Caroline Ranéa

**Determinação de meio de cultura favorável e período
de incubação espermática de amostras seminais
astenozoospérmicas**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Programa de Pós-graduação em Urologia
Orientador: Prof. Dr. Jorge Hallak

**Ref. Versão corrigida – Dissertação de Mestrado/Resolução
CoPGr 6018, de 13 de outubro de 2011**

**São Paulo
2020**

Caroline Ranéa

**Determinação de meio de cultura favorável e período
de incubação espermática de amostras seminais
astenozoospérmicas**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Programa de Pós-graduação em Urologia
Orientador: Prof. Dr. Jorge Hallak

**Ref. Versão corrigida – Dissertação de Mestrado/Resolução
CoPGr 6018, de 13 de outubro de 2011**

**São Paulo
2020**

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro inicial em forma de bolsa de mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP nº 2017/03599-1) pelo apoio dado por meio da bolsa de estudos, modalidade mestrado.

À divisão Urológica do HC-FMUSP pela oportunidade de estudo.

Agradecimentos

Á Deus por ser o meu guia em todas as situações, por estar sempre presente em minha vida e da minha família, nos abençoando e iluminando nossos passos.

Aos meus pais, por me apoiarem e me mostrarem o caminho correto a seguir, vocês são tudo que eu tenho de mais precioso na vida.

Ao Dr. Jorge Hallak, pela oportunidade de aprendizagem e pela orientação no desenvolvimento do estudo.

Ao Laboratório Androscience, em especial Juliana Risso Pariz, pelo apoio, companheirismo e aprendizagem ao longo desses 5 anos.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Ranéa, Caroline

Determinação de meio de cultura favorável e período de incubação espermática de amostras seminais astenozoospermicas / Caroline Ranéa. -- São Paulo, 2020.

Dissertação (mestrado) -- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Urologia.

Orientador: Jorge Hallak.

Descritores: 1.Espermatozoides 2.Meios de culturas 3.Motilidade espermática 4.Tratamento anaeróbico 5.Viabilidade 6.Técnicas de reprodução assistida

USP/FM/DBD-123/20

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de símbolos

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de gráfico

RESUMO

ABSTRACT

I INTRODUÇÃO	1
II OBJETIVO	4
2.1. Objetivos específicos	4
2.2. Hipótese do estudo	4
III METODOLOGIA	5
3.1. Aprovação no comitê de Ética	5
3.2. Seleção de indivíduos	5
3.3. Análise Seminal	8
3.3.1. Avaliação macroscópica do sêmen	8
3.3.2. Avaliação microscópica do sêmen	8
3.3.2.1. Determinação da concentração espermática	9
3.3.2.2. Motilidade espermática	9
3.3.2.3. Morfologia	10
3.3.2.4. Viabilidade espermática/ Inchaço hiposmótico (HOS)	10
3.4. Protocolo I: Padronização do período ideal de incubação espermática	11
3.5. Protocolo I vs. Protocolo II	12
3.6. Protocolo II: Determinação do meio de cultura ideal para incubação espermática	13
3.6.1. Processamento seminal por gradiente descontínuo de densidade	14
3.6.2. Lavagem simples	14
3.6.3. Meios de cultura e suplementos utilizados	15
3.6.4. Incubação das amostras	15
3.7. Avaliação dos testes funcionais espermáticos	16
3.7.1. Avaliação da atividade mitocondrial dos espermatozoides – 3'3 diaminobenzidina (DAB)	16
3.7.2. Cinética dos espermatozoides/ análise da hiperatividade espermática assistida por computador (SCA®)	18

3.7.3. Teste de integridade do DNA (SCSA®)	20
3.7.4. Dosagem de radicais livres de oxigênio (ROS)	23
3.7.5. Padronização do estudo	23
IV ANÁLISE ESTATÍSTICA	24
V RESULTADOS	25
5.1. Protocolo I - Parâmetros espermáticos após incubação de 1- 4 horas.....	25
5.2. Protocolo II - Parâmetros espermáticos após incubação com meios de cultura comerciais.....	28
5.3. Seleção do meio de cultura ideal para o espermatozoide	37
VI DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	38
VII CONCLUSÕES	44
VIII LIMITAÇÃO DO ESTUDO	45
IX REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
ANEXO I	55
ANEXO II	72
ANEXO III	75
ANEXO IV	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	-	Micrograma
µL	-	Microlitro
µm	-	Micrômetro
ART's	-	do inglês: <i>Assisted reproductive techniques</i>
ANOVA	-	Análise de variância
ADP	-	do inglês: <i>Adenosine diphosphate</i>
ATP	-	do inglês: <i>Adenosine triphosphate</i>
AMPc	-	do inglês: <i>Adenosine monophosphate cyclic</i>
ASRM	-	do inglês: <i>American Society for Reproductive Medicine</i>
BSA	-	do inglês: <i>Bovine Serum Albumin</i>
CAAE	-	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CSCM	-	do inglês: <i>Continuous Single Culture Media</i>
CO ₂	-	Dióxido de carbono
Com	-	Contados por minuto
DAB	-	3'3-diaminobenzidina
DFI	-	do inglês: <i>DNA fragmentation index</i>
DMSO	-	Dimetilsulfóxido
DNA	-	do inglês: <i>Deoxyribonucleic acid</i>
DP	-	Desvio padrão
EDTA	-	do inglês: <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EUA	-	do inglês: <i>United States of America</i>
<i>et al.</i>	-	E colaboradores
FMUSP	-	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FIV	-	do inglês: <i>In vitro Fertilization</i>
G	-	Unidade de aceleração
GPx	-	do inglês: <i>Glutathione peroxidase</i>
H	-	Hora
HÁ	-	Hiperatividade
HOS	-	do inglês: <i>Hypo-osmotic Swelling Test</i>
HSA	-	do inglês: <i>Human Serum Albumin</i>
HTF	-	do inglês: <i>Human Tubal Fluid</i>
H ₂ O ₂	-	Peroxido de hidrogênio
HCL	-	Ácido clorídrico
HDS	-	do inglês: <i>Hight DNA Stainability</i>
IM	-	Espermatozoide imóvel
ICSI	-	do inglês: <i>Intracitoplasmatic Sperm Injection</i>
IU	-	do inglês: <i>Intrauterine Insemination</i>
LIM	-	Índice de linearidade
M	-	Média
Máx	-	Máximo
mBWW	-	do inglês: <i>Modifield Biggers-Whitten-Whittingam medium</i>
Mín	-	Mínimo
Min	-	Minutos
mM	-	Milimolar
MP	-	Motilidade progressiva
MT	-	Motilidade total
Na ₂ HPO ₄	-	Hidrogeno fosfato Dissódico
NaCl	-	Cloreto de sódio

NP	- Motilidade não progressiva
Nº	- Número
O ₂	- Oxigênio molecular
OH·	- Radical hidroxila
OMS	- Organização Mundial da Saúde
P	- Significância ou nível descritivo do teste
Pág.	- Página
ROS	- do inglês: <i>Reactive Oxygen Species</i>
SCA	- do inglês: <i>Sperm Class Analyzer</i>
SCSA	- do inglês: <i>Sperm Chromatin Structure Assay</i>
SR	- do inglês: <i>Sperm Rinse</i>
SSS	- do inglês: <i>Serum Substitute Supplement</i>
STR	- Índice de retidão
T	- Tempo
TNE	- do inglês: <i>Tris-NaCl-EDT buffer</i>
TCLE	- Termo de consentimento livre e esclarecido
VAP	- do inglês: <i>Average path velocity</i>
VCL	- do inglês: <i>Curvilinear velocity</i>
VSL	- do inglês: <i>Straight-line velocity</i>
WOB	- do inglês: <i>Oscillation index</i>
ZP	- Zona pelúcida

LISTA DE SÍMBOLOS

$\pm$	-	Mais ou menos
%	-	Porcentagem
$\leq$	-	Menor e/ou igual a
$\geq$	-	Maior e/ou igual a
+	-	Mais
<	-	Menor que
>	-	Maior que
X	-	Vezes
=	-	Igual
ΔT	-	Variação de temperatura ou tempo
vs	-	Versus
$^{\circ}\text{C}$	-	Grau Celsius

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Desenho do estudo	7
Figura 2	- Fluxograma do experimento realizado no protocolo I (padronização do período ideal de incubação espermática).....	12
Figura 3	- Fluxograma do experimento realizado no protocolo II (determinação do meio de cultura favorável para os espermatozoides).....	13
Figura 4	- Testes funcionais espermáticos realizados no protocolo II.....	16
Figura 5	- Avaliação da atividade mitocondrial pela coloração 3,3'-diaminobenzidina, no qual o acúmulo de corante é proporcional à atividade mitocondrial do espermatozoide. Os espermatozoides foram classificados de acordo com os critérios descritos por Hrudka (1987).....	18
Figura 6	- Representação do software <i>Sperm Computer Analysis - SCA</i> [®] , quanto a motilidade espermática (A). Em B, esquematização dos parâmetros cinéticos de motilidade e cinética: VAP, VCL e VSL.....	19
Figura 7	- Imagem representativa da metodologia SCSA [®] , nesta metodologia, 5 mil espermatozoides são passados pelos lasers FL1 e FL3 e emitem colocação verde, quando a cromatina é normal, e coloração vermelha, quando o DNA está fragmentado. Os dados são ilustrados em um citograma. O HDS representa a região com espermatozoides com histonas anormais devido a sua alta coloração, mas cujo estresse do teste não foi suficiente para quebrar a fita de DNA.....	22

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Motivos pelos quais os pacientes procuraram consulta médica para realização da análise seminal.....	5
Tabela 2	- Diagnósticos estabelecidos após a consulta médica andrológica	6
Tabela 3	- Parâmetros de velocidade e cinética avaliados pelo software <i>Sperm Computer Analysis – SCA®</i> .	20
Tabela 4	- Média, desvio padrão, valor mínimo e máximo dos parâmetros: concentração (milhões/mL), motilidade progressiva (%), motilidade não progressiva (%), espermatozoides imóveis (%) e motilidade total (%) das amostras seminais astenozoospermicas classificadas como T0 (amostra à fresco/ controle), T1 (1 hora de incubação), T2 (2 horas de incubação), T3 (3 horas de incubação) e T4 (4 horas de incubação).....	26
Tabela 5	- Tipo de processamento seminal realizado nas amostras incluídas no protocolo II.....	28
Tabela 6	- Média, desvio padrão, valor mínimo e máximo dos parâmetros: concentração (milhões/ml), motilidade progressiva (%), motilidade não progressiva (%), espermatozoides imóveis (%), motilidade total (%), morfologia normal (segundo OMS, critério estrito de Kruger; %) e vitalidade espermática das amostras seminais astenozoospermicas classificadas como HTFs® vs. CSCMs® pré e pós-incubação por um período de 2 horas (T2).....	29
Tabela 7	- Média, desvio padrão, valor mínimo e máximo dos parâmetros: concentração (milhões/ml), motilidade progressiva (%), motilidade não progressiva (%), espermatozoides imóveis (%), motilidade total (%), morfologia normal (segundo OMS, critério estrito de Kruger; %) e vitalidade espermática das amostras seminais astenozoospermicas classificadas como HTFs® vs. SRs® nos grupos pré e pós-incubação por um período de 2 horas (T2).....	30
Tabela 8	- Média, desvio padrão, valor mínimo e máximo dos parâmetros: concentração (milhões/ml), motilidade progressiva (%), motilidade não progressiva (%), espermatozoides imóveis (%), motilidade total (%), morfologia normal (segundo OMS, critério estrito de Kruger; %) e vitalidade espermática de amostras seminais astenozoospermicas classificadas como HTFs® vs. G-IVFs® pré e pós-incubação por um período de 2 horas (T2).....	31
Tabela 9	- Média, desvio padrão, valor mínimo e máximo dos testes funcionais: atividade mitocondrial (DAB I, II, III e IV), fragmentação de DNA (SCSA® - DFI e HDS), radicais livres de oxigênio (ROS) das amostras seminais astenozoospermicas classificadas como HTFs® vs. CSCMs® pré e pós-incubação por um período de 2 horas (T2).....	32
Tabela 10	- Média, desvio padrão, valor mínimo e máximo dos testes funcionais: atividade mitocondrial (DAB I, II, III e IV), fragmentação de DNA (SCSA® - DFI e HDS), radicais livres de oxigênio (ROS) das amostras seminais astenozoospermicas classificadas como HTFs® vs. SRs® pré e pós-incubação por um período de 2 horas (T2).....	33
Tabela 11	- Média, desvio padrão, valor mínimo e máximo dos testes funcionais: atividade mitocondrial (DAB I, II, III e IV), fragmentação de DNA (SCSA® - DFI e HDS), radicais livres de oxigênio (ROS) das amostras seminais astenozoospermicas classificadas como HTFs® vs. G-IVFs® pré e pós-incubação por um período de 2 horas (T2).....	34
Tabela 12	- Média, desvio padrão, valor mínimo e máximo das características cinéticas da análise seminal computadorizada (SCA®): velocidade de curvatura (VCL), velocidade retilínea (VSL), valor médio do percurso (VAP), índice de linearidade (LIN), índice de retidão (STR), índice de oscilação (WOB) e hiperatividade (%) de amostras seminais astenozoospermicas classificadas como HTFs® vs. CSCMs® pré e pós-incubação por um período de 2 horas (T2).....	35
Tabela 13	- Média, desvio padrão, valor mínimo e máximo das características cinéticas da análise seminal computadorizada (SCA®): velocidade de curvatura (VCL), velocidade retilínea (VSL), valor médio do percurso (VAP), índice de linearidade (LIN), índice de retidão (STR), índice de oscilação (WOB) e hiperatividade (%) de amostras seminais astenozoospermicas classificadas como HTFs® vs. SRs® pré e pós-incubação por um período de 2 horas (T2).....	36

Tabela 14

Média, desvio padrão, valor mínimo e máximo dos parâmetros seminais: concentração (milhões/ml), motilidade progressiva (%), motilidade não progressiva (%), espermatozoides imóveis (%), motilidade total (%) das amostras seminais astenozoospermicas classificadas como CSCMs[®] vs. G-IVFs[®] pré e pós-incubação por um período de 2 horas (T2)..... 37

LISTA DE GRÁFICO

Gráfico 1	- Ilustração dos valores de média dos parâmetros seminais: motilidade progressiva, motilidade total e espermatozoides imóveis observados em diferentes períodos de incubação (T1, T2, T3 e T4).....	27
------------------	---	----

RESUMO

Ranéa C. *Determinação de meio de cultura favorável e período de incubação espermática de amostras seminais astenozoospermicas* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

O objetivo deste estudo foi padronizar o período ideal de incubação espermática *in vitro*, e determinar o meio de cultura favorável para o espermatozoide. Foram incluídas 82 amostras seminais astenozoospermicas, as quais foram divididas em dois protocolos distintos [protocolo I (n=28) e protocolo II (n=54)]. No protocolo I, as amostras a fresco (sem utilização de meio de cultura – T0) foram incubadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ durante 4 períodos: T1 (1 hora), T2 (2 horas), T3 (3 horas) e T4 (4 horas). No protocolo II, as amostras foram processadas pelo método gradiente descontínuo de densidade ou lavagem simples e em seguida, foram incubadas por 2 horas (período definido pelo protocolo I) em diferentes meios de cultura comercialmente disponíveis: a) Fluido Tubário Humano (do inglês *Human Tubal Fluid* - HTF[®]) + 15% Soro Substituto Sintético (do inglês *Serum Substitute Supplement* - SSS[®]), b) Meio de Cultura para Uso Contínuo (do inglês *Continuous Single Culture Medium* - CSCM[®]) + 10% Albumina Sérica Humana (do inglês *Human Serum Albumin* - HSA[®]), c) meio de Lavagem para o Espermatozoide (do inglês *Sperm Rinse* - SR[®]) + frutose e carnitina, d) Meio de Gametas para Fertilização *in Vitro* (do inglês *Gametes in Vitro Fertilization* - G-IVF[®]) + frutose + 15% SSS[®]. Parâmetros seminais e testes funcionais [análise espermática assistida por computador (SCA[®]), dosagem de radicais livres de oxigênio (ROS), avaliação da integridade do DNA (SCSA[®]), atividade mitocondrial dos espermatozoides (DAB)] foram analisados caracterizando os grupos pré e pós-incubação. Para análise estatística utilizamos Análise de variância (ANOVA), coeficiente de Correlação de Pearson, teste T de *Student* e adotamos $P < 0.05$. No protocolo I, observamos aumento significativo na motilidade progressiva dos espermatozoides (T2; $P < 0,003$) incubados durante 2 horas quando comparados com T1, T3 e T4. Além disso, no protocolo II podemos inferir que os meios de cultura CSCM[®] e G-IVF[®] são adequados para cultura de células espermáticas humanas, visto que trouxeram benefícios para motilidade dos espermatozoides (Motilidade Progressiva (MP) $P < 0,001$ e Motilidade Total (MT) $P = 0,025$ vs. MP $P = 0,023$) respectivamente. Para os demais meios de cultura, não observamos diferença significativa. Em conclusão, amostras seminais astenozoospermicas encaminhadas para técnicas de Reprodução Humana Assistida, podem ser incubadas por 2 horas com meio de cultura CSCM[®] + HSA[®], a fim de melhorar a porcentagem de motilidade dos espermatozoides.

