil identificação, limpo, higiênico e de aceitação internacional (ROMERO et al., 1998).

O método de congelação lento foi superior ao rápido, mesmo quando utilizada a palheta como forma de envase, devendo também ser adotado como método padrão de congelação de sêmen.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

O melhor método de congelação foi o lento e a melhor forma de envase foi o criotubo de 2ml.

O método de criopreservação espermática que obteve melhor motilidade após a descongelação foi o método lento com envase em criotubo (LT).

Entre os métodos avaliados o que mostrou uma curva de sobrevivência espermática mais próxima à apresentada pelo sêmen *in natura* foi o método lento com envase em criotubo (LT).

A morfologia espermática normal diminuiu significativamente após o processo de criopreservação, de maneira semelhante, em todos os métodos avaliados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, A.; TOLENTINO, M. V.; SIDHU, R. S.; AYZMAN, I.; LEE, J. C.; THOMAS, A. J. et al. Effect of cryopreservation on semen quality in patients with testicular cancer. **Urology**, v. 46, p. 382-389, 1995.

BORDSON, B. L.; RICCI, E.; DICKEY, R. P.; DUNAWAY, H.; TAYLOR, S. N.; CUROLE, D. N. Comparison of fecundability with fresh and frozen semen in therapeutic donor insemination. **Fertil. Steril.**, v. 46, p. 466-469, 1986.

BUNGE, R. G.; KEETTEL, W. C.; SHERMAN, J. K. Clinical use of frozen semen. **Fertil. Steril.**, v. 5, p. 520-529, 1954.

CHUNG, K.; IRANI, J.; KNEE, G.; EFYMOW, B.; BLASCO, L.; PATRIZIO, P. Sperm cryopreservation for male patients with câncer: na epidemiological analysis at University of Pennsylvania. **Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.**, v. 113, suppl., p. S7-S11, 2004.

COHEN, J.; FELTEN, P.; ZEILMAKER, G.H. In Vitro fertilizing capacity of fresh and cryopreserved human spermatozoa: a comparative study of freezing and thawing procedures. **Fertil. Steril.**, v. 36, p. 356-362, 1981.

COLPI, G. M.; COLPI, E. M.; CASTIGLIONI, F.; GRUGNETTI, C. Sperm cryopreservation from oncological patients: the Italian experience. **Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.**, 113 suppl., p. S12-S13, 2004.

CÓRDOVA, A.; PÉREZ-GUTIÉRREZ, J. F.; LLEÓ, B.; GARCÍA-ARTIGA, C.; ALVAREZ, A.; DROBCHAK, V.; MARTÍN-RILLO, S. In vitro fertilization capacity and chromatin condensation of deep frozen boar semen packaged in 0.5 and 5 ml straws. **Theriogenology**, v. 57, p. 2119-2128, 2002.

CRITSER, J. K.; ARNERSON, B. W.; AAKER, D. V.; HUSE-BENDA, A. R.; BALL, G. D. Cryopreservation of human spermatozoa. II. Postthaw chronology of motility and of zona-free hamster ova penetration. **Fertil. Steril.**, v. 47, p.980-984, 1987.

CRITSER, J. K.; HUSE-BENDA, A. R.; AAKER, D. V.; ARNERSON, B. W.; BALL, G. D. Cryopreservation of human spermatozoa. Iii. The effect of cryoprotectants on motility. **Fertil. Steril.**, v. 50, p. 314-320, 1988.

CRITSER, J. K. Current status of sêmen banking in the USA. **Hum. Reprod.**, v. 13, suppl 2, p. 55-67, 1998.

CROSS, N. L.; HANKS, S. E. Effects of cryopreservation on human sperm acrossomes. **Hum. Reprod.**, v. 6, p. 1279, 1991.

DAVID, G.; LANSAC, J. The organization of the centers for the study and preservation of sêmen in France. In: DAVID, G.; PRICE, W. S. **Human artificial insemination and semen preservation**. New York: Plenum Press, 1980. p.15-26.

DEVROEY, P.; SILBER, S.; NAGY, Z.; LIU, J.; TOURNAYE, H.; JORIS, H.; VERHEYEN, G.; VAN STEIRTEGHEM, A. Ongoing pregnancies and birth after intracytoplasmic sperm injection with frozen-thawed epididymal spermatozoa. **Hum. Reprod.**, v. 10, p. 903-906, 1995.

DiMARZO, S. J.; HUANG, J.; KENNEDY, J. F.; VILLANUEVA, B.; HEBERT, S. A.; YOUNG, P. E. Pregnancy rates with fresh versus computer-controlled cryopreserved semen for artificial insemination by donor in a private practice setting. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 162, p. 1483-1490, 1990.

DONNELLY, E. T.; LEWIS, S. E. M.; McNALLY, J. A.; THOMPSON, W. In vitro fertilization and pregnancy rates: the influence of sperm motility and morphology on IVF outcome. **Fertil. Steril.**, v. 70, p. 305-314, 1998.

DONNELLY, E. T.; McCLURE, N.; LEWIS, S. E. M. Cryopreservation of human sêmen and prepared sperm: effects on motility parameters and DNA integrity. **Fertil. Steril.**, v. 76, p. 892-909, 2001.

ERIKSSON, B. M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Effect of freezing and thawing rates on the post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in FlatPacks and Maxi-straws. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 63, p. 205-220, 2000.

ESTEVEES, S. C.; SPAINE, D. M.; CEDENHO, A. P.; SROUGI, M. Effects of the technique of cryopreservation na dilution/centrifugation after thawing on the motility and vitality of spermatozoa of oligoasthenozoospermic men. **Int. Braz. J. Urol.**, v. 29, n. 2, p. 133-140, 2003.

FLORÊNCIO, R. S.; SANTOS, F. C.; CUNHA, G. B.; COSTA, I. A.; ROCHA, J. P. Efeitos do congelamento de sêmen humano e temperatura de descongelamento sobre motilidade e morfologia. **Reprod. Climat.**, v. 10, p. 24-26, 1995.

GIL-SALOM, M.; ROMERO, J.; RUBIO, C.; RUIZ, A.; REMOHÍ, J.; PELLICER, A. Intracytoplasmic sperm injection with cryopreserved testicular spermatozoa. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 169, p. 15-19, 2000.

GUZICK, D. S.; CARSON, S. A.; COUTIFARIS, C.; OVERSTREET, J. W.; FACTOR-LITVAK, P.; STEINKAMPF, M. P.; HILL, J. A.; MASTROIANNI, L.; BUSTER, J. E.; NAKAJIMA, S. T.; VOGEL, D. L.; CANFIELD, R. E. Efficacy of superovulation and intrauterine insemination in the treatment of infertility. National Cooperative Reproductive Medicine Network. **N. Engl. J. Med.**, v. 340, p. 177-183, 1999.

HALLAK, J.; BRAND, V. B. F.; GRAZIOTTIN, T. M. Criopreservação de sêmen humano. In: GLINA, S.; DAMIÃO, R. **Infertilidade masculina**. São Paulo: BG Cultural, 1999. p.75-80.

HALLAK, J.; SHARMA, R. K.; WELLSTEAD, C.; AGARWAL, A. Cryopreservation of human spermatozoa: Comparison of TEST-Yolk buffer and Glycerol. **Int. J. Fertil.**, v. 45, p. 38-42, 2000.

HENRY, M. A.; NOILES, E. E.; GAO, D.; MAZUR, P.; CRISTER, J. K. Cryopreservation of human spermatozoa. IV. The effects of cooling rate and warming rate on the maintenance of motility, plasma membrane integrity, and mitochondrial function. **Fertil. Steril.**, v. 60, p. 911-918, 1993.

HOAGLAND, H.; PICUS, G. Revival of mammalian sperm after immersion in liquid nitrogen. **J. Gen. Physiol.**, v. 25, p. 227-344, 1942.

HOLT, V. W. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. **Theriogenology**, v. 53, p. 47-58, 2000.

HOLDEN, C. A.; FUSCALDO, G. F.; JACKSON, P.; CATO, A.; SOUTHWICK, G. J.; HAUSER, R.; TEMPLE-SMITH, P. D.; MCLACHLAN, R. I. Frozen-thawed epididymal spermatozoa for intracytoplasmic sperm injection. **Fertil. Steril.**, v. 67, p. 81-87, 1997.

HORNE, G.; ATKINSON, A. D.; PEASEL, E. H. E.; LOGUE, J. P.; BRINSON, D. R.; LIEBERMAN, B. A. Live birth with sperm cryopreserved for 21 years prior to cancer treatment: Case report. **Hum. Reprod.**, v. 19, p. 1448-1449, 2004.

HOVATTA, O. Cryopreservation of testicular tissue. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 169, p. 113-115, 2000.

HOVATTA, O. Cryopreservation of ovarian and testicular tissue. **Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.**, v. 17, p. 331-342, 2003.

ISACHENKO, E.; ISACHENKO, V.; KATKOV, I. I.; DESSOLE, S.; NAWROTH, F. Vitrification of mammalian spermatozoa in the absence of cryoprotectants: from past practical difficulties to present success. **Reprod. Biomed. Online**, v. 6, n. 2, p. 191-200, 2003.

ISACHENKO, E.; ISACHENKO, V.; KATKOV, I. I.; RAHIMI, G.; SCHÖNFÖR, T.; MALLMAM, P. et al. DNA integrity and motility of human spermatozoa after standard slow freezing versus cryoprotectant-free vitrification. **Hum. Reprod.**, v. 19, p. 932-939, 2004.