Descritores: Espermatozoides; Meios de culturas; Motilidade espermática; Tratamento anaeróbio; Viabilidade; Técnicas de reprodução assistida.

ABSTRACT

Ranéa C. *Determination of favorable culture medium and sperm incubation period of asthenozoospermic seminal samples* [dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

The aim of this study was to standardize the ideal sperm incubation period *in vitro*, and to determine the favorable culture medium for sperm. 82 asthenozoosperm seminal samples were included, which were divided into two distinct protocols [protocol I (n= 28) and protocol II (n= 54)]. In protocol I, fresh samples (without culture medium - T0) were incubated at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere for 4 periods: T1 (1 hour), T2 (2 hours), T3 (3 hours) and T4 (4 hours). In protocol II, the samples were processed using the batch density gradient method or simple washing and then were incubated for 2 hours (period defined by protocol I) in different commercially available culture media: a) Human Tubal Fluid - HTF[®] + 15% Synthetic Serum Substitute - SSS[®], b) Single Continuous Culture Medium - CSCM[®] + 10% Human Serum Albumin - HSA[®], c) Sperm Rinse medium - SR[®] + fructose and carnitine, d) *In Vitro* Fertilization Medium - G- IVF[®] + fructose + 15% SSS[®]. Seminal parameters and functional tests [Sperm Computer Analysis (SCA[®]), Sperm Chromatin Structural Assay (SCSA[®]); Reactive Oxygen Species level (ROS), sperm mitochondrial activity (DAB)] were analyzed characterizing groups pre and post-incubation. For statistical analysis we used analysis of variance (ANOVA), Pearson's correlation coefficient, Student's t test and we adopted $P < 0.05$. In protocol I, we observed a significant increase in the progressive motility of sperm (T2; $P < 0.003$) incubated for 2 hours when compared with T1, T3 and T4. Furthermore, in protocol II we can infer that the CSCM[®] and G-IVF[®] culture media are suitable for culturing human sperm cells, since they brought benefits to sperm motility (Progressive Motility (MP) $P < 0.001$ and Total Motility (MT) $P = 0.025$ vs. MP $P = 0.023$) respectively. For the other culture media, we did not see any significant difference. In conclusion, asthenozoospermic seminal samples sent for Assisted Human Reproduction techniques, can be incubated for 2 hours with CSCM[®] + HSA[®] culture medium, in order to improve the motility percentage of the sperm.

Descriptors: Spermatozoa; Culture media; Sperm motility; Anaerobic treatment; Viability; Assisted reproduction techniques.

I. INTRODUÇÃO

De acordo com a Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva (do inglês *American Society For Reproductive Medicine* - ASRM), infertilidade é definida como ausência de gestação após um ano de relações sexuais frequentes sem uso de métodos contraceptivos (ASRM, 2006). Em 2017, uma nova publicação definiu infertilidade como a falha do casal em conceber após 6 meses de intercurso regular sem o uso de contraceptivo em mulheres (ASRM, 2017). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 80 milhões de pessoas no mundo possuem distúrbios referentes à infertilidade, sendo o fator masculino responsável por até 52% dos casos na América Latina (Agarwal et al., 2015).

Fatores intrínsecos, como doenças crônicas e sistêmicas, estilo de vida e hábitos, além de condições extrínsecas, como poluição ambiental (Hallak, 2018; Pasqualotto, 2005), podem desencadear em alterações seminais, como oligozoospermia grave (concentração espermática <5 milhões/mL), astenozoospermia (MP<32%), teratozoospermia (morfologia dos espermatozoides <4%), resultando na incapacidade do espermatozoide de alcançar e fertilizar adequadamente o oócito. No entanto, com o avanço das Técnicas de Reprodução Humana Assistida (do inglês *Assisted Reproductive Techniques* - ART's) no século XX, tratamentos opcionais de baixa e alta complexidade como fertilização *in vitro* (do inglês *In Vitro Fertilization* - FIV) ou injeção intracitoplasmática de espermatozoides (do inglês *Intracytoplasmic Sperm Injection* - ICSI) surgiram como alternativas de contornar a incapacidade da concepção para aqueles casais que enfrentam dificuldades (Pariz, *In press* 2020; Hallak, 2017). Entretanto, essas ferramentas poderosas devem ser estritamente utilizadas somente quando necessário, evitando abuso e banalização de riscos para as gerações futuras. Por essa razão, a melhoria no diagnóstico da infertilidade e a busca de possíveis estratégias terapêuticas, bem como o aprimoramento no manuseio dos gametas são questões importantes que devem ser investigadas (Hallak, 2017).

Ao longo dos últimos 25 anos de utilização das ART's, muitos aprimoramentos nos procedimentos laboratoriais contribuíram para o aumento gradual nas taxas de sucesso a medida que aproximam os gametas removidos do seu ambiente natural (*in vivo*) das técnicas laboratoriais (*in vitro*) (Quinn, 2004; Edwards et al., 1980; Palermo et al., 1992). Embora a manipulação laboratorial de gametas seja uma alternativa bem-sucedida

empregada em laboratórios de Reprodução Humana Assistida (RHA), existem alguns fatores que podem influenciar negativamente a qualidade dos espermatozoides, sendo eles: as técnicas empregadas no preparo seminal (Boomsma et al., 2007), a variação de temperatura durante o manuseio (Franken et al., 2011), velocidade de centrifugação (Monteiro et al., 2016) e o tempo de incubação *in vitro* das amostras (Yavas & Selub, 2004). Portanto, o processamento inicial dos espermatozoides deve ser realizado em meio de cultura especial e formulado para produzir um ambiente *in vitro* favorável, assim como uma temperatura ideal para manutenção dos mecanismos fisiológicos (Boomsma, Heineman, Cohlen, & Farquhar, 2007), e tempo de incubação das amostras seminais (Yavas & Selub, 2004).

A maioria dos protocolos laboratoriais para FIV e ICSI limitam a incubação de espermatozoides em temperatura a 37°C em 5% de CO₂, entretanto, sugerem a utilização dos meios de cultura formulados especificamente para embriões, como mBWW (Biggers, Whitten e Whittigham), Earle, Ham F-10 ou Fluido Tubário Humano (do inglês *Human Tubal fluid* - HTF), não havendo um meio projetado especificamente para lidar com as necessidades fisiológicas do espermatozoide (WHO, 2010; Yavas & Selub, 2004; Ahmed et al., 2018; Calamera et al., 2001; Cicaré, 2014; Hosseini & Khalili, 2017; Thijssen et al., 2014).

Ao longo do nosso estudo, buscamos responder algumas perguntas, como: Quanto tempo os espermatozoides em amostras seminais sem preparo ou processamento mantêm suas funções, ou ainda, existe algum meio comercialmente disponível que ajuda a preservar a funcionalidade dos espermatozoides em amostras astenozoospermicas durante a incubação?

Nesse contexto, este trabalho propôs 2 modelos experimentais: no primeiro, o objetivo foi comparar o tempo de incubação *in vitro* de amostra seminal a fresco (sem qualquer preparo) durante um período de 4 horas, com o objetivo de armazenar temporariamente os espermatozoides na incubadora, os quais serão utilizados na ART's e ainda mimetizar o ambiente uterino nas primeiras horas pós-ejaculação a fim de serem capazes de fertilizar o ócito. Embora os laboratórios considerem o processamento seminal, com a retirada do plasma seminal, um procedimento de rotina, neste protocolo consideramos o plasma seminal um meio de cultura natural devido à sua composição como (sal, íons, tampão e substrato de energia), suficiente para manter os espermatozoides viáveis por um tempo limitado (Szczykutowicz et al., 2019).

No segundo protocolo, 4 meios de cultura comercialmente disponíveis foram utilizados na incubação das amostras seminais para a determinação do meio de cultura favorável para a funcionalidade espermática. Neste protocolo realizamos o processamento seminal de cada amostra a fim de retirarmos o plasma seminal e o espermatozoide ter o efeito apenas dos meios de cultura estabelecidos no estudo.

É neste ponto que esse trabalho ganha particular relevância, já que não existe na literatura trabalhos que estabeleçam protocolos com meio de cultura e tempo de incubação para o desenvolvimento *in vitro* do espermatozoide.

II. OBJETIVO

Determinar o meio de cultura favorável e padronizar o período de incubação espermática *in vitro* das amostras seminais astenozoospermicas.

2.1. Objetivos específicos

- Protocolo I: Padronizar o período ideal de incubação do ponto de vista de funcional do espermatozoide;
- Protocolo II: Investigar quais meios de cultura celular disponíveis comercialmente são adequados para cultura de células espermáticas humanas e determinar o meio de cultura favorável para o espermatozoide.

2.2. Hipótese do Estudo

A incubação de espermatozoides por um determinado período pode melhorar a motilidade dos espermatozoides de homens astenozoospermicos, assim como a utilização de um meio de cultura enriquecido.

III. METODOLOGIA

3.1. Aprovação no Comitê de Ética

O presente estudo foi aprovado pelo comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAAE nº42790915.9.0000.0065, Anexo I).

3.2. Seleção de indivíduos

Este estudo prospectivo experimental incluiu 82 amostras seminais obtidas de indivíduos encaminhados a clínica de rotina andrológica do Laboratório Androscience - Clínica e Laboratório de Referência em Criopreservação e Reprodução Masculina entre agosto de 2017 a Agosto de 2019, mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo II).

No agendamento da consulta, os pacientes responderam uma ficha inicial com a informação sobre o motivo da procura do consultório em questão (Tabela 1) e, após a consulta médica, foram diagnosticados conforme Tabela 2.

Independentemente do diagnóstico médico ou queixa dos pacientes, o principal critério de inclusão do nosso estudo foram amostras astenozoospermicas.

Tabela 1. Motivos pelos quais os pacientes procuraram consulta médica para realização de análise seminal

	N	%
Outros motivos	69	84,15
Infertilidade	13	15,85
	82	100%

Os indivíduos do estudo foram classificados em grupos:

- Grupo controle (n=69): candidatos voluntários à vasectomia ou que procuraram avaliação médica para check-up ou outras causas que não interferiam na qualidade seminal.

- Grupo infértil (n=13): indivíduos com queixa de 12 meses ou mais de tentativas de gestação sem sucesso que procuraram avaliação clínica e receberam o diagnóstico de infertilidade masculina (WHO, 2010).

Tabela 2. Diagnósticos estabelecidos após a consulta médica andrológica.

	N	%
<i>Check up</i>	65	79,27
Varicocele	7	8,54
Disfunção erétil	3	3,66
Papiloma vírus humano (HPV)	1	1,22
Dor testicular	3	3,66
Pré vasectomia	1	1,22
Infecção	2	2,43
	82	100%

Os fatores de inclusão foram homens com idade entre 21 e 45 anos, amostras seminais que apresentavam motilidade progressiva abaixo de 32% (classificadas como astenozoospermicas), concentração de células redondas e leucócitos inferior a $1 \times 10^6/\text{ml}$, uma vez que geram radicais livres de oxigênio (ROS) e diminuem a motilidade espermática (de Lamirande *et al.*, 1997; Athayde *et al.*, 2007).

Os fatores de exclusão clínicos foram: pacientes com histórico de infecções prévias do trato genital, relato de febre nos últimos 90 dias, uso de drogas psicotrópicas, uso de substâncias lícitas (como tabaco, álcool, antidepressivos, corticoides) e ilícitas (cocaína, maconha, crack, heroína), a não assinatura do TCLE, idade inferior a 21 ou superior a 45 anos. Os fatores de exclusão laboratoriais foram: amostras normozoospermicas, azoospermicas e concentração de células redondas acima de 1 milhão.

Após esta seleção inicial, dividimos nosso estudo em dois protocolos distintos e independentes, ou seja, as amostras incluídas no protocolo I e II eram astenozoospermicas, porém, não eram procedentes dos mesmos indivíduos (Figura 1, vide pág. 6).

Protocolo I - padronização do período ideal de incubação de amostras seminais astenozoospermicas, sem qualquer tipo de processamento (amostras a fresco). As amostras foram incubadas em microtubo (tipo eppendorf) por um período de 4 horas, à medida que a cada 1 hora, uma alíquota seminal ($5\mu\text{l}$) era retirada da incubadora para posterior leitura, caracterizando nossos grupos: T1 (1 hora de incubação), T2 (2 horas de incubação), T3 (3 horas de incubação) e T4 (4 horas de incubação).

Protocolo II - determinação do meio de cultura favorável para incubação de amostras seminais astenozoospermicas. Todas as amostras foram processadas em duplicata, sendo uma alíquota ressuspensa com meio de cultura Fluido Tubário Humano (do inglês *Human Tubal Fluid* - HTF[®]) suplementado com 15% Soro Substituto Sintético (do inglês *Serum Substitute Supplement* - SSS) = grupo HTFs[®] e outra alíquota

com o meio de cultura comercialmente disponível e estabelecido previamente no estudo [alíquota 2: ou Meio de Cultura para Uso Contínuo (do inglês *Continuous Single Culture Media* - CSCM[®]) suplementado com 10% de Albumina Sérica Humana (do inglês *Human Serum Albumin* - HSA[®]) = grupo CSCMs[®]; ou meio de Lavagem para o Espermatozoide (do inglês *Sperm Rinse* - SR[®]) suplementado com frutose e carnitina = grupo SRs[®]; ou Meio de Gametas para Fertilização *In Vitro* (do inglês *Gametes In vitro Fertilization* - G-IVF[®]) suplementado com 15% de SSS[®] = grupo G-IVFs[®]]. Desse modo, subdividimos o protocolo II em 3 grupos; HTFs[®] vs. CSCMs[®], HTFs[®] vs. SRs[®] e HTFs[®] vs. G-IVFs[®]) pré e pós-incubação. Todas as amostras foram avaliadas antes de serem incubadas, sendo que, uma alíquota foi separada para realização dos testes funcionais (grupo pré-incubação) e outra alíquota foi mantida em incubadora durante o período padronizado no protocolo I (vide resultados pág. 23). Após esse período, a amostra seminal foi retirada da incubadora, para leitura em câmara de Makler e realização dos testes funcionais do grupo pós-incubação.