JADIM, C. R. F.; DA ROS, C. T.; LORENZINI, F. Fatores de risco e prevenção da infertilidade no homem. In: GLINA, S.; DAMIÃO, R. **Infertilidade masculina**. São Paulo: BG Cultural, 1999, p.11-16.

KASAI, M.; ITO, K.; EDASHIGE, K. Morphological appearance of the cryopreserved mouse blastocyst as a tool to identify the type of cryoinjury. **Hum. Reprod.**, v. 17, p. 1863-1874, 2002.

KEEL, B. A.; WEBSTER, B. W. Semen analysis data from fresh and cryopreserved donor ejaculates: comparison of cryoprotectants and pregnancy rates. **Fertil. Steril.**, v. 52, p. 100-105, 1989.

KRUGER, T. F.; MENKVELD, R.; STANDER, F. S.; LOMBARD, C. J.; VAN DER MERWE, J. P.; VAN ZYL, J. A.; SMITH, K. Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. **Fertil. Steril.**, v. 46, p. 1118-1123, 1986.

LANSAC, J.; THEPOT, F.; MAYAUX, M. J.; CZYGLICK, F.; WACK, T.; SELVA, J.; JALBERT, P. Pregnancy outcome after artificial insemination or IVF with frozen semen donor: a collaborative study of the French CECOS Federation on 21.597 pregnancies. **Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.**, v. 74, p. 223-228, 1997.

LEIBO, S. P.; PICTON, H. M.; GOSDEN, R. G. Cryopreservation of human spermatozoa. In: VAYENA, E.; ROWE, P. J.; GRIFFIN, P. D. **Current practices and controversies in assisted reproduction**. Genova: WHO, 2002. p. 152-165.

MARCUS-BRAUN, N.; BRAUN, G.; POTASHNIK, G.; HAR-VARDI, I. Effect of cryopreservation on quality and fertilization capacity of human sperm. **Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.**, v. 116, p. 63-66, 2004.

MOOD, A. M.; GRAYBILL, F.; BOES, D. C. **Introduction to the theory of statistics**. New York: McGraw-Will, 1974. 565p.

MORSHEDI, M.; OEHNIGER, S.; VEECK, L. L.; ERTUNC, H.; BOCCA, S.; ACOSTA, A. A. Cryopreserved/thawed semen for in vitro fertilization: results from fertile donors and infertile patients. **Fertil. Steril.**, v. 54, p. 1093-1099, 1990.

NALLELLA, K. P.; SHARMA, R. K.; ALLAMANENI, S. S. R.; AZIZ, N.; AGARWAL, A. Cryopreservation of human spermatozoa: comparison of two cryopreservation methods and three cryoprotectants. **Fertil. Steril.**, v. 82, p. 913-918, 2004.

OEHNIGER, S.; DURU, N. K.; SRISOMBUT, C.; MORSHEDI, M. Assessment of sperm cryodamage and strategies to improve outcome. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 169, p. 3-10, 2000.

OETTLÉ, E. E.; CLARK, U. A.; MACLAOUGHLIN, J.; LEVIN, M. R.; WISWEDEL, K.; KRUGER, T. F. Ultrastructural parameters of fertile cryopreserved human semen. **Arch. Androl.**, v. 29, p. 151, 1992.

PALERMO, G.; JORIS, H.; DEVROEY, P.; VAN STEIRTEGHEM, A. C. Pregnancies after intra-cytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte, **Lancet**, v. 340, p. 17-18, 1992.

PERLOFF, W. H.; STEINBERGER, E.; SHERMAN, J. K. Conception with human spermatozoa frozen by nitrogen vapor technic. **Fertil. Steril.**, v. 15, p. 501, 1964.

POLGE, C.; SMITH, A. U.; PARKES, A. S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, v. 169, p. 626-627, 1949.

PRINS, G. S.; WEIDEL, L. A comparative study of buffer system as cryoprotectants for human spermatozoa. **Fertil. Steril.**, v. 46, p. 147-149, 1986.

RAGNI, G.; CACCAMO, A. M.; SERRA, A. D.; GUERCILENA, S. Computerized slow-staged freezing of semen from men with testicular tumors or Hodgkin's disease preserves sperm better than standard vapor freezing. **Fertil. Steril.**, v. 53, p. 1072-1075, 1990.

RICHTER, M. A.; HANING Jr, R. V.; SHAPIRO, S. S. Artificial donor insemination: fresh versus frozen semen; the patient as her own control. **Fertil. Steril.**, v. 41, p. 277-280, 1984.

ROMERO, J.; ZUZUARREGUI, J.; GÓMEZ, E.; MERCADER, A.; MOLERO, M. D.; COBO, A. C. et al. Congelamento de sêmen. In: SOUSA, L. R.; BONILLA-MUSOLES, F.; PELLICER, A.; SIMÓN, C.; REMOHI, J. **Manual prático de reprodução humana**. Rio de Janeiro: Revinter, 1998, p.123-126.

SATHANANTHAN, A. H. Ultrastructure of human gametes, fertilization, and embryo development. In: TROUNSON, A. O.; GARDNER, D. K. **Handbook of in vitro fertilization**. 2.ed. New York: CRC Press, 2000. p.431-464.

SCHLEGEL, P. N.; HARDY, M. Male reproductive physiology. In: WALSH, P. C. **Campbell's urology**. 8th. ed. Philadelphia: Elsevier, 2002. p.1464.

SERAFINI, P.; MARRS, R. P. Computerized staged-freezing technique improves sperm survival and preserves penetration of zona-free hamster ova. **Fertil. Steril.**, v. 45, p. 854-858, 1986.

SHERMAN, J. K. Banks for frozen human semen: current status and prospects. In: GRAHAM, E. **The integrity of frozen spermatozoa**. Washington: National Academy of Sciences, 1978. p.78-91.

SHETTLES, L. B. The respiration of human spermatozoa and their response to various gases and low temperatures. **Am. J. Physiol.**, v. 128, p. 408-415, 1940.

SMITH, A. U.; POLGE, C. Storage of bull spermatozoa at low temperatures. **Vet. Rec.**, v. 62, p. 115-116, 1950.

SONGSASEN, N.; LEIBO, S. P. Cryopreservation of mouse spermatozoa. II. Relationship between survival after cryopreservation and osmotic tolerance of spermatozoa from three strains of mice. **Cryobiology**, v. 35, p. 255-269, 1997.

STANIC, P.; TANDARA, M.; SONICKI, Z.; SIMUNIC, V.; RADAKOVIC, B.; SUCHANEK, E. Comparison of protective media and freezing techniques for cryopreservation of human semen. **Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.**, v. 91, p. 65-70, 2000.

STEINBERGER, E.; SMITH, K. D. Artificial insemination with fresh or frozen semen. A comparative study. **JAMA**, v. 223, p. 778-783, 1973.

STEPOE, P. C.; EDWARDS, R. G. Birth after the reimplantation of human embryo. **Lancet**, v. 2, p. 366, 1978.

STEWART, D. L. Storage of bull spermatozoa at low temperatures. **Vet. Rec.**, v. 63, p. 65-66, 1951.

SUBAK, L. L.; ADAMSON, G. D.; BOLTZ, N. L. Therapeutic donor insemination: a prospective randomized trial of fresh versus frozen sperm. **Am. J. Obst. Gynaecol.**, v. 166, p. 1597-1606, 1992.

TAYLOR, P. J.; WILSON, J.; LAYCOCK, R.; WEGER, J. A comparison of freezing and thawing methods for the cryopreservation of human semen. **Fertil. Steril.**, v. 37, p. 100-103, 1982.

TESARIK, J.; ROLET, F.; BRAMI, C.; SEDBON, E.; THOREL, J.; TIBI, C.; THEBAULT, A. Spermatozoa injection into human oocytes. II. Clinical application in the treatment of infertility due non-obstructive azoospermia. **Hum. Reprod.**, v. 11, p. 780-783, 1996.

THACHIL, J. V.; JEWETT, M. A. S. Preservation techniques for human semen. **Fertil. Steril.**, v. 35, p. 546-548, 1981.

TOURNAYE, H.; MERDAD, T.; SILBER, S.; JORIS, H.; VERHEVEN, G.; DEVROEY, P.; VAN STEIRTEGHEM, A. No differences in outcome after intracytoplasmic sperm injection with fresh or with frozen-thawed epididymal spermatozoa. **Hum. Reprod.**, v. 14, p. 90-95, 1999.

TROUNSON, A. O.; MATTHEWS, C. D.; KOVACS, G. T.; SPIERS, A.; SAUNDERS, D. M.; JONES, W. R.; FULLER, S. Artificial insemination by frozen donor semen: results of multicentre Australian experience. **Int. J. Androl.**, v. 4, p. 227-232, 1981.

VAN STEIRTEGHEM, A. C.; NAGY, Z.; JORIS, H.; LIU, J.; STAESSEN, C.; SMITZ, J.; WISANTO A.; DEVROEY, P. High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. **Hum. Reprod.**, v. 8, p. 1061-1066, 1993.

VEECK, L. Does the developmental stage at freeze impact on clinical results post-thaw? **Reprod. Biomed. Online**, v. 6, n. 3, p. 367-374, 2003.

VERHEYEN, G.; PLETINEX, I.; STEIRTEGHEM, A. V. Effect of freezing method, thawing temperature and post-thaw dilution/washing on motility (CASA) and morphology characteristics of high-quality human sperm. **Hum. Reprod.**, v. 8, p. 1678-1684, 1993.