Figura 1. Desenho do estudo.

MP - Motilidade progressiva.

3.3. Análise seminal

As amostras seminais foram colhidas em área anexa ao Laboratório de Andrologia Androscience, pelo próprio paciente por masturbação, após um período de abstinência ejaculatória de no mínimo 2 e máximo 7 dias, em recipiente plástico estéril e atóxico. Após a liquefação completa do sêmen (período de 30 a 60 minutos), foi realizada a análise seminal das variáveis macroscópicas como volume (mL), pH, viscosidade e cor do sêmen. A avaliação microscópica foi realizada de acordo com os critérios estabelecidos pela OMS (WHO, 2010), os quais avaliam parâmetros de concentração, motilidade e morfologia espermática.

3.3.1 Avaliação macroscópica do sêmen

As amostras foram acondicionadas em uma placa aquecida, à temperatura de 36,7°C por 30 minutos, para que se procedesse à liquefação seminal antes da avaliação dos parâmetros macroscópicos e microscópicos.

A avaliação macroscópica do ejaculado foi realizada mediante a verificação da cor (normal: branco-opalescente). O volume do ejaculado foi medido por aspiração de toda a amostra com o auxílio de uma pipeta graduada (normal: $\geq 1,5\text{ml}$).

A viscosidade foi avaliada pipetando-se a amostra de sêmen e observando-se a extensão do filamento. Uma extensão superior a 2,0 cm foi considerada alterada, enquanto que, se normal, o sêmen deveria sair da ponteira da pipeta em gotas. O pH do sêmen liquefeito foi determinado mediante a colocação de uma gota de sêmen sobre papel sensível ao pH e comparação da cor após 30 segundos com a fita de calibragem (normal: $\geq 7,2$). O intervalo de tempo entre a coleta da amostra e sua avaliação inicial foi de cerca de 60 minutos.

3.3.2 Avaliação microscópica do sêmen

Após a avaliação das variáveis macroscópicas, a amostra foi manualmente homogeneizada, agitando-se cuidadosamente o frasco coletor por cerca de cinco segundos. Foram adicionados 5 microlitros (μL) da amostra em câmara de Makler (*Sperm*

Counting Chamber, Sefi-Medical Instruments, Israel) para observação em microscópio óptico com magnificação de 200 vezes (x) (Eclipse E400, Nikon, Japão). Os seguintes parâmetros microscópicos foram avaliados: concentração de espermatozoides (milhões/ml), motilidade total (%), motilidade progressiva (%), motilidade não progressiva (%), espermatozoides imóveis (%) e concentração de células redondas (milhões/ml), seguindo as recomendações descritas pela OMS (WHO, 2010).

3.3.2.1. Determinação da concentração espermática

A concentração espermática foi determinada através da câmara de Makler. A câmara possui uma profundidade de 0,01 mm e marcação graduada de 100 quadrados, cada um com 0,1mm x 0,1mm. O volume compreendido na área de 10 quadrados é de 0,001mm³ ou milhão por ml. Sendo assim, a leitura direta da concentração da amostra de sêmen (10⁶/mL) foi realizada pela simples contagem dos espermatozoides presentes na área de uma linha (dez quadrados) e os resultados expressos em milhões de espermatozoides por mililitro (mL) de amostra seminal.

3.3.2.2. Motilidade espermática

A avaliação da motilidade, segundo os padrões estipulados pela OMS, foi realizada em microscopia de fase, com magnificação de 200x utilizando-se câmara de Makler. Esse procedimento foi realizado em duplicata, sendo que em casos de diferença superior a 10% entre as duas avaliações, uma terceira contagem foi necessária (WHO, 2010; 1999).

Os espermatozoides avaliados foram distribuídos em categorias de acordo com o grau de movimentação que apresentavam, e foram classificados como:

- Espermatozoides progressivos - espermatozoides que se movem em sentido direcional (WHO, 2010) [soma de espermatozoides grau A+B (WHO, 1999)];
- Espermatozoides não progressivos - espermatozoides que se movem, mas não se deslocam (WHO, 2010) [espermatozoides grau C (WHO, 1999)];
- Espermatozoides imóveis - espermatozoides sem motilidade (WHO, 2010) [espermatozoides grau D (WHO, 1999)];
- Motilidade total - espermatozoides progressivos + espermatozoides não progressivos [soma de espermatozoides grau A+B+C (WHO, 1999)].

3.3.2.3. Morfologia

Foi realizado um esfregaço do sêmen com 5µl da amostra liquefeita em lâmina de microscopia (Exacta, China). Em seguida, utilizamos a coloração Panótico (Laborclin, Brasil) e após a secagem, realizamos a leitura da lâmina em microscópio óptico comum com magnificação de 1000x sob óleo de imersão, classificando no mínimo 100 e, preferencialmente, 200 células coradas (WHO, 2010). Os espermatozoides foram medidos com um micrômetro ocular e pelo menos quatro áreas diferentes foram analisadas em cada esfregaço.

Segundo o critério da OMS para análise morfológica das amostras, o segmento cefálico do espermatozoide deve medir entre 4,0 e 5,5µm de comprimento e 2,5 e 3,5µm de largura, não ter defeitos grosseiros na cauda ou peça intermediária. A peça intermediária é considerada normal com valor inferior a 1µm, já a cauda com um comprimento aproximado de 45µm.

De acordo com a classificação do critério estrito de Kruger, um espermatozoide é considerado normal quando sua cabeça possui configuração oval, absolutamente perfeita, com um acrossoma bem definido, abrangendo cerca de 40% a 70% da porção cefálica do espermatozoide. As cabeças com formato limítrofe são consideradas anormais. O comprimento das cabeças normais para espermatozoides corados, é de 5 µm a 6 µm e a largura de 2,5 µm a 3,5 µm. Não deve haver nenhuma anormalidade na peça intermediária ou na cauda. A peça intermediária deve ser delgada, anexada à parte central do corpo e com menos de 1 µm de largura, enquanto seu comprimento deve ser de aproximadamente uma vez e meia o da cabeça. A gota de inclusão citoplasmática não poderá ser maior do que a metade da porção cefálica do espermatozoide, enquanto a cauda deve ser uniforme, ligeiramente mais fina que a peça intermediária, com aproximadamente 45 µm, e não poderá ser em espiral (Kruger *et al.*, 1986).

No presente estudo, utilizamos o critério segundo OMS e Kruger para avaliação da morfologia espermática.

3.3.2.4. Viabilidade espermática /Inchaço hiposmótico (HOS)

O teste de vitalidade foi desenvolvido para avaliar a integridade funcional da membrana espermática. Espermatozoides viáveis com membrana íntegra, quando em ambiente hiposmótico, exibem um inchaço na cauda curvando-se devido ao influxo de

água. Nesse estudo, as amostras que apresentaram motilidade total (soma Motilidade Progressiva - MP e Motilidade não progressiva - NP) abaixo de 30%, foram submetidas a este teste. Para isso, foram adicionados 1000 μ L de solução hiposmótica (0,735 g de citrato de sódio di-hidratado e 1,351 g de D-frutose em 100 ml de água destilada) e 100 μ L da amostra seminal em tubo tipo eppendorf, foram homogeneizadas e incubadas por 60 minutos em banho seco (Labnet D-1100: Edison, NJ, EUA). Após a incubação, 15 μ L desse preparo foram adicionados à lâmina e coberto com lamínula para leitura em microscópio de luz em amplificação de 400x. Consideramos como espermatozoides viáveis aqueles que apresentaram curvatura ou inchaço de cauda (Jeyendran *et al.*, 1984).

3.4. Protocolo I: padronização do período ideal de incubação espermática

Após análise seminal inicial T0 (pré-incubação), as amostras a fresco (sem processamento seminal ou adição de meio de cultura) foram mantidas em tubo eppendorf sob óleo mineral e incubadas a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂ (SANYO MCO – 5AC: Osaka, Japão) até um intervalo de tempo (T) de 4 horas. A cada hora, uma alíquota da amostra seminal (5 μ l) era retirada da incubadora para análise dos parâmetros seminais (análise pós-incubação) em câmara de Makler, sob microscópio ótico de luz com ampliação de 200 vezes, caracterizando os grupos: 1 (1 hora), 2 (2 horas), 3 (3 horas) e 4 (4 horas) (Figura 2).

Figura 2. Fluxograma do experimento realizado no protocolo I (padronização do período ideal de incubação espermática).

MP - Motilidade Progressiva; T1 - 1 hora de incubação; T2 - 2 horas de incubação; T3 - 3 horas de incubação; T4 - 4 horas de incubação.

3.5. Protocolo I vs. Protocolo II

Após finalização do protocolo I e padronização do tempo ideal de incubação espermática, foi realizado o protocolo II para determinar o meio de cultura favorável para os espermatozoides (Figura 3), tendo como base o mesmo critério de análise seminal estabelecido pelo protocolo I. As modificações do protocolo II incluem basicamente o processamento seminal, a inclusão dos meios de cultura antes do período de incubação (determinado pelo protocolo I) e a realização dos testes funcionais nos grupos pré e pós-incubação.

Figura 3. Fluxograma do experimento realizado no protocolo II (determinação do meio de cultura favorável para os espermatozoides).

MP - Motilidade progressiva; T - Tempo; HTFs® - HTF® suplementado com SSS®; CSCMs® - CSCM® suplementado com HSA®; SRs® - SR® suplementado com frutose e carnitina; G-IVFs® - G-IVF® suplementado com frutose e SSS®.

3.6. Protocolo II: Determinação do meio de cultura ideal para incubação espermática

Todas as amostras do protocolo II foram processadas antes de serem incubadas com meios de cultura e suplementos disponíveis comercialmente (a fim de, a amostra ter influência apenas do meio de cultura e suplementos utilizados). Empregamos basicamente duas técnicas de processamento seminal distintas, de acordo com a característica de cada amostra seminal (processamento por gradiente descontínuo de densidade ou lavagem simples).

3.6.1. Processamento seminal por gradiente descontínuo de densidade

O processamento seminal por gradiente descontínuo de densidade (Isolate, Irvine Scientific, Santa Ana/CA, EUA) tem como objetivo separar e selecionar espermatozoides viáveis, excluir células redondas e debris celulares do líquido seminal (Nicholson, 2000). Após análise seminal, a amostra foi dividida em duas alíquotas onde ambas foram processadas da mesma forma. Foram adicionados 500 µl de meio Lower[®] em tubo cônico de 15 ml e posteriormente adicionado cuidadosamente 500µl de Upper[®] de forma que os meios não se misturassem. Em seguida, 500µl de amostra foram adicionadas, para que se formassem 3 camadas distintas. O tubo foi centrifugado por 300g por 15 minutos (min), o sobrenadante retirado e o *pellet* depositado no fundo do tubo foi ressuspensionado novamente em 500µl de meio de cultura de acordo com o protocolo estabelecido: HTFs[®] (alíquota 1) vs. (alíquota 2) CSCMs[®] ou SRs[®] ou G-IVFs[®]. Uma alíquota do volume da amostra seminal foi reservado para avaliação dos parâmetros seminais e testes funcionais pré-incubação [cinética espermática (SCA[®]), dosagem de radicais livres de oxigênio (ROS), avaliação da integridade do DNA (SCSA[®]), atividade mitocondrial dos espermatozoides (DAB)] e outra alíquota foi mantida em incubadora durante o período estabelecido pelo protocolo I, caracterizando as análises dos parâmetros seminais e testes funcionais pós-incubação.

3.6.2. Lavagem simples

O processamento seminal por lavagem simples consiste em etapas de centrifugação, lavagem do sêmen e remoção de células redondas (células germinativas e leucócitos) da amostra seminal (Pariz, Monteiro, Hallak, 2020).

Após análise seminal, a amostra foi dividida em duas alíquotas onde ambas foram processadas igualmente. O líquido seminal foi centrifugado por 300g por 8 min, o sobrenadante foi retirado e o *pellet* depositado no fundo do tubo foi ressuspensionado de acordo com o protocolo do estudo: HTFs[®] (alíquota 1) vs. (alíquota 2) CSCMs[®] ou SRs[®] ou G-IVFs[®]. Após ressuspê-las, uma alíquota da amostra seminal foi separada para avaliação dos parâmetros seminais e testes funcionais pré-incubação (SCA[®], ROS, SCSA[®] e DAB) e outra alíquota foi mantida em incubadora durante o período

estabelecido pelo protocolo I, caracterizando as análises dos parâmetros seminais e testes funcionais pós-incubação.

3.6.3. Meios de cultura e suplementos utilizados

Os meios de cultura selecionados para esta pesquisa foram: Fluido Tubário Humano (HTF[®] comum - Irvine Scientific, Santa Ana, CA, EUA), Meio de Cultura para Uso Contínuo (CSCM[®] - Irvine Scientific), Meio de Lavagem para o Espermatozoide (SR[®] - Vitrolife, San Diego, CA, USA) e Meio de Gametas para Fertilização *In Vitro* (G-IVF[®] - Vitrolife) (Anexo III). Utilizamos suplementos como: Soro Substituto Sintético (SSS[®] - Irvine Scientific), Albumina Sérica Humana (HSA[®] - Irvine Scientific), frutose (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) e L-Carnitina (Sigma Aldrich), os quais compuseram nossos grupos de estudo:

- Grupo I - Meio HTF[®] comum + 15% SSS[®] = HTFs[®] vs. Meio CSCM[®] + 10% HSA[®] = CSCMs[®];
- Grupo II - Meio HTF[®] comum + 15% SSS[®] = HTFs[®] vs. Meio SR[®] + Frutose + Carnitina = SRs[®];
- Grupo III - Meio HTF[®] comum + 15% SSS[®] = HTFs[®] vs. Meio G-IVF[®] + Frutose + 15% SSS[®] = G-IVFs[®].

Os meios de cultura utilizados foram designados e recomendados para serem equilibrados e mantidos a temperatura de 37°C na presença de 5% de CO₂.

3.6.4. Incubação das amostras

Após realização do processamento seminal em duplicata (ressuspensão do *pellet* em dois meios de cultura distintos) as amostras foram mantidas sob óleo mineral e incubadas a temperatura de 37°C em uma atmosfera de 5% CO₂ durante o período de tempo estabelecido no protocolo I. Uma alíquota da amostra foi reservada para avaliação dos parâmetros seminais e dos testes funcionais (DAB, SCA[®], SCSA[®], ROS) no grupo pós-incubação.

3.7. Avaliação dos testes funcionais espermáticos

Avaliamos características funcionais dos espermatozoides como: atividade mitocondrial dos espermatozoides (DAB), cinética espermática (SCA[®]), fragmentação de DNA (SCSA[®]) e radicais livres de oxigênio (ROS) (figura 4).

Figura 4. Testes funcionais espermáticos realizados no protocolo II.