WANG, Y.; SHARMA, R. K.; AGARWAL, A. Effect of cryopreservation and sperm concentration on lipid peroxidation in human semen. **Urology**, v. 50, p. 409-413, 1987.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 60-61, p. 481-492, 2000.

WEIDEL, L.; PRINS, G. S. Cryosurvival of human spermatozoa frozen in eight different buffer systems. **J Androl.**, v. 8, p. 41-47, 1987.

WOODS, E. J.; BENSON, J. D.; AGCA, Y.; CRITSER, J. K. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. **Cryobiology**, v. 48, p. 146-156, 2004.

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

ANEXOS

ANEXOS

ANEXO A – VALORES DO ESPERMOGRAMA NORMAL (WHO, 1999)

Análise macroscópica

Volume: 1,5 a 5,0 mililitros.

Cor: branco opalescente ou branco acinzentado.

Liquefação: até 60 minutos.

pH: 7,2 a 8,0.

Viscosidade: entre 3 a 5 centímetros.

Aspecto: homogêneo.

Análise microscópica

Concentração de espermatozóides: $\geq 20.000.000$ espermatozóides/ml.

Motilidade (avaliada a 37°C, na primeira hora):

Grau A: espermatozóides com progressão linear e rápida ($\geq 25\%$)

Grau B: espermatozóides com progressão linear e lenta ($A + B \geq 50\%$)

Grau C: espermatozóides móveis sem progressão

Grau D: espermatozóides imóveis

Morfologia

Ovais (formas normais): ($\geq 30\%$)

Macrocéfalos

Fusifformes

Piriformes

Espermátides

Microcéfalos

Redondos

Amorfos

Bicéfalos

Vitalidade

Espermatozóides vivos $\geq 75\%$

Células redondas (leucócitos, hemáceas, células epiteliais, fungos, protozoários):

Células redondas $\leq 1.000.000$ /ml

Leucócitos $\leq 1.000.000$ /ml

Hemáceas $\leq 1.000.000$ /ml

ANEXO B – COLORAÇÃO DE SHORR

O esfregaço é fixado em etanol 75% por 1 minuto.

Água corrente	12 a 15 vezes*
Hematoxilina	1 a 2 minutos
Água corrente	12 a 15 vezes*
Álcool ammonia	5 passagens de 5 segundos cada
Água corrente	12 a 15 vezes*
Etanol 50%	5 minutos
Corante de Shorr	3 a 5 minutos
Etanol 50%	5 minutos
Etanol 75%	5 minutos
Etanol 95%	5 minutos
Etanol absoluto	2 passagens de 5 minutos cada
Xilol	2 passagens de 5 minutos cada

*1 vez corresponde a uma imersão de aproximadamente 1 segundo.

Reagentes

Papanicolau hematoxilina No. 1 (Merck, Cat. No. 9253)

Álcool amônia 95ml 75% etanol + 5ml 25% hidróxido de amônia

Solução de Shorr (Merck, Cat. No. 9275)

ANEXO C – MORFOLOGIA SEGUNDO KRÜGER

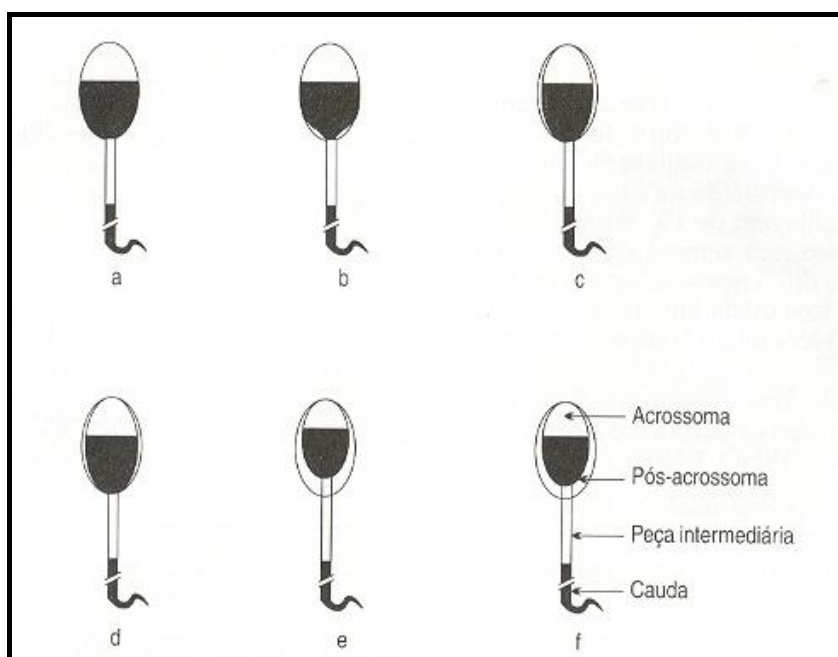


FIGURA 21. Morfologia espermática normal, segundo Krüger.