3.7.1. Avaliação da atividade mitocondrial dos espermatozoides -3,3'-diaminobenzidina (DAB)

As mitocôndrias são organelas celulares de extrema importância para a respiração celular, sendo responsáveis por aproximadamente 90% da produção de energia celular

sob a forma de ATP, consumida principalmente para a motilidade espermática. Este processo de geração de energia depende da manutenção de um potencial eletrolítico entre o ambiente intra e extra-mitocondrial, o que por sua vez requer uma membrana mitocondrial íntegra e com permeabilidade seletiva (Hrudka, 1987). A avaliação da atividade mitocondrial foi avaliada pelo método de coloração por 3,3'-diaminobenzidina (DAB), o qual se baseia na oxidação desse reagente pela enzima citocromo C oxidase, com posterior polimerização e deposição do DAB na bainha mitocondrial ao longo da peça intermediária dos espermatozoides (Hrudka, 1987). Inicialmente, adicionamos 50µl de solução DAB a 50µl de amostra seminal em um micro tubo, em seguida, incubamos por 1 hora a 36,7°C em banho-maria, no escuro com o frasco aberto. Após o período de incubação realizamos um esfregaço de 10µl do preparo em lâmina de microscopia, os quais secaram em ambiente escuro por serem reagentes fotossensíveis. Após secagem, realizamos a coloração do fundo da lâmina com o reagente ácido pícrico (coloração NF PICS), para facilitar a visualização da peça intermediária do espermatozoide. Para isso, cobrimos todo o esfregaço com o corante NF PICS e deixamos agir por 15 segundos, em seguida lavamos em água corrente e aguardamos a secagem. A leitura da lâmina foi realizada em microscópio óptico equipado com contraste de fase comum, onde foram avaliadas 100 células em magnificação de 1000x e sob óleo de imersão, as quais foram classificadas de acordo com a coloração da peça intermediária (escala de classes proposta por Hrudka, 1987) sendo que: a classe I (DAB I) apresenta 100% da peça intermediária corada, ou seja, todas mitocôndrias estão ativas; classe II (DAB II) possui $\geq 50\%$ da peça intermediária corada; classe III (DAB III) representa $< 50\%$ da peça intermediária corada; e classe IV (DAB IV) demonstra ausência de coloração na peça intermediária (Figura 5).

Figura 5. Avaliação da atividade mitocondrial pela coloração 3,3'-diaminobenzidina, no qual o acúmulo de corante é proporcional à atividade mitocondrial do espermatozoide. Os espermatozoides foram classificados de acordo com os critérios descritos por Hrudka (1987).

Fonte: Pariz e Hallak, 2016.

3.7.2. Cinética dos espermatozoides/ Análise espermática assistida por computador (SCA[®])

A introdução do sistema de análise espermática assistida por computador, permitiu o conhecimento profundo, bem como a mensuração das características do movimento dos espermatozoides, principalmente a hiperatividade (Burkman, 1991; Davis & Katz, 1992).

Para a análise da hiperatividade espermática, a amostra seminal foi submetida à análise da motilidade pelo analisador *Sperm Computer Analysis* (SCA[®] - SL, Barcelona, Espanha). O componente SCA[®] é acoplado ao computador e conectado ao microscópio, o qual é ligado a uma câmera, permitindo análises detalhadas das relações entre o movimento e a função espermática devido à velocidade e a precisão de tal sistema (Holt *et al.*, 2007).

Adicionamos 5 microlitros (µl) da amostra de sêmen em câmara de *Makler Counting Chamber* para observação em microscópio com ampliação de 100 vezes (objetiva de 10x), o focamos em uma área fora do quadrante, onde não havia muitos resíduos. As velocidades espermáticas foram medidas por meio do sistema de análise espermática assistida por computador. O microscópio estava conectado a uma câmera de vídeo para a captura de imagens realizada em campos diferentes da câmara.

Os espermatozoides foram marcados com cores distintas, pelo programa SCA®, de acordo com o grau de motilidade que apresentavam (vermelho e verde= motilidade progressiva, azul= motilidade não progressiva, amarelo= espermatozoide imóvel) (Figura 6), as imagens foram salvas em nosso banco de dados e um laudo em PDF foi gerado pelo programa.

Os parâmetros: concentração, motilidade progressiva, motilidade não progressiva, espermatozoides imóveis e motilidade total foram calculados automaticamente, considerando o volume seminal mensurado antes e após o processamento.

Se uma trajetória de movimento do espermatozoide é regular e linear, a velocidade média do percurso (VAP) é quase idêntica à velocidade retilínea (VSL), ou seja, quanto maior a irregularidade do movimento espermático, maior a diferença entre VAP e VSL. Consequentemente, a oscilação (WOB), linearidade (LIN), retidão (STR), deslocamento lateral da cabeça (ALH) e batimento cruzado (BCF) podem ser prejudicados pela redução da VSL e aumento da VAP (Mortimer *et al.*, 2015) (Tabela 3).

Figura 6. Representação do software *Sperm Computer Analysis* - SCA®, quanto a motilidade espermática (A). Em B, esquematização dos parâmetros cinéticos de motilidade e cinética: VAP, VCL e VSL.

VAP - Velocidade média do percurso; VCL - Velocidade curvilínea; VSL - Velocidade retilínea.

Tabela 3. Parâmetros de velocidade e cinética avaliados pelo software *Sperm Computer Analysis – SCA®*.

Parâmetro avaliado	Sigla	Definição
Motilidade progressiva (%)	PR	Espermatozoides que se movem em sentido direcional (deslocam em uma direção).
Motilidade não progressiva (%)	NP	Espermatozoides com motilidade, mas sem deslocamento.
Imóveis (%)	IM	Espermatozoides sem motilidade.
Velocidade curvilínea ($\mu\text{m/s}$)	VCL	Velocidade em tempo médio da cabeça do espermatozoide ao longo de seu trajeto curvilíneo. É uma medida do vigor celular.
Velocidade retilínea ($\mu\text{m/s}$)	VSL	Tempo médio da velocidade da cabeça do espermatozoide ao longo da linha reta entre a primeira e última posição detectada.
Velocidade média do percurso ($\mu\text{m/s}$)	VAP	Tempo médio da velocidade da cabeça do espermatozoide ao longo de seu trajeto. Esse índice é calculado utilizando a trajetória curvilínea de acordo com algoritmos no módulo Motilidade SCA®.
Índice de linearidade (%)	LIN	A linearidade de um trajeto curvilíneo, VSL / VCL
Índice de oscilação (%)	WOB	Medida de oscilação do trajeto real sobre o caminho médio, VAP / VCL .
Índice de retidão (%)	STR	Linearidade do caminho médio, VSL / VAP
Hiperatividade (%)	HA	Movimento que fornece ao espermatozoide maior propulsão para atravessar o <i>cumulus</i> , zona pelúcida e fertilizar o oócito.

3.7.3. Teste de Integridade do DNA (SCSA®)

A avaliação da integridade do DNA espermático foi realizada pelo método de ensaio da estrutura da cromatina espermática Sperm Chromatin Structure Assay - SCSA® (Evenson et al., 2016), o qual avalia a susceptibilidade do DNA para desnaturação induzida por ácidos e analisa a razão entre DNA de fita simples ou dupla corados por laranja de acridina e avaliados por técnica de citometria de fluxo (Evenson *et al.*, 1985). Especificamente no SCSA®, cinco a dez mil espermatozoides são avaliados individualmente em alguns segundos. Há vantagem de os resultados serem menos subjetivos que os testes realizados por técnicas mais simples onde são analisados apenas entre 100 e 200 espermatozoides. No SCSA®, os dados são convertidos e analisados em citogramas produzidos pelo software do teste, de modo que o eixo x do citograma representa a fluorescência vermelha que cora DNA de cadeia simples, ou seja, quanto maior o valor de x, maior a fragmentação de DNA dos espermatozoides da amostra. O eixo y representa a fluorescência verde que cora espermatozoides com cromatina normal, sendo adotado o 75% como valor limite entre cromatina normal e anormal. Os dados brutos do citograma são convertidos pelo SCSA® software, transformando-os em um painel de fácil interpretação e

visualização que determina a porcentagem de espermatozoides com DNA normal e anormal, DNA com taxa de fragmentação moderada e alta índice de fragmentação para aplicação clínica do teste (Evenson *et al.*, 1985; Evenson, 2016).

O índice de fragmentação do DNA (do inglês “DNA fragmentation index” - DFI) e alta capacidade de coloração do DNA (do inglês “High DNA Stainability” - HDS) são parâmetros do SCSA® que indicam a fração do DNA de espermatozoides fragmentados ou incompleta condensação da cromatina. Tem sido demonstrado que a chance de gravidez espontânea diminui quando o DFI excede 20% a 30% (Evenson *et al.*, 2002).

Uma alíquota de sêmen foi congelada em nitrogênio líquido para posterior leitura pelo equipamento de citometria de fluxo (FACSCalibur, BD, Franklin Lakes, NJ, EUA). As amostras de sêmen (5µL) foram descongeladas e diluídas com 200 µL de solução tampão TNE 1X (0,15M NaCl, 0,01M Tris-HCl, 0,001M de EDTA, pH=7,4: Sigma-Aldrich, Estados Unidos), posteriormente, adicionou-se 400 µL de solução ácida detergente (0,08M HCl, 0,15M NaCl, 0,1% Triton X 100, pH=1,2, Sigma-Aldrich, EUA). Exatamente 30 segundos depois, 1200µL de solução de Coloração SCSA® [6,0 µg de laranja de acridina (Polysciences Inc, EUA), 0,037M de ácido cítrico, 0,126M Na₂HPO₄, 0,0011M EDTA, 0,15M NaCl, pH=6 (Sigma-Aldrich, Estados Unidos)] foram adicionados (Evenson, 2016). Os dados foram colocados no software SCSA® para o cálculo da taxa de DFI e HDS, de acordo com a coloração emitida nos lasers FL1 e FL3 do citômetro (Figura 7).

Figura 7. Imagem representativa da metodologia SCSA[®], nesta metodologia, 5 mil espermatozoides são passados pelos lasers FL1 e FL3 e emitem coloração verde, quando a cromatina é normal, e coloração vermelha, quando o DNA está fragmentado. Os dados são ilustrados em um citograma. O HDS representa a região de espermatozoides com histonas anormais devido a sua alta coloração, mas cujo estresse do teste não foi suficiente para quebrar a fita de DNA.

Fonte: Evenson (2016)

3.7.4. Dosagem de Radicais Livres de Oxigênio (ROS)

A mensuração de radicais livres de oxigênio no sêmen lavado foi realizada através da quimioluminescência, utilizando-se o Luminol como reagente. Nessa análise, os espermatozoides apresentavam uma quantidade mensurável de luz (expressa como resultado) quando em contato com a sonda quimioluminescente (luminol), o qual reage com diversas espécies reativas de oxigênio como, H_2O_2 , $OH^\cdot$ e O_2 (Athayde *et al.*, 2007).

Para realização do teste, em um tubo de ensaio transparente e sem marcação, acrescentamos 400 μ l de HTF[®] com adição do luminol para avaliarmos a quimioluminescência do HTF[®] [5mM de luminol em 400 μ L de DMSO (Sigma Aldrich)]. Em outro tubo, adicionamos 400 μ l da amostra seminal lavada e 10 μ l do luminol. A quimioluminescência foi medida por 15 minutos à 37°C em luminômetro sensível (Berthold, Alemanha) . A média dos resultados dos tubos foi subtraída do resultado do tubo controle contendo HTF[®] modificado (Irvine Scientific) e luminol, resultando em um valor ΔT . Os resultados foram expressos em fótons contados por minutos (cpm) (Athayde *et al.*, 2007).

Os valores de normalidade para os níveis de ROS determinados por Athayde *et al.* (2007) são:

Sêmen lavado

Sem leucócitos <10,0x10⁴ cpm/20x10⁶ espermatozoides

Com leucócitos < 51,5x10⁴ cpm/20x10⁶ espermatozoides

3.7.5. Padronização do estudo

No presente estudo realizamos o controle da qualidade e padronizamos a análise seminal e testes funcionais, visto que um único profissional executou todos os testes propostos pelo estudo.

IV. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi executada no programa IBM SPSS 19.0 para Windows (IBM SPSS, Inc, Chicago, IL). Para todas as análises, foi adotado um α de 5% ($P < 0,05$ diferença estatística significativa) e todos os dados seguiam uma distribuição normal.

No protocolo I utilizamos análise de variância (ANOVA: comparação de 3 grupos ou mais) para padronizarmos o tempo ideal de incubação espermática entre os grupos T1, T2, T3, T4 e teste de Tukey (Tukey's HSD) para verificar quais grupos se diferiram entre si. Posteriormente, realizamos um teste de correlação de Pearson para verificar possíveis correlações entre as variáveis do estudo (tempo: T1, T2 T3, T4 vs. concentração, motilidade progressiva, motilidade não progressiva, motilidade total e espermatozoides imóveis).

Em relação ao protocolo II, empregamos o teste T de *Student* Independente (comparação de 2 grupos) para determinação do meio de cultura favorável para os espermatozoides a partir da análise dos parâmetros seminais e testes funcionais nos grupos: HTFs[®] vs. CSCMs[®], HTFs[®] vs. SRs[®], HTFs[®] vs. G-IVFs[®] antes e após a incubação.

V. RESULTADOS

5.1. Protocolo I - Parâmetros espermáticos após incubação de 1-4 horas

28 amostras coletadas de homens com média de idade de $33,00 \pm 8,77$ foram incubadas em 4 intervalos de tempo distintos, caracterizando os grupos: T0 (amostra a fresco, sem incubação), T1 (1 hora de incubação), T2 (2 horas de incubação), T3 (3 horas de incubação) e T4 (4 horas de incubação).

Os valores das médias, desvio padrão, valor mínimo e máximo dos parâmetros seminais: concentração, motilidade progressiva, motilidade não progressiva, espermatozoides imóveis e motilidade total estão contidos na Tabela 4.

A incubação espermática durante 1, 3 e 4 horas apresentou efeitos negativos na qualidade espermática, visto que a média de motilidade progressiva (MP) diminuiu significativamente nesses períodos de incubação ($22,93 \pm 14,52$ vs. $23,98 \pm 14,03$ vs. $18,49 \pm 10,45$) respectivamente. Por outro lado, foi observado aumento na média da motilidade progressiva em amostras astenozoospermicas incubadas durante 2 horas (T2) ($30,01 \pm 15,16$; $P=0,003$).

Através do teste de correlação de Pearson, estabelecemos uma correlação negativa entre o tempo de incubação, a porcentagem de espermatozoides progressivos ($R= -0,328$; $P<0,001$), e espermatozoides não progressivos ($R= -0,181$; $P=0,36$), ou seja, quanto maior o tempo de incubação, menor a porcentagem de espermatozoides progressivos e não progressivos. Em relação aos parâmetros: motilidade não progressiva, motilidade total e porcentagem de espermatozoides imóveis, não foi possível observar diferença significativa ($P\geq 0,05$) nos grupos T1, T2, T3 e T4. Entretanto, observamos tendência estatística ao aumento na porcentagem de motilidade total e diminuição na porcentagem de espermatozoides imóveis em T2 ($P\geq 0,05$; Tabela 4).

Tabela 4. Média, desvio padrão, valor mínimo e máximo dos parâmetros: concentração (milhões/mL), motilidade progressiva (%), motilidade não progressiva (%), espermatozoides imóveis (%) e motilidade total (%) das amostras seminais astenozoospermicas classificadas como T0 (amostra à fresco/ controle), T1 (1 hora de incubação), T2 (2 horas de incubação), T3 (3 horas de incubação) e T4 (4 horas de incubação).