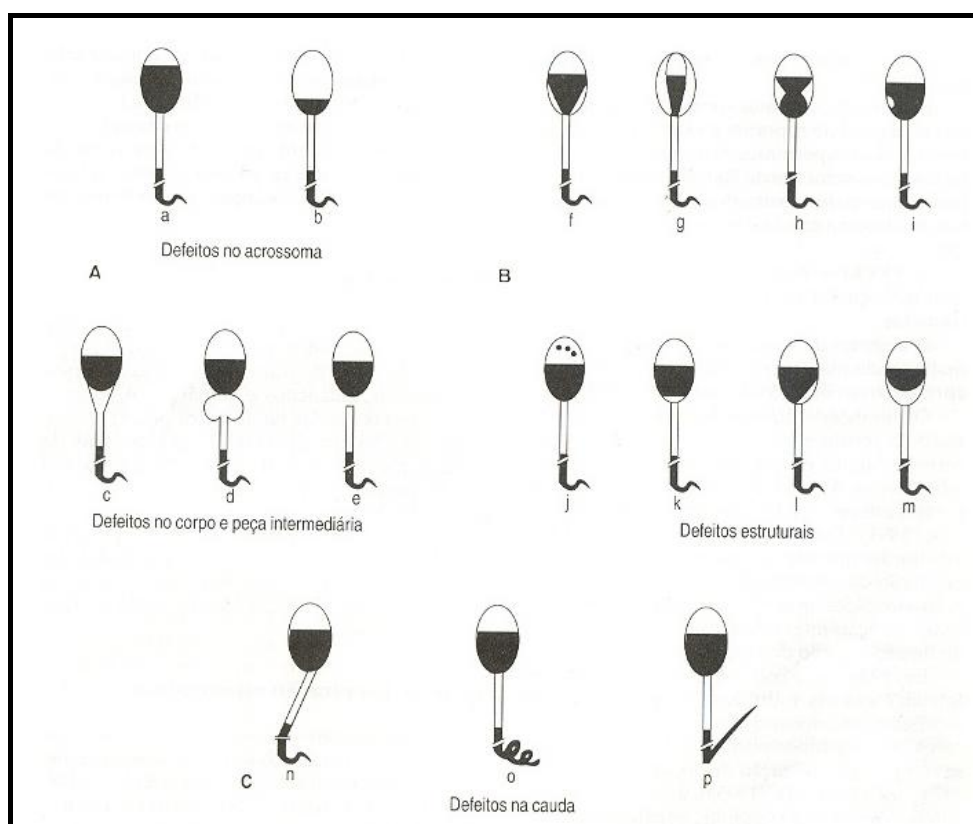


FIGURA 22. Morfologia espermática anormal, segundo Krüger.

ANEXO D- MÉTODO LENTO DE CONGELAÇÃO

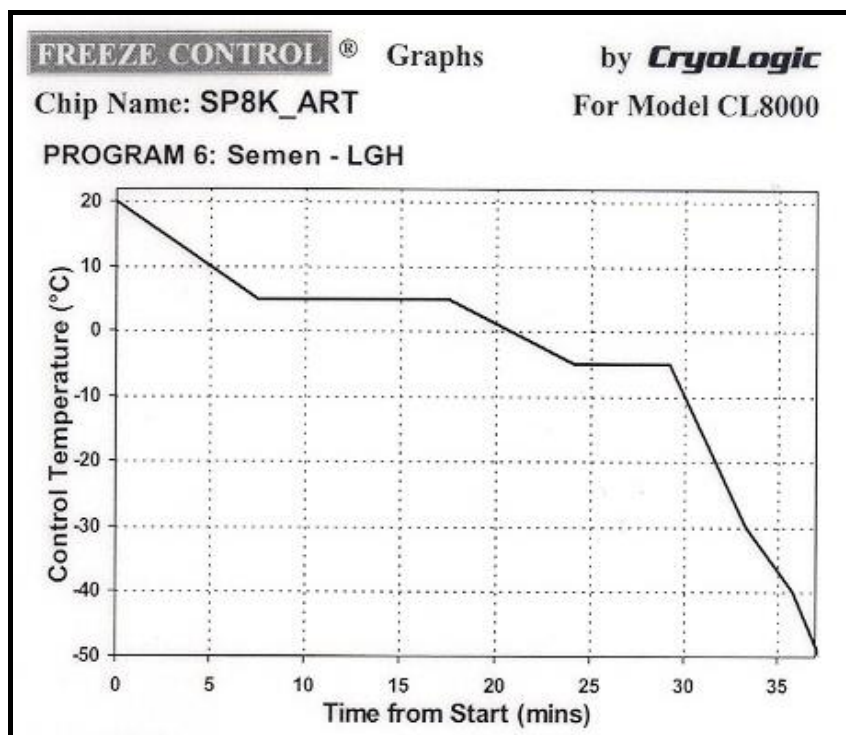


FIGURA 23. Curva de congelação, programa 6.

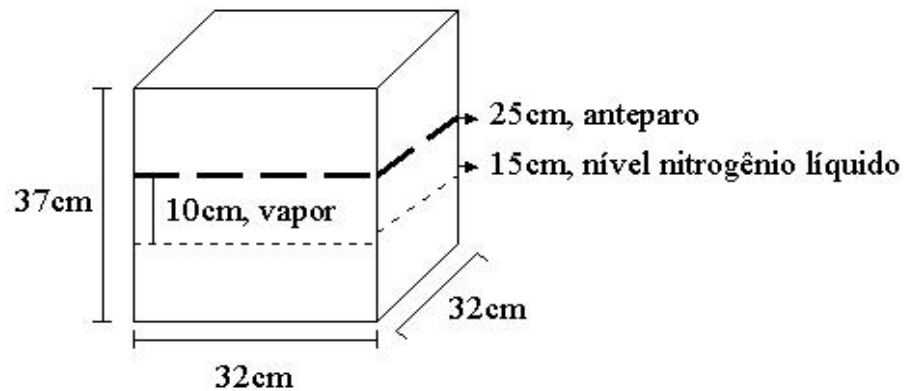
FREEZE CONTROL® Programs by **CryoLogic**
 Chip Name: SP8K_ART For Model CL8000

Rate (°C/min)	Target Temp (°C)	Hold Time (min)	Bell
Program 5: Oocytes			Start Temp: 20.0°C
			Final State: Hold
0.00	20.0	5.0	
2.00	0.0	10.0	
6.00	- 5.0	3.0	X
0.00	- 5.0	27.0	
0.30	- 36.0	0.0	X
Program 6: Semen - LGH			Start Temp: 20.0°C
			Final State: FreeFall
2.00	5.0	10.0	
1.50	- 5.0	5.0	
6.00	- 30.0	0.0	
4.00	- 40.0	0.0	X
Program 7: Semen 2			Start Temp: 20.0°C
			Final State: FreeFall
1.00	4.0	4.0	
2.00	- 10.0	0.0	X
0.00	- 10.0	2.0	
3.00	- 30.0	0.0	
4.00	- 43.0	0.0	X

FIGURA 24. Esquema da curva de congelação.

ANEXO E – MÉTODO RÁPIDO DE CONGELAÇÃO

Figura esquemática da caixa de isopor usada no método rápido.



Obs: 1. Palhetas e criotubos são colocadas sobre o anteparo perfurado. 2. A caixa de isopor fica com uma tampa durante o congelamento. 3. A caixa de isopor possui um revestimento interno de aço inox até altura do anteparo, 25cm.

FIGURA 25. Esquema para curva rápida.

APÊNDICES

APÊNDICES

APÊNDICE - A

CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN HUMANO - COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS DE CONGELÇÃO E TIPOS DE ENVASE

FICHA PARA COLETA DE DADOS

FICHA DE COLETA DE DADOS

Caso: _____

ANÁLISE INICIAL:

Nome: _____ Idade: _____ Abstinência: _____ dias
Febre nos últimos 90 dias: Sim () Não () Medicamento: Não () Sim (),
quais: _____

1. CARACTERÍSTICAS FÍSICAS:

Cor: _____ Odor: _____
Tempo de liquefação: _____ min. pH: _____ Viscosidade: _____
Aspecto: () Homogêneo () Heterogêneo

2. QUANTIDADE:

Volume: _____ ml
Conc. de sptz: _____ x 10⁶ / ml
Conc. total de sptz: _____ x 10⁶

3. MOTILIDADE:

A= progressiva rápida linear %
B= progressiva rápida linear ou não %
C= móvel não progressiva %
D= imóvel %

4. VITALIDADE:

(1^a hora): _____ %

5. MORFOLOGIA ESTRITA (KRÜGER):

Formas normais: _____ %
Formas anormais: _____ %

6. EXAME CITOLÓGICO:

Células epiteliais: _____ Protozoários: _____
Leucócitos: _____ Fungos: _____
Hemácias: _____ Debris: _____

7. TESTE HIPOSMÓTICO:

sptz reativos: _____ %

Ficha de Coleta de Dados

Sêmen <i>in natura</i>	Inicial	1 hora	2 horas	3 horas
Concentração				
Morfologia				
Motilidade				