	Amostra a fresco (T0) (n= 28)	T1 (n= 28)	T2 (n= 28)	T3 (n= 28)	T4 (n= 28)	P
Concentração (milhões/mL)						
Média; DP	39,39; 50,38	33,97; 34,59	38,81; 40,20	29,26; 27,69	31,76; 24,13	0,816
Mín-Máx	1,00 – 258,00	0,60 – 168,00	1,10 – 160,00	0,70 – 107,00	0,80 – 89,00	
Motilidade progressiva (MP; %)						
Média; DP	16,86; 9,54 ^a	22,93; 14,52 ^{ad}	30,01; 15,16 ^{bc}	23,98; 14,03 ^{cd}	18,49; 10,45 ^d	0,003
Mín-Máx	3,00 – 31,00	0,00 – 60,00	1,00 – 64,00	0,00 – 53,00	0,00 – 40,00	
Motilidade não progressiva (NP; %)						
Média; DP	26,14; 14,53	25,63; 11,77	20,97; 13,02	20,58; 12,01	20,70; 10,62	0,243
Mín-Máx	0,00 – 54,00	9,00 – 60,00	4,00 – 57,00	2,00 – 53,00	6,00 – 43,00	
Imóvel (IM; %)						
Média; DP	56,71; 14,11	51,44; 14,86	48,60; 15,99	55,05; 16,91	59,81; 11,96	0,068
Mín-Máx	30,00 – 86,00	23,00 – 85,00	14,00 – 84,00	18,00 – 96,00	40,00 – 84,00	
Motilidade total (MT; %)						
Média; DP	43,68; 14,59	48,57; 14,85	50,95; 16,23	44,56; 16,73	39,19; 11,88	0,058
Mín-Máx	14,00 – 70,00	15,00 – 77,00	15,00 – 86,00	4,00 – 82,00	16,00 – 60,00	

Média; Desvio Padrão (DP); Mín-Máx: valores mínimo e máximo; Diferentes letras sobrescritas na mesma linha indicam diferença significativa; * $P < 0,05$; ANOVA.

Ao compararmos os valores das médias dos parâmetros seminais: motilidade progressiva, motilidade total e espermatozoides imóveis, foi observado pico na motilidade progressiva (MP) e motilidade total (MT) (M=30,01; M=48,60) respectivamente, seguida de queda na porcentagem de espermatozoides imóveis (M=50,95) após 2 horas de incubação (T2). Motivo pelo qual, selecionamos o período de 2 horas de incubação para prosseguimento do nosso estudo (protocolo II).

Gráfico 1. Ilustração dos valores de média dos parâmetros seminais: motilidade progressiva, motilidade total e espermatozoides imóveis observados em diferentes períodos de incubação (T1, T2, T3 e T4).

T0 - amostra a fresco (sem incubação); T1 - 1 hora incubação; T2 - 2 horas de incubação; T3 - 3 horas incubação; T4 - 4 horas de incubação.

5.2. Protocolo II - Parâmetros espermáticos após incubação com meios de cultura comerciais

No protocolo II (média de idade: $33,00 \pm 10,12$), avaliamos os meios de cultura celular disponíveis comercialmente e os subdividimos em 3 grupos; HTFs[®] vs. CSCMs[®], HTFs[®] vs. SRs[®] e HTFs[®] vs. G-IVFs[®]. Estabelecemos como grupo controle as amostras processadas sem incubação (grupo pré-incubação). Todas as amostras incluídas nesse protocolo foram processadas antes de serem incubadas de acordo com a Tabela 5.

Tabela 5. Tipo de processamento seminal realizado nas amostras incluídas no protocolo II.

Processamento seminal	Grupos					
	CSCMs [®]		G-IVFs [®]		SRs [®]	
	N	%	N	%	N	%
Gradiente descontínuo de densidade	7	38,9%	4	22,2%	6	33,3%
Lavagem simples	11	61,1%	14	77,8%	12	66,7%
Total	18	100%	18	100%	18	100%

N: número de amostras processadas

Na Tabela 6 estão contidos os resultados das médias, desvio padrão, valor mínimo e máximo dos parâmetros seminais: concentração, motilidade progressiva, motilidade não progressiva, espermatozoides imóveis, motilidade total, morfologia normal (segundo OMS e Kruger) e vitalidade espermática dos grupos HTFs[®] vs. CSCMs[®] pré e pós-incubação.

Quando comparamos os grupos HTFs[®] vs. CSCMs[®], não observamos diferença estatística nos parâmetros seminais dos grupos pré e pós-incubação HTFs[®] ($P \geq 0,05$), verificamos apenas tendência de diminuição não significativa na porcentagem de espermatozoides imóveis ($71,55 \pm 16,45$ vs. $58,83 \pm 21,22$; $P = 0,052$). Em contrapartida, observamos aumento na média da motilidade progressiva ($8,33 \pm 6,82$ vs. $24,55 \pm 13,97$; $P < 0,001$) e motilidade total ($26,61 \pm 18,10$ vs. $41,17 \pm 19,06$; $P = 0,025$) no grupo pós-incubação CSCMs[®].

Em relação aos demais parâmetros seminais (concentração, motilidade não progressiva, espermatozoides imóveis, vitalidade espermática, morfologia normal segundo OMS e critério estrito de Kruger), não foi possível observar diferença estatística nos grupos pré e pós-incubação com CSCMs[®] ($P \geq 0,05$).

Tabela 6. Média, desvio padrão, valor mínimo e máximo dos parâmetros seminais: concentração (milhões/ml), motilidade progressiva (%), motilidade não progressiva (%), espermatozoides imóveis (%), motilidade total (%), morfologia normal (segundo OMS, critério estrito de Kruger; %) e vitalidade espermática das amostras seminais astenozoospermicas classificadas como HTFs® vs. CSCMs® pré e pós-incubação por um período de 2 horas (T2).

	HTFs®			CSCMs®		
	Pré-incubação (n=18)	Pós-incubação (n=18)	Valor de <i>P</i>	Pré-incubação (n=18)	Pós-incubação (n=18)	Valor de <i>P</i>
Concentração (milhões/mL)						
Média; DP	18,04; 14,76	17,69; 13,58	0,941	19,54; 20,09	16,92; 9,81	0,623
Mín-Máx	2,40 - 67,00	1,90 - 53,00		1,80 - 91,00	2,30 - 32,00	
Motilidade progressiva (MP; %)						
Média; DP	12,05; 11,44	19,83; 15,04	0,090	8,33; 6,82	24,55; 13,97	<0,001
Mín-Máx	0,00 - 48,00	0,00 - 51,00		0,00 - 21,00	3,00 - 51,00	
Motilidade não progressiva (NP; %)						
Média; DP	17,50; 10,42	17,28; 11,42	0,952	18,28; 14,65	16,61; 9,94	0,693
Mín-Máx	4,00 - 33,00	2,00 - 37,00		0,00 - 47,00	4,00 - 36,00	
Imóvel (IM; %)						
Média; DP	71,55; 16,45	58,83; 21,22	0,052	69,94; 18,09	58,83; 19,06	0,089
Mín-Máx	35,00 - 95,00	23,00 - 94,00		37,00 - 93,00	18,00 - 91,00	
Motilidade total (MT; %)						
Média; DP	28,39; 16,38	37,11; 20,87	0,172	26,61; 18,10	41,17; 19,06	0,025
Mín-Máx	5,00 - 65,00	5,00 - 76,00		2,00 - 56,00	9,00 - 82,00	
Morfologia normal (OMS; %)						
Média; DP	4,75; 2,49	5,06; 2,95	0,362	5,37; 3,30	5,37; 2,39	0,500
Mín-Máx	2,00 - 10,00	2,00 - 11,00		1,00 - 14,00	2,00 - 10,00	
Morfologia normal (Kruger; %)						
Média; DP	0,87; 1,09	0,88; 1,05	0,835	1,00; 1,21	1,31; 1,19	0,429
Mín-Máx	0,00 - 3,00	0,00 - 3,00		0,00 - 4,00	0,00 - 3,00	
Vitalidade (%)						
Média; DP	41,92; 19,97	33,92; 18,30	0,318	40,17; 15,94	36,75; 15,86	0,604
Mín-Máx	9,00 - 74,00	9,00 - 67,00		6,00 - 65,00	6,00 - 58,00	

Média; Desvio Padrão (DP); Mín-Máx: Valores mínimo e máximo; **P* <0,05; T de *Student* Independente;

HTFs® - Fluido Tubário Humano suplementado com 15% de Soro Substituto Sintético;

CSCMs® - Meio de Cultura para uso Contínuo suplementado com 10% de Albumina Sérica Humana.

Na Tabela 7 estão descritas as médias, desvio padrão, valor mínimo e máximo dos parâmetros seminais dos grupos HTFs® vs. SRs® pré e pós-incubação.

A incubação de amostras astenozoospermicas nesses grupos, não mostraram serem eficazes nos parâmetros seminais, visto que não foi relatado diferença significativa nos grupos pré e pós-incubação ($P \geq 0,05$). Observamos apenas uma tendência não significativa de aumento de média na motilidade progressiva ($13,61 \pm 13,24$ vs. $23,83 \pm 18,17$; $P = 0,062$) no grupo pós incubação HTFs®.

Tabela 7. Média, desvio padrão, valor mínimo e máximo dos parâmetros seminais: concentração (milhões/ml), motilidade progressiva (%), motilidade não progressiva (%), espermatozoides imóveis (%), motilidade total (%), morfologia normal (segundo OMS, critério estrito de Kruger; %) e vitalidade espermática das amostras seminais astenozoospermicas classificadas como HTFs[®] vs. SRs[®] nos grupos pré e pós-incubação por um período de 2 horas (T2).

	HTFs [®]			SRs [®]		
	Pré-incubação (n=18)	Pós-incubação (n=18)	Valor de <i>P</i>	Pré-incubação (n=18)	Pós-incubação (n=18)	Valor de <i>P</i>
Concentração (milhões/mL)						
Média; DP	16,87; 11,41	16,51; 9,92	0,921	18,15; 11,73	14,29; 9,07	0,278
Mín-Máx	2,60 – 39,00	3,80 – 34,00		3,70 – 41,00	2,00 – 29,00	
Motilidade progressiva (MP; %)						
Média; DP	13,61; 13,24	23,83; 18,17	0,062	13,83; 12,91	17,89; 11,91	0,334
Mín-Máx	0,00 – 53,00	0,00 – 79,00		0,00 – 54,00	0,00 – 50,00	
Motilidade não progressiva (NP; %)						
Média; DP	21,72; 12,48	19,17; 13,86	0,565	21,89; 9,16	21,39; 12,66	0,893
Mín-Máx	2,00 – 45,00	4,00 – 60,00		10,00 – 43,00	7,00 – 50,00	
Imóvel (IM; %)						
Média; DP	60,33; 21,92	57,00; 17,71	0,619	64,28; 15,82	60,72; 14,13	0,482
Mín-Máx	9,00 – 96,00	15,00 – 89,00		31,00 – 86,00	33,00 – 81,00	
Motilidade total (MT; %)						
Média; DP	35,61; 18,33	43,00; 17,71	0,227	35,72; 15,82	38,33; 12,66	0,588
Mín-Máx	4,00 – 80,00	11,00 – 85,00		14,00 – 69,00	19,00 – 60,00	
Morfologia normal (OMS; %)						
Média; DP	3,50; 2,65	4,36; 3,00	0,431	3,14; 2,44	2,94; 2,32	0,816
Mín-Máx	0,00 – 8,00	1,00 – 12,00		0,00 – 7,00	0,00 – 9,00	
Morfologia normal (Kruger; %)						
Média; DP	1,07; 1,44	2,64; 3,65	0,459	1,00; 1,46	1,12; 1,25	0,797
Mín-Máx	0,00 – 4,00	0,00 – 7,00		0,00 – 4,00	0,00 – 4,00	
Vitalidade (%)						
Média; DP	43,67; 24,54	42,00; 16,09	0,926	28,33; 7,09	30,50; 10,61	0,828
Mín-Máx	20,00 – 69,00	25,00 – 57,00		22,00 – 36,00	23,00 – 38,00	

Média: Desvio Padrão (DP); Mín-Máx: Valores mínimo e máximo; **P* <0,05; T de *Student* Independente;

HTFs[®] - Fluido Tubário Humano suplementado com 15% de Soro Substituto Sintético;

SRs[®] - Meio de lavagem para o espermatozoide suplementado com frutose e carnitina.

O grupo G-IVFs[®] (apresentado na Tabela 8) mostrou ser eficaz para promover o aumento da motilidade progressiva espermática no grupo pós-incubação (*P*=0,023), quando comparado com o grupo HTFs[®].

Por outro lado, não observamos diferença significativa em nenhum parâmetro seminal no grupo pré e pós-incubação com HTFs[®] (*P*≥0,05).

Tabela 8. Média, desvio padrão, valor mínimo e máximo dos parâmetros seminais: concentração (milhões/ml), motilidade progressiva (%), motilidade não progressiva (%), espermatozoides imóveis (%), motilidade total (%), morfologia normal (segundo OMS, critério estrito de Kruger; %) e vitalidade espermática de amostras seminais astenozoospermicas classificadas como HTFs[®] vs. G-IVFs[®] pré e pós-incubação por um período de 2 horas (T2).

	HTFs [®]			G-IVFs [®]		
	Pré-incubação (n=18)	Pós-incubação (n=18)	Valor de <i>P</i>	Pré-incubação (n=18)	Pós-incubação (n=18)	Valor de <i>P</i>
Concentração (milhões/mL)						
Média; DP	17,55; 15,74	16,51; 9,92	0,909	18,83; 15,73	16,33; 11,76	0,593
Mín-Máx	5,00 – 65,00	4,00 – 47,00		6,00 – 55,00	5,00 – 39,00	
Motilidade progressiva (MP; %)						
Média; DP	13,83; 12,76	20,28; 14,70	0,169	12,05; 9,67	22,55; 15,93	0,023
Mín-Máx	0,00 – 39,00	0,00 – 50,00		0,00 – 32,00	3,00 – 50,00	
Motilidade não progressiva (NP; %)						
Média; DP	17,50; 12,05	19,83; 9,80	0,528	21,39; 10,90	17,94; 10,39	0,339
Mín-Máx	0,00 – 50,00	6,00 – 40,00		4,00 – 40,00	3,00 – 40,00	
Imóvel (IM; %)						
Média; DP	68,83; 18,82	60,33; 19,96	0,198	66,55; 17,07	59,50; 20,02	0,263
Mín-Máx	37,00 – 95,00	25,00 – 91,00		40,00 – 92,00	30,00 – 93,00	
Motilidade total (MT; %)						
Média; DP	31,17; 18,82	39,61; 20,05	0,201	33,44; 17,07	40,50; 20,02	0,263
Mín-Máx	5,00 – 63,00	9,00 – 75,00		8,00 – 60,00	7,00 – 70,00	
Morfologia normal (OMS; %)						
Média; DP	5,81; 3,22	4,19; 1,80	0,089	4,06; 2,38	4,50; 2,45	0,612
Mín-Máx	1,00 – 12,00	1,00 – 6,00		1,00 – 10,00	1,00 – 9,00	
Morfologia normal (Kruger; %)						
Média; DP	2,19; 1,38	1,50; 1,03	0,121	1,43; 0,96	1,81; 1,33	0,369
Mín-Máx	0,00 – 4,00	0,00 – 3,00		0,00 – 3,00	0,00 – 4,00	
Vitalidade (%)						
Média; DP	39,80; 18,69	35,62; 12,37	0,578	39,36; 15,88	45,28; 21,23	0,540
Mín-Máx	15,00 – 65,00	14,00 – 51,00		18,00 – 62,00	15,00 – 69,00	

Média: Desvio Padrão (DP); Mín-Máx: Valores mínimo e máximo; **P*<0,05; T de *Student* Independente;

HTFs[®] - Fluido Tubário Humano suplementado com 15% de Soro Substituto Sintético;

G-IVF[®] - Meio de Gametas para Fertilização *In Vitro* suplementado com 15% de Soro Substituto Sintético.