Sêmen descongelado

30 minutos

Morfologia	
------------	--

30 minutos

1 hora

2 horas

3 horas

Motilidade Rp				
Motilidade Rt				
Motilidade Lp				
Motilidade Lt				

Rp = Método rápido + palheta 0,25ml

Rt = Método rápido + criotubo 2ml

Lp = Método lento + palheta 0,25ml

Lt = Método lento + criotubo 2ml

Motilidade A / B / C / D

A = espermatozóide com progressão linear e rápida

B = espermatozóide com progressão linear lenta

C = espermatozóide móvel sem progressão

D = espermatozóide imóvel

APÊNDICE - B

ORIENTAÇÕES PARA O VOLUNTÁRIO E PROTOCOLO RESUMIDO

Você está sendo convidado a participar de um estudo sobre as repercussões na qualidade do sêmen após processo de criopreservação. Para participar você deve ser saudável e ter entre 18 e 50 anos. Será solicitado que você forneça uma amostra de seu sêmen através de masturbação, com um período de abstinência sexual de 3 a 5 dias. Essa amostra será analisada inicialmente, processada, armazenada de 2 maneiras diferentes, congelada por 2 métodos diferentes, após 24 a 48 horas mantida em tambor com nitrogênio líquido será descongelada, analisada novamente e descartada após análises. Ao final do estudo você receberá um resumo de todas análises realizadas em sua amostra, antes e após o congelamento.

ROTEIRO:

- 1) Convite a participar da pesquisa.
- 2) Assinatura do termo de consentimento pós-informação.
- 3) Agendamento da coleta da amostra, que será realizada no Centro de Reprodução Assistida do Ceará, rua Coronel Linhares 950 – 12º andar, Fortaleza-Ceará, próximo ao Hospital Gastroclínica, fone 32610011.
- 4) Coleta da amostra de sêmen.
- 5) No mesmo dia da coleta serão realizados as análises iniciais, processamento, envase e congelamento do sêmen.
- 6) No dia seguinte à coleta será realizado o descongelamento e as análises finais, terminando o uso do sêmen que será descartado.

Qualquer dúvida entre em contato com Dr Marcelo Cavalcante nos fones: 99924822, 32610011. Desde já agradecemos sua colaboração.

APÊNDICE - C - CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN HUMANO COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS DE CONGELAÇÃO E TIPOS DE ENVASE

Eu, _____, aceito colaborar com o trabalho de tese de mestrado do Dr. Marcelo Borges Cavalcante que está sendo realizado no Centro de Reprodução Assistida do Ceará.

Fui informado sobre a finalidade do trabalho, que estará estudando diferentes formas de congelamento e armazenamento de sêmen e suas repercussões sobre a qualidade seminal. Estou ciente que terei que fornecer uma amostra de meu sêmen que será congelada, descongelada, analisada e por fim desprezada, conforme o protocolo resumido da pesquisa que recebi uma cópia. Fui esclarecido que a amostra de sêmen por mim fornecida não será estocada e que poderei acompanhar todo o processo, também poderei desistir de participar do estudo a qualquer momento sem ter nenhum prejuízo. Foi garantido a mim que todas as informações sobre meu sêmen serão mantidas em sigilo e que serei informado sobre os resultados dos exames pré e pós-congelamento, através de um relatório, e quando eles estiverem prontos, e sobre o que eles significam.

Fortaleza, ____ de _____ de 2004.

Assinatura do voluntário

Dr. Marcelo Borges Cavalcante

Assinatura de quem obteve o consentimento

Fones para contato: Dr. Marcelo (99924822), Centro de Reprodução Assistida do Ceará (32610011).

APÊNDICE - D

Material utilizado para a coleta, análise do sêmen, congelação e descongelação.

Material necessários:

Microscópio óptico com contraste de fase Olympus, modelo: CH30 (Tóquio, Japão).

Banho Maria Fanem, modelo 100 (São Paulo, Brasil).

Aquecedor de tubo da marca Labline, modelo 2050 (Illinois, EUA).

Agitador de tubo Daiger modelo: G560 (Nova Iorque, EUA).

Congelador automático Freezer Control Cryologic, modelo CL8000 (Austrália).

Caixa de isopor adaptada com anteparo interno.

Palhetas de 0,25ml CryoBiosystem IMV Technologies, ref. 010261 (França).

Criotubos de 2ml Corning, modelo 2028 (Nova Iorque, EUA).

Nitrogênio líquido.

Botijão de nitrogênio Cryometal DS 34.

Frasco coletor universal J.Prolab (Paraná, Brasil).

Fita de mensuração de pH.

Tubos cônicos graduados de 15 ml Corning, modelo 430789 (Nova Iorque, EUA).

Pipeta sorológica graduada de 10 ml Corning, modelo 4101 (Nova Iorque, EUA).

Lâminas e lamínulas.

Câmara de Makler Sefi Medical Instruments (Haifa, Israel).

Meio Crioprotetor TEST YOLK Buffer Irvine Scientific, ref. 9971 (Califórnia, EUA).

Corante eosina a 3%.

Corante nigrosina a 8%.

Tubo de hemólise, ponteiras e pipetas.

Bateria para coloração de Shorr.