Os valores de média, desvio padrão, valor mínimo e máximo dos testes funcionais: atividade mitocondrial (DAB I, II, III e IV), fragmentação de DNA (SCSA[®] - DFI e HDS) e radicais livres de oxigênio (ROS) dos grupos classificados como HTFs[®] vs. CSCMs[®] (Tabela 9), HTFs[®] vs. SRs[®] (Tabela 10) e HTFs[®] vs. G-IVFs[®] (Tabela 11), estão contidos respectivamente abaixo. No entanto, não foi reportada diferença significativa em nenhum desses parâmetros (*P*≥0,005).

Tabela 9. Média, desvio padrão, valor mínimo e máximo dos testes funcionais: atividade mitocondrial (DAB I, II, III e IV), fragmentação de DNA (SCSA® - DFI e HDS), radicais livres de oxigênio (ROS) das amostras seminais astenozoospermicas classificadas como HTFs® vs. CSCMs® pré e pós-incubação por um período de 2 horas (T2).

	HTFs®			CSCMs®		
	Pré- Incubação (n=14)	Pós- Incubação (n=14)	Valor de <i>P</i>	Pré- Incubação (n=14)	Pós- Incubação (n=14)	Valor de <i>P</i>
DAB I (%)						
Média; DP	32,71; 12,21	31,86; 12,86	0,852	31,28; 11,07	32,14; 12,40	0,848
Mín-Máx	13,00 – 51,00	16,00 – 53,00		20,00 – 55,00	6,00 – 53,00	
DAB II (%)						
Média; DP	43,64; 12,33	43,36; 10,54	0,948	39,14; 9,35	37,71; 9,30	0,689
Mín-Máx	30,00 – 65,00	27,00 – 62,00		28,00 – 63,00	28,00 – 63,00	
DAB III (%)						
Média; DP	11,50; 3,32	13,00; 6,36	0,444	12,86; 5,02	13,28; 5,58	0,833
Mín-Máx	7,00 – 19,00	4,00 – 26,00		7,00 – 25,00	6,00 – 25,00	
DAB IV (%)						
Média; DP	12,14; 7,24	11,86; 5,98	0,910	16,78; 9,17	16,86; 7,90	0,983
Mín-Máx	4,00 – 28,00	4,00 – 25,00		6,00 – 29,00	5,00 – 36,00	
Fragmentação DNA (DFI; %)						
Média; DP	47,21; 28,03	49,47; 23,30	0,815	48,73; 26,53	56,73; 21,43	0,371
Mín-Máx	6,00 – 97,00	11,00 – 95,00		4,00 – 98,00	27,00 – 98,00	
Fragmentação DNA (HDS; %)						
Média; DP	6,28; 2,67	6,07; 3,28	0,846	5,47; 2,77	5,20; 2,43	0,781
Mín-Máx	2,00 – 11,00	1,00 – 12,00		1,00 – 9,00	2,00 – 9,00	
ROS (x10⁴ cpm/20⁶)						
Média; DP	22,80; 35,00	10,35; 13,84	0,425	22,75; 11,69	13,89; 11,39	0,176
Mín-Máx	0,28 - 98,63	0,95 – 39,72		4,60 - 38,39	3,47 - 35,59	

Média: Desvio Padrão (DP); Mín-Máx: Valores mínimo e máximo; N: número de amostras incluídas; **P*<0,05; T de *Student* Independente;
 HTFs® - Fluido Tubário Humano suplementado com 15% de Soro Substituto Sintético;
 CSCMs® - Meio de Cultura para uso Contínuo suplementado com 10% de Albumina Sérica Humana;
 DFI - Índice de fragmentação do DNA;
 HDS - Alta capacidade de coloração do DNA.

Em relação aos grupos HTFs® vs. SRs® (Tabela 10), observamos uma tendência a diminuição do parâmetro DAB classe IV no grupo pós-incubação HTFs® (*P*=0,05).

Tabela 10. Média, desvio padrão, valor mínimo e máximo dos testes funcionais: atividade mitocondrial (DAB I, II, III e IV), fragmentação de DNA (SCSA® - DFI e HDS) e radicais livres de oxigênio (ROS) das amostras seminais astenozoospermicas classificadas como HTFs® vs. SRs® pré e pós-incubação por um período de 2 horas (T2).

	HTFs®			SRs®		
	Pré- Incubação (n=14)	Pós- Incubação (n=14)	Valor de <i>P</i>	Pré- Incubação (n=14)	Pós- Incubação (n=14)	Valor de <i>P</i>
DAB I (%)						
Média; DP	16,43; 16,67	20,14; 15,85	0,551	14,91; 9,22	13,77; 7,82	0,750
Mín-Máx	5,00 – 71,00	4,00 – 67,00		6,00 – 40,00	4,00 – 27,00	
DAB II (%)						
Média; DP	47,50; 13,02	50,14; 10,31	0,557	48,83; 9,49	48,69; 11,74	0,974
Mín-Máx	16,00 – 71,00	27,00 – 65,00		34,00 – 69,00	31,00 – 64,00	
DAB III (%)						
Média; DP	14,00; 8,10	16,14; 8,86	0,510	17,33; 7,39	19,38; 6,87	0,481
Mín-Máx	3,00 – 30,00	4,00 – 33,00		8,00 – 29,00	2,00 – 27,00	
DAB IV (%)						
Média; DP	22,14; 13,13	13,50; 8,65	0,050	20,25; 9,66	18,92; 10,90	0,750
Mín-Máx	3,00 – 44,00	2,00 – 30,00		5,00 – 37,00	4,00 – 41,00	
Fragmentação DNA (DFI; %)						
Média; DP	59,54; 22,15	56,50; 21,43	0,668	59,00; 21,41	60,92; 21,68	0,826
Mín-Máx	21,00 – 92,00	8,00 – 83,00		14,00 – 86,00	16,00 – 93,00	
Fragmentação DNA (HDS; %)						
Média; DP	9,08; 5,68	8,42; 4,89	0,759	9,25; 4,96	8,31; 5,04	0,642
Mín-Máx	2,00 – 21,00	2,00 – 18,00		2,00 – 18,00	2,00 – 19,00	
ROS (x10⁴ cpm/20⁶)						
Média; DP	18,02; 25,70	56,13; 86,12	0,139	23,63; 29,81	49,70; 82,17	0,299
Mín-Máx	0,34 - 74,31	0,71 – 248,77		0,65 - 92,90	0,22 - 267,80	

Média: Desvio Padrão (DP); Mín-Máx: Valores mínimo e máximo; N: número de amostras incluídas; **P* < 0,05; T de *Student* Independente;

HTFs® - Fluido Tubário Humano suplementado com 15% de Soro Substituto Sintético;

SRs® - Meio de lavagem para o espermatozoide suplementado com frutose e carnitina;

DFI - Índice de fragmentação do DNA;

HDS - Alta capacidade de coloração do DNA.

Não observamos diferença significativa nos testes funcionais (DAB, SCSA® e ROS) dos grupos classificados como HTFs® vs. G-IVFs® (*P* ≥ 0,005; Tabela 11).

Tabela 11. Média, desvio padrão, valor mínimo e máximo dos testes funcionais: atividade mitocondrial (DAB I, II, III e IV), fragmentação de DNA (SCSA® - DFI e HDS) e radicais livres de oxigênio (ROS) das amostras seminais astenozoospermicas classificadas como HTFs® vs. G-IVFs® pré e pós-incubação por um período de 2 horas (T2).

	HTFs®			G-IVFs®		
	Pré- Incubação (n=14)	Pós- Incubação (n=14)	Valor de P	Pré- Incubação (n=14)	Pós- Incubação (n=14)	Valor de P
DAB I (%)						
Média; DP	23,77; 8,96	22,28; 14,22	0,747	19,33; 14,82	20,67; 16,08	0,815
Mín-Máx	14,00 – 47,00	4,00 – 50,00		4,00 – 52,00	4,00 – 58,00	
DAB II (%)						
Média; DP	52,61; 8,77	48,28; 13,49	0,330	49,33; 13,29	46,33; 9,09	0,477
Mín-Máx	34,00 – 71,00	23,00 – 75,00		28,00 – 74,00	27,00 – 64,00	
DAB III (%)						
Média; DP	13,77; 7,22	16,86; 10,07	0,369	18,27; 9,52	21,87; 11,61	0,361
Mín-Máx	3,00 – 28,00	3,00 – 40,00		1,00 – 33,00	5,00 – 39,00	
DAB IV (%)						
Média; DP	9,92; 5,76	11,86; 8,55	0,495	13,00; 12,70	11,07; 7,95	0,622
Mín-Máx	3,00 – 24,00	2,00 – 50,00		2,00 – 53,00	3,00 – 36,00	
Fragmentação DNA (DFI; %)						
Média; DP	24,92; 16,04	34,85; 17,21	0,141	24,08; 16,15	36,00; 18,77	0,096
Mín-Máx	6,00 – 65,00	15,00 – 78,00		2,00 – 61,00	11,00 – 74,00	
Fragmentação DNA (HDS; %)						
Média; DP	9,31; 5,12	7,38; 3,66	0,283	8,15; 3,31	7,15; 3,69	0,475
Mín-Máx	2,00 – 20,00	4,00 – 16,00		5,00 – 16,00	3,00 – 15,00	
ROS (x10⁴ cpm/20⁶)						
Média; DP	12,43; 16,45	10,97; 10,45	0,822	13,81; 13,57	16,13; 16,92	0,722
Mín-Máx	2,71 - 48,15	2,26 – 35,62		1,25 - 44,28	2,18 - 60,51	

Média: Desvio Padrão (DP); Mín-Máx: Valores mínimo e máximo; N: número de amostras incluídas; *P<0,05; T de Student Independente;

HTFs® - Fluido Tubário Humano suplementado com 15% de Soro Substituto Sintético;

G-IVF® - Meio de Gametas para Fertilização *In Vitro* suplementado com 15% de Soro Substituto Sintético;

DFI - Índice de fragmentação do DNA;

HDS - Alta capacidade de coloração do DNA.

Em relação à análise seminal computadorizada (SCA®) classificada pelos grupos HTFs® vs. CSCMs® (Tabela 12) e HTFs® vs. SRs® pré e pós-incubação (Tabela 12), não foi possível observar diferenças significativas nos parâmetros: velocidade curvilínea (VCL), velocidade retilínea (VSL), valor médio do percurso (VAP), índice de linearidade (LIN), índice de retidão (STR), índice de oscilação (WOB) e hiperatividade ($P \geq 0,05$).

Tabela 12. Média, desvio padrão, valor mínimo e máximo das características cinéticas da análise seminal computadorizada (SCA[®]): velocidade de curvatura (VCL), velocidade retilínea (VSL), valor médio do percurso (VAP), índice de linearidade (LIN), índice de retidão (STR), índice de oscilação (WOB) e hiperatividade (%) de amostras seminais astenozoospermicas classificadas como HTFs[®] vs. CSCMs[®] pré e pós-incubação por um período de 2 horas (T2).

	HTFs [®]			CSCMs [®]		
	Pré-incubação (n=18)	Pós-incubação (n=18)	Valor de <i>P</i>	Pré-incubação (n=18)	Pós-incubação (n=18)	Valor de <i>P</i>
Velocidade curvilínea (VCL; µm/s)						
Média; DP	39,92; 17,54	45,73; 16,19	0,350	39,88; 16,81	45,16; 18,84	0,382
Mín-Máx	22,79 – 80,16	21,54 – 80,29		21,22 – 70,99	17,57 – 92,47	
Velocidade retilínea (VSL; µm/s)						
Média; DP	13,68; 9,69	13,49; 5,69	0,313	12,16; 8,55	13,02; 6,39	0,734
Mín-Máx	4,42 – 37,28	4,29 – 23,21		2,87 – 33,61	4,35 – 28,68	
Valor médio do Percurso (VAP; µm/s)						
Média; DP	20,44; 11,02	21,93; 8,07	0,645	19,75; 10,32	22,10; 9,22	0,476
Mín-Máx	9,52 – 47,09	8,75 – 37,44		7,48 – 41,62	8,55 – 41,35	
Índice de linearidade (LIN; %)						
Média; DP	31,78; 11,63	29,25; 7,88	0,451	27,86; 10,89	28,61; 7,48	0,810
Mín-Máx	18,37 – 55,20	19,42 – 46,08		13,51 – 52,35	15,44 – 47,29	
Índice de retidão (STR; %)						
Média; DP	62,37; 14,25	60,58; 11,04	0,676	56,42; 12,91	57,68; 10,69	0,751
Mín-Máx	40,39 – 83,04	44,81 – 82,81		38,33 – 80,74	34,51 – 78,69	
Índice de oscilação (WOB; %)						
Média; DP	49,70; 7,97	47,76; 5,64	0,405	47,75; 8,05	48,87; 4,14	0,607
Mín-Máx	34,52 – 66,48	34,70 – 60,09		35,24 – 64,84	43,06 – 60,09	
Hiperatividade (%)						
Média; DP	5,80; 6,56	4,77; 4,82	0,672	5,37; 8,45	4,58; 5,06	0,734
Mín-Máx	0,00 – 18,59	0,00 – 15,79		0,00 – 35,0	0,00 – 21,99	

Média: Desvio Padrão (DP); Mín-Máx: Valores mínimo e máximo; **P*<0,05; T de *Student* Independente;

HTFs[®] - Fluido Tubário Humano suplementado com 15% de Soro Substituto Sintético;

CSCMs[®] - Meio de Cultura para uso Contínuo suplementado com 10% de Albumina Sérica Humana.

Tabela 13. Média, desvio padrão, valor mínimo e máximo das características cinéticas da análise seminal computadorizada (SCA[®]): velocidade de curvatura (VCL), velocidade retilínea (VSL), valor médio do percurso (VAP), índice de linearidade (LIN), índice de retidão (STR), índice de oscilação (WOB) e hiperatividade (%) de amostras seminais astenozoospermicas classificadas como HTFs[®] vs. SRs[®] pré e pós-incubação por um período de 2 horas (T2).

	HTFs [®]			SRs [®]		
	Pré-incubação (n=18)	Pós-incubação (n=18)	Valor de <i>P</i>	Pré-incubação (n=18)	Pós-incubação (n=18)	Valor de <i>P</i>
Velocidade curvilínea (VCL; µm/s)						
Média; DP	46,36; 15,85	50,71; 5,40	0,577	38,21; 28,23	45,26; 14,47	0,632
Mín-Máx	30,92 - 67,72	43,02 - 57,65		0,00 - 68,41	28,58 - 60,41	
Velocidade retilínea (VSL; µm/s)						
Média; DP	18,07; 11,58	17,46; 5,99	0,919	10,97; 7,78	15,05; 7,10	0,412
Mín-Máx	8,49 - 34,10	11,33 - 27		0,00 - 19,68	10,19 - 27,49	
Valor médio do Percurso (VAP; µm/s)						
Média; DP	24,86; 11,80	25,75; 4,97	0,880	18,85; 13,55	23,31; 7,72	0,544
Mín-Máx	13,52 - 39,22	20,42 - 32,97		0,00 - 32,23	16,14 - 34,93	
Índice de linearidade (LIN; %)						
Média; DP	34,46; 13,79	33,88; 8,70	0,732	23,69; 14,83	33,99; 11,68	0,259
Mín-Máx	26,65 - 59,39	22,90 - 45,93		0,00 - 40,04	22,80 - 47,01	
Índice de retidão (STR; %)						
Média; DP	68,57; 12,32	66,30; 10,83	0,765	47,00; 27,60	63,83; 14,00	0,267
Mín-Máx	55,92 - 86,96	52,00 - 80,31		0,00 - 70,90	49,15 - 78,70	
Índice de oscilação (WOB; %)						
Média; DP	51,91; 9,70	50,51; 5,34	0,784	39,89; 22,65	52,08; 7,64	0,307
Mín-Máx	43,73 - 68,30	44,04 - 57,19		0,00 - 56,47	44,56 - 62,30	
Hiperatividade (%)						
Média; DP	7,66; 7,28	6,40; 7,27	0,791	5,53; 4,18	6,30; 10,19	0,880
Mín-Máx	1,02 - 20,17	2,04 - 19,16		0,00 - 9,36	0,00 - 24,45	

Média: Desvio Padrão (DP); Mín-Máx: Valores mínimo e máximo; **P*<0,05; T de *Student* Independente;

HTFs[®] - Fluido Tubário Humano suplementado com 15% de Soro Substituto Sintético;

SRs[®] - Meio de lavagem para o espermatozoide suplementado com frutose e carnitina.

Nossos resultados demonstrados no protocolo II não foram lineares, visto que não havia volume seminal suficiente de cada amostra para realização da incubação com todos os meios de cultura e testes funcionais incluídos no estudo.

5.3. Seleção do meio de cultura ideal para o espermatozoide

Através dos resultados obtidos com a incubação no protocolo II contendo meios de cultura comerciais distintos e independentes (HTF[®], CSCM[®], SR[®] e G-IVF[®]), foi possível selecionar os meios que obtiveram resultados positivos nos parâmetros seminais através da análise das médias. Assim, determinamos dois meios de cultura ideais para o espermatozoide dentre os 4 testados inicialmente no presente estudo, e em seguida elegemos o meio de cultura que apresentou melhores resultados em relação aos parâmetros seminais (Tabela 14).

Tabela 14. Média, desvio padrão, valor mínimo e máximo dos parâmetros seminais: concentração (milhões/ml), motilidade progressiva (%), motilidade não progressiva (%), espermatozoides imóveis (%), motilidade total (%), morfologia normal (OMS e Kruger; %) das amostras seminais astenozoospermicas classificadas como CSCMs[®] vs. G-IVFs[®] pré e pós-incubação durante um período de 2 horas (T2).

	CSCMs [®]			G-IVFs [®]		
	Pré-incubação (n=18)	Pós-incubação (n=18)	Valor de <i>P</i>	Pré-incubação (n=18)	Pós-incubação (n=18)	Valor de <i>P</i>
Concentração (milhões/mL)						
Média; DP	19,54; 20,09	16,92; 9,81	0,623	18,83; 15,73	16,33; 11,76	0,593
Mín-Máx	1,80 – 91,00	2,30 – 32,00		6,00 – 55,00	5,00 – 39,00	
Motilidade progressiva (MP; %)						
Média; DP	8,33; 6,82	24,55; 13,97	<0,001	12,05; 9,67	22,55; 15,93	0,023
Mín-Máx	0,00 – 21,00	3,00 – 51,00		0,00 – 32,00	3,00 – 50,00	
Motilidade não progressiva (NP; %)						
Média; DP	18,28; 14,65	16,61; 9,94	0,693	21,39; 10,90	17,94; 10,39	0,339
Mín-Máx	0,00 – 47,00	4,00 – 36,00		4,00 – 40,00	3,00 – 40,00	
Imóvel (IM; %)						
Média; DP	69,94; 18,09	58,83; 19,06	0,089	66,55; 17,07	59,50; 20,02	0,263
Mín-Máx	37,00 – 93,00	18,00 – 91,00		40,00 – 92,00	30,00 – 93,00	
Motilidade total (MT; %)						
Média; DP	26,61; 18,10	41,17; 19,06	0,025	33,44; 17,07	40,50; 20,02	0,263
Mín-Máx	2,00 – 56,00	9,00 – 82,00		8,00 – 60,00	7,00 – 70,00	

Média: Desvio Padrão (DP); Mín-Máx: Valores mínimo e máximo; **P*<0,05; T de *Student* Independente;

CSCMs[®] - Meio de Cultura para uso Contínuo suplementado com 10% de Albumina Sérica Humana;

G-IVF[®] - Meio de Gametas para Fertilização *In Vitro* suplementado com 15% de Soro Substituto Sintético.

Em suma, selecionamos o meio CSCM[®] suplementado com HSA[®] para ser utilizado na rotina andrológica e em procedimentos de RHA os quais empregam a manipulação dos espermatozoides, visto que observamos melhora significativa na motilidade progressiva (*P*<0,001) e motilidade total (*P*=0,025) no grupo pós-incubação.

VI. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

A incubação *in vitro* de espermatozoides a 37°C em 5% de CO₂ tem sido recomendada e praticada nos laboratórios em ART's (WHO, 2010; Yavas & Selub, 2004; Ahmed *et al.*, 2018; Calamera *et al.*, 2001; Cicaré, 2014; Hosseini & Khalili, 2017; Thijssen *et al.*, 2014), principalmente em casos de astenozoospermia (MP<32%), como uma alternativa de melhorar a motilidade e a seleção de espermatozoides viáveis, mesmo sem um consenso na literatura sobre o período ideal para a incubação sem prejuízo na qualidade espermática (ver anexo IV) (Cicaré *et al.*, 2015; Calamera *et al.*, 2000; Ahmed *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2011; Hosseini & Khalili, 2017; Thijssen *et al.*, 2014; Nabi *et al.*, 2014; Pasha *et al.*, 2012). Desta forma, propomos tempos curtos de incubação espermática e utilizamos diferentes meios de cultura comercialmente disponíveis, com o objetivo de padronizar esta técnica e otimizar a seleção dos espermatozoides utilizados na reprodução *in vitro*.

Nossos resultados demonstraram aumento significativo da motilidade dos espermatozoides quando incubados durante 2 horas a 37°C em ambiente 5% de CO₂, sem processamento e adição de meio de cultura (protocolo I). Em complemento, a utilização do meio de cultura CSCM[®] suplementado com HSA[®] demonstrou-se adequado para a incubação de espermatozoides, pois foi capaz de melhorar significativamente os parâmetros de motilidade (MT e MP) sem prejudicar as funções fisiológicas, como atividade mitocondrial, integridade do DNA, hiperatividade, viabilidade espermática e radicais livres de oxigênio (protocolo II). Em menor grau, a incubação de amostras astenozoospermicas em meio G-IVF[®] suplementado com frutose e SSS[®] também aumentaram a porcentagem de espermatozoides móveis progressivos, mas isso não foi acompanhado por uma melhora significativa na motilidade total.

No entanto, nenhum dos meios de cultura testados apresentaram melhora significativa nos demais parâmetros seminais, apesar de adicionarmos pelo menos um suplemento em cada meio como forma de fornecer energia (frutose) e proteger as mitocôndrias (carnitina) a fim de preservar a motilidade espermática (Garolla A, 2005).

A hipótese do presente estudo é de que as amostras astenozoospermicas podem ser mantidas na incubadora (na presença de 5% de CO₂), em um intervalo de tempo específico com meio de cultura enriquecido, a fim de melhorar a motilidade dos espermatozoides, pois durante a incubação eles passam por uma fase descrita como

“teoria de ativação”, a qual funciona como um gatilho para os espermatozoides adquirirem motilidade e serem capazes de fertilizar o oócito (Gallup GG, 2009).

Na teoria da ativação, é descrito que, após sua produção no testículo, os espermatozoides ainda não estão preparados para fertilizar o oócito, por isso, são armazenados em sua forma inativa no epidídimo. A primeira etapa de ativação é iniciada como consequência da exposição a secreções glandulares produzidas por vesículas seminais, próstata e glândulas bulbouretrais durante a ejaculação (Okamura *et al.*, 1985). Após o depósito dos espermatozoides no trato feminino, um gatilho específico é ativado pela elevação da temperatura do sêmen para temperatura corporal para que ele possa alcançar a tuba uterina e fertilizar o óvulo (Gallup GG, 2009), esse aumento na temperatura é suficiente para produzir ativação de espermatozoides, tanto em condições *in vivo* como *in vitro*, ou seja, em laboratório especializado (Marin-Briggiler *et al.*, 2002). Segundo Birks *et al.*, o aumento da temperatura ambiente para a temperatura corporal (37°C) produz um aumento temporário na motilidade dos espermatozoides humanos, podendo desencadear em hiperatividade (Si Y, 1999). A hiperatividade é o mecanismo pelo qual o espermatozoide é capaz de desprender-se do muco presente no canal vaginal e se impulsionar em direção ao óvulo (Suarez & Ho, 2003). Em resumo, há 3 fases de ativação: (I) ativação glandular durante ejaculação, (II) ativação induzida por temperatura após liberação do sêmen na vagina (capacitação) e (III) hiperatividade, que ocorre após o espermatozoide atingir o canal vaginal. Somente espermatozoides capacitados e com acrossoma intacto são capazes de se ligar à zona pelúcida (ZP), sofrerem reação acrossômica e penetrarem na ZP a fim de alcançarem a fertilização (Gallup GG, 2009). Entretanto, em casos de alteração espermática ou tratamentos de RHA como emprego de técnicas de FIV ou ICSI as quais incluem o manuseio de gametas, é possível induzir a ativação espermática *in vitro* a partir do uso de uma incubadora em temperatura adequada e a utilização de meios de cultura enriquecidos, os quais mimetizam o ambiente uterino.

Os meios de cultura e suplementos têm desempenhado um papel significativo na melhora dos resultados dos procedimentos de ART's ao longo da última década (Quinn, 2004). Inicialmente, os meios utilizados para cultura de gametas e embriões eram os mesmos utilizados para células somáticas (Biggers, 1987; Meintjes *et al.*, 2009; Pool, 2004) os quais eram compostos de poucos componentes, sendo em sua maioria soluções simples (Lane & Gardner, 2007). Atualmente, a maioria dos meios de cultura comerciais utilizados nas técnicas de reprodução humana assistida contém albumina ou são recomendados para serem suplementados com esta macromolécula, proporcionando uma

melhora nos meios de cultura modernos e eliminando a necessidade de suplementação com proteínas mais complexas (Lane, 2003). O uso de albumina foi proposto por Bungum como o único suplemento proteico, a grande vantagem desta proteína é a sua disponibilidade comercial, que pode ser a albumina sérica humana (HSA[®]) ou bovina (Bungum *et al.*, 2002). A albumina de origem animal, atualmente é considerada um risco por ser uma causa provável de introdução de vírus de animais na célula, podendo sensibilizar as células a proteínas estranhas (Ashwood-Smith *et al.*, 1989). A HSA[®] é amplamente aceita como proteína aditiva de melhor definição para meios de cultura disponíveis no mercado, mesmo assim, a variação de lote-a-lote é ainda uma questão a ser resolvida devido a sua variabilidade inerente no sangue do doador e das técnicas de processamento utilizadas por diferentes fabricantes. Algumas considerações inerentes à albumina humana revelam que ela é a proteína mais abundante no trato genital feminino, considerada uma macromolécula com a propriedade de impedir que gametas e embriões se tornem pegajosos, facilitando sua manipulação e impedindo sua aderência no recipiente em que são manipulados (Leese *et al.*, 1998), podendo anular os efeitos de toxinas (Parinaud *et al.*, 1998; Palasz *et al.*, 2006). Existem evidências de que a albumina atua como um potente inibidor da peroxidação lipídica através da ligação dos ácidos graxos que podem ser prejudiciais para as membranas espermáticas (Matson & Tardif, 2012). Os aminoácidos desempenham muitos papéis importantes nos meios de cultura, incluindo agentes quelantes, osmóticos, antioxidantes, reguladores do metabolismo energético, precursores biossintéticos, substratos de energia e ajudam a proteger os espermatozoides contra os danos estruturais durante o estresse térmico (Gardner & Lane, 1997). Como exemplo, a L-glutamina é o aminoácido livre mais abundante no plasma seminal e nos espermatozoides, o qual pode funcionar como antioxidante no sêmen através da síntese de glutathione (Molina, 1995; Gadea *et al.*, 2004). Estudos demonstraram que esses aminoácidos mantiveram o percentual de motilidade elevado por um período maior de tempo, assim, é provável que sua adição nos meios de cultura favoreçam os espermatozoides, melhorando a sua capacidade de deslocamento no trato reprodutivo feminino até a fecundação do oócito, já que, esse aminoácido desempenha um papel regulador em vários processos celulares específicos, incluindo metabolismo, integridade celular, síntese e degradação de proteínas, potencial redox e expressão gênica (Renard *et al.*, 1996; Sangeeta *et al.*, 2015). Por outro lado, uma das consequências dos aminoácidos nos meios de cultura, particularmente a glutamina, é que eles espontaneamente quebram a 37°C e produzem amônio (Gardner & Lane, 1993; Gardner, 2008), portanto, o tempo

para incubação de meios que contém aminoácidos é limitado a 2-3 dias (Lane & Gardner, 2003). Outro suplemento bastante utilizado nos meios de cultura como suplemento para o espermatozoide é a carnitina, um antioxidante de importante manutenção para o espermatozoide, refletindo em aumento da motilidade espermática principalmente em amostras astenozoopérmicas (Garolla A, 2005).

Os resultados apresentados neste estudo demonstraram melhora na motilidade espermática durante 2 horas de incubação, sugerindo que após 4 horas de cultura há depleção de substratos fundamentais para produção de energia, já que o espermatozoide *in vitro* permanece em estado constante de ativação, consumindo energia e trifosfato de adenosina (ATP), à medida que, com o passar das horas, suas reservas metabólicas se esgotam (Gallup, 2009). Ou ainda, a prolongada exposição dos componentes do líquido seminal resulta em diminuição da motilidade e viabilidade dos espermatozoides devido a constante geração de ROS provenientes do próprio metabolismo espermático e esgotamento dos antioxidantes presentes no plasma seminal (Sposito *et al.*, 2017). Outros mecanismos fisiológicos sustentam nossos resultados, como o declínio da motilidade, viabilidade dos espermatozoides e aumento da fragmentação do DNA a partir de 3 horas de incubação, com redução de 5-10% da motilidade a cada hora após incubação (Petrella *et al.*, 2003; Petrella *et al.*, 2005; Hossain *et al.*, 2010; Matsuura *et al.*, 2010). Um estudo realizado com 256 casais submetidos ao tratamento de ICSI demonstrou que 3 horas de incubação resultou em elevadas taxas de fertilização quando comparados às demais horas propostas (1 hora e 5 horas) (Mansour *et al.*, 2008). Além disso, Calamera e colaboradores relataram pico de motilidade em amostras seminais à fresco incubadas com Ham's F10 + 3,5% HSA® durante 5 horas a 37°C em 5% CO₂, sem alteração na fragmentação de DNA, viabilidade e reação acrossômica, entretanto após 6 horas de incubação, observaram diminuição da motilidade, principalmente do batimento flagelar e velocidade de retidão (Calamera *et al.*, 2001). Adicionalmente, Matson e colaboradores determinaram 2 horas de incubação como período ideal para se obter ótimos resultados de motilidade total espermática em meios de cultura suplementados com macromoléculas, incluindo a albumina (Matson & Tardif, 2012). Portanto, esse estudo condiz com nossos achados, uma vez que o meio de cultura CSCM® suplementado com HSA®, foi benéfico ao espermatozoide, visto que manteve sua funcionalidade e qualidade dos parâmetros seminais, além de melhorar a motilidade progressiva e ação protetora contra a oxidação durante as 2 horas de incubação, visto que não observamos aumento na produção de ROS após incubação. Assim, apesar de similares concentrações e componentes (sal, íons,

tampão e substrato de energia) presentes nos meios de cultura testados (HTF[®], CSCM[®], SR[®] e G-IVF[®]), observamos que o CSCM[®] apresentou resultados favoráveis para incubação de amostras astenozoospermicas, pois é o único meio que contém uma gama completa de aminoácidos distintos (entre eles, a glutamina) e apresenta antioxidantes sintéticos de ação ampla (EDTA e citrato de sódio) quando comparado com os demais meios de cultura testados (G-IVF[®] contém alguns aminoácidos e 1 antioxidante, SR[®] contém 1 antioxidante e é desprovido de qualquer aminoácido, assim como o HTF[®]).

Além disso, o meio CSCM[®] (40 mL) apresenta melhor custo-benefício, pois possui validade de 3 meses e opção de já vir suplementado com HSA[®] (R\$983,09, valores atualizados Spectrum 09/04/2020) ou sem suplementação (R\$752,84, valores atualizados Spectrum 09/04/2020). Já o meio HTF[®] comum de 100 mL tem validade mensal e custa R\$ 635,64 (valores atualizados Spectrum 09/04/2020), o meio SR[®] de 30 mL R\$639,00 (valores atualizados Vitrolife, 09/04/2020) e o meio G-IVF[®] de 60 mL R\$1.401,00 (valores atualizados Vitrolife, 09/04/2020).

Nesse contexto, com a substituição do meio de cultura HTF[®] para o CSCM[®], melhores taxas de sucesso e custo benefício poderão ser alcançadas, visto que a escolha da técnica depende basicamente do número e da qualidade dos espermatozoides. Com isso, um direcionamento diferente na conduta laboratorial durante o tratamento de reprodução assistida poderia ser adotado, pois o indivíduo que antes seria conduzido a ICSI devido à baixa concentração de espermatozoides progressivos, poderia ser encaminhado para FIV ou uma possível IIU, já que a motilidade é um parâmetro correlacionado com altas taxas de gravidez (Shulman *et al.*, 1998). Em um método relativamente simples, procuramos preparar o espermatozoide a fim de minimizar mecanismos de estresse e efeitos deletérios em sua função através da padronização do período de incubação e determinação de meio de cultura favorável para os espermatozoides, método este que pode ser implementado em todos os laboratórios de Andrologia, visto que, atualmente os laboratórios de RH utilizam prolongados períodos de incubação espermática, o que já foi demonstrado em estudos anteriores afetar a qualidade dos parâmetros seminais e testes funcionais, com aumento na fragmentação do DNA e na produção de ROS (Calamera *et al.*, 2001; Agarwal & Said, 2003).

VII. CONCLUSÕES

Com o presente estudo, demonstramos que:

- Amostras seminais astenozoospermicas incubadas durante 2 horas em ambiente anaeróbico (5% de CO₂) apresentaram melhora na motilidade dos espermatozoides quando comparadas a outros períodos de incubação (T1, T3 e T4);
- A utilização do meio de cultura CSCM[®] suplementado com HSA[®] mostrou-se benéfica, visto que, estimulou a porcentagem da motilidade progressiva e total dos espermatozoides em amostras seminais astenozoospermicas;
- Amostras incubadas com meio de cultura G-IVF[®] suplementado com frutose e SSS[®] aumentaram a porcentagem da motilidade progressiva dos espermatozoides;
- Os meios de cultura HTF[®], CSCM[®], SR[®] e G-IVF[®], não apresentaram efeitos negativos na integridade do DNA espermático, hiperatividade, atividade mitocondrial, viabilidade espermática e níveis de ROS;
- Amostras seminais astenozoospermicas encaminhadas para ART's, podem ser incubadas com o meio CSCM[®]+HSA[®], visto que, após incubação observamos melhora na motilidade dos espermatozoides, podendo indicar mudança de conduta na complexidade dos procedimentos de RHA, bem como no custo para os casais e até mesmo para os laboratórios, pois trata-se de uma técnica econômica e facilmente replicável, ferramenta útil e disponível para a maioria dos laboratórios de andrologia.

VIII. Limitação do estudo

No início do estudo propusemos a realização dos testes funcionais dos espermatozoides em todas as amostras seminais incluídas no protocolo II, entretanto, não foi possível a realização da análise da hiperatividade espermática assistida por computador no grupo G-IVFs[®] pois o software SCA[®] apresentou defeito e não conseguimos reparo.

IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta AA. Male factor in assisted reproduction. *Infertility Reprod Med Clinic*. 1992;3:487–503.
- Agarwal A, Mulgund A, Hamada A, Chyatte MR. A unique view on male infertility around the globe. *Reprod Biol Endocrinol*. 2015;26:13:37.
- Agarwal A. Human spermatozoa: 37°C is optimum temperature for collection, transportation, and processing. *Fertil Wkly*. 2003;20:8–9.
- Agarwal A & Said TM. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Human Reproduction Update*. 2003;9(4):331–345.
- Ahmed I, Abdelateef S, Laqqan M, Amor H, Abdel-Lah MA, Hammadeh ME. Influence of extended incubation time on human sperm chromatin condensation, sperm DNA strand breaks and their effect on fertilisation rate. *Andrologia*. 2018;12960.
- Aitken RJ, Buckingham DW, West KM. Reactive oxygen species and human spermatozoa: analysis of the cellular mechanisms involved in luminol- and lucigenin-dependent chemiluminescence. *J Cell Physiol*. 1992;151(3): 466–77.
- Aitken RJ, & Clarkson JS. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *J Androl*, 1988;9:367–376.
- Amaral A, Paiva C, Parrinello CA, Estanyol JM, Ballescà JL, Santos JR, Oliva R. Identification of proteins involved in human sperm motility using high-throughput differential proteomics. *J Proteome Res*. 2014,13(12),5670–5684.
- American Society Reproductive Medicine (ASRM). Effectiveness and treatment for unexplained infertility. *Fertil Steril*. 2006;86(4):111–114.
- Ashwood-Smith MJ, Hollands P, Edwards RG. The use of Albuminar (TM) as a medium supplement in clinical IVF. *Hum Reprod* 1989; 4:702–705.
- Athayde KS, Cocuzza M, Agarwal A, Krajcir N, Lucon AM, Srougi M, Hallak J. Development of normal reference values for seminal reactive oxygen species and their correlation with leukocytes and semen parameters in a fertile population. *J Androl*. 2007;28(4):613–20.
- Biggers JD, McGinnis LK, Lawitts JA. One-step versus two-step culture of mouse preimplantation embryos: is there a difference? *Hum Reprod*. 2005;20:3376–84.
- Biggers JD. Pioneering mammalian embryo culture. In: BD Bavister (ed). *The Mammalian Preimplantation Embryo*. New York: Plenum Press. 1987:1–22.
- Birks AG, Izzard H, Morroll DR, Prior JR, Troup SA, Lieberman BA, Matson PL. The routine assessment of sperm mobility at room temperature and 37 degrees C. *Int J Androl*, 1994;17,289–291.

- Boomsma CM, Heineman MJ, Cohlen BJ, Farquhar C. Semen preparation techniques for intrauterine insemination. *Cochrane Database Syst Rev*. 2007 ;17;(4):CD004507.
- Bungum M, Humaidan P, Bungum L. Recombinant human albumin as protein source in culture media used for IVF: a prospective randomized study. *Reprod Biomed Online*. 2002;4(3):233-6.
- Burkman LJ. Discrimination between nonhyperactivated and classical hyperactivated motility patterns in human spermatozoa using computerized analysis. *Fertil Steril*. 1991;55:363-371.
- Blake D, Svalander P, Jin M, Silversand C, Hamberger L. Protein supplementation of human IVF culture media. *J Assist Reprod Genet*. 2002;19(3):137-43.
- Calamera JC, Fernandez PJ, Buffone MG, Acosta AA, Doncel GF. Effects of long-term *in vitro* incubation of human spermatozoa: functional parameters and catalase effect. *Andrologia*. 2001;33:79-86.
- Cicaré J, Caille A, Zumoffen C, Ghersevich S, Bahamondes L, Munuce M J. *In vitro* incubation of human spermatozoa promotes reactive oxygen species generation and DNA fragmentation. *Andrologia*. 2014;47:861-866.
- Davis RO & Katz DF. Standardization and comparability of CASA instruments. *J Androl*. 1992;13:81-86.
- Donnelly ET, McClure N, Lewis SE. Glutathione and hypotaurine *in vitro*: effects on human sperm motility, DNA integrity and production of reactive oxygen species. *Mutagenesis*. 2000;15:61-8.
- Duru NK, Morshedi M, Schuffner A, Oehninger S. Semen treatment with progesterone and/or acetyl-carnitine does not improve sperm motility or membrane damage after cryopreservation-thawing. *Fertil Steril*. 2000;74:715-20.
- Edwards RG, Steptoe PC, Purdy JM. Establishing full-term human pregnancies using cleaving embryos grown *in vitro*. *Br J Obstet Gynaecol*, 1980;87(9):737-756
- Eisenbach M. Mammalian sperm chemotaxis and its association with capacitation. *Develop Genetic*. 1999;25:87-94.
- Evenson DP, Larson KL, Jost LK. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl*. 2002;23:25-43.
- Evenson DP. The Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®) and other sperm DNA fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear DNA integrity as related to fertility. *Anim Reprod Sci*. 2016;169:56-75.
- Ford WCL. Glycolysis and sperm motility: does a spoonful of sugar help the flagellum go around? *Hum Reprod Update*. 2006;12:269-74.

- Franken DR, Van Wyk R, Stoumann C, Avari K. Temperature controlled centrifugation improves sperm retrieval. *Andrologia*. 2011;43:217-221.
- Gadea J, Selles E, Marco MA, Coy P, Matas C, Romar R, Ruiz S. Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation. Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Theriogenology*. 2004;62:690-701.
- Gallup GG. On the Origin of Descended Scrotal Testicles: The Activation Hypothesis. *Evolutionary Psychology*. 2009;7(4):517-526.
- Gardner DK & Lane M. Amino acids and ammonium regulate mouse embryo development in culture. *Biol Reprod*. 1993;48:377-385.
- Gardner DK & Lane B. Culture and selection of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF? *Hum Reprod Update*. 1997;3:367-382.
- Gardner DK. Dissection of culture media for embryos: the most important and less important components and characteristics. *Reprod Fertil Dev*. 2008;20(1), 9-18.
- Garolla A, Maiorino M, Roverato A, Roveri A, Ursini F, Foresta C. Oral carnitine supplementation increases sperm motility in asthenozoospermic men with normal sperm phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase levels. *Fertil Steril*. 2005;83(2):355-61.
- Gosalvez J, Nunez R, Fernandez JL, Lopez-Fernandez C, Caballero P. Dynamics of sperm DNA damage in fresh versus frozen-thawed and gradient processed ejaculates in human donors. *Andrologia*. 2011;43:373-377.
- Hallak J. A call for more responsible use of Assisted Reproductive Technologies (ART's) in male infertility: the hidden consequences of abuse, lack of andrological investigation and inaction. *Transl Androl Urol*. 2017;6(5):997-1004.
- Hallak J, Veras MM, Saldiva PHN. How Environmental and Air Pollution Disrupt Spermatogenesis and Male Reproductive Health: A Mechanistic Approach. In *Bioenvironmental Issues Affecting Men's Reproductive and Sexual Health*. 2018 (pp. 5-32).
- Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. 2nd Ed. Oxford: Clarendon Press; 1989.
- Hossain A, Aryal S, Osuampke C, Phelps J. Human sperm bioassay for reprotoxicity testing in embryo culture media: some practical considerations in reducing the assay time *Adv Urol*. 2010;136-898.
- Hosseini A & Khalili MA. Improvement of motility after culture of testicular spermatozoa: the effects of incubation time and temperature. *Transl Androl and Urol* 2017;6(2):271-276.

Holt WV, O'Brien J, Abaigar T. Applications and interpretation of computer-assisted sperm analyses and sperm sorting methods in assisted breeding and comparative research. *Reprod Fertil Devel.* 2007;19:709–718.

Hrudka F. Cytochemical and ultracytochemical demonstration of cytochrome c oxidase in spermatozoa and dynamics of its changes accompanying ageing or induced by stress. *Int J Androl.* 1987;10(6):809-28.

Intasqui P, Antoniassi MP, Camargo M, Nichi M, Carvalho VM, Cardozo KH, Zylbersztejn DS, Bertolla RP. Differences in the seminal plasma proteome are associated with oxidative stress levels in men with normal semen parameters. *Fertil Steril.* 2015;104(2):292-301.

Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJ. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil.* 1984;70(1):219-28.

Yun JI, Gong SP, Song YH, Lee ST. Effects of combined antioxidant supplementation on human sperm motility and morphology during sperm manipulation *in vitro*. *Fertil and Steril*, 2013.

Khan I, Staessen C, Devroey P, Van Steirteghem AC. Human serum albumin versus serum: a comparative study on embryo transfer medium. *Fertil Steril.* 1991;56:98–101.

Kruger TF, Menkveld R, Stander FS, Lombard CJ, Van der Merwe JP, van Zyl JA, Smith K. Sperm morphologic features as a prognostic factor in *in vitro* fertilization. *Fertil Steril.* 1986;46(6):1118-23.

Kruger T, Acosta A, Simmons K, Swanson RJ, Matta JF, Oehninger S. Predictive value of abnormal sperm morphology *in vitro* fertilization. *Fertil Steril.* 1988;49:112-117.

Kuo YL, Tzeng WL, Chiang HK, Ni RF, Lee TC, Young ST. New system for long-term monitoring of sperm motility: EDTA effect on semen. *Arch of Androl.* 1998;41:2,127-133.

de Lamirande E, Jiang H, Zini A, Kodama H, Gagnon C. Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev Reprod.* 1997;2:48-54

Lane M & Gardner DK. Embryo culture medium: which is the best? *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2007;21:83-100.

Lane M & Gardner DK. Ammonium induces aberrant blastocyst differentiation, metabolism, pH regulation, gene expression and subsequently alters fetal development in the mouse. *Biol Reprod.* 2003;69:1109-17.

Langlais J, Kan FW, Granger L, Raymond L, Bleau G, Roberts KD. Identification of sterol acceptors that stimulate cholesterol efflux from human spermatozoa during *in vitro* capacitation. *Gamete Res.* 1988;20:185–201.

Leese HJ, Donnay I, Thompson JG. Human assisted conception: A cautionary tale. Lessons from domestic animals. *Hum Reprod* 1998; 13 Suppl 4:184-202.

Lejeune TFP. Human Spermatozoa: Maturation, Capacitation and Abnormalities. 1ª Edição. New York: Nova Biomedical; 2010.

Lichtenfels AJ, Gomes JB, Pieri PC, El Khouri Miraglia SG, Hallak J, Saldiva PHN. Increased levels of air pollution and a decrease in the human and mouse male-to-female ratio in São Paulo, Brazil. *Fertil Steril*. 2007;87(1):230-2.

Liu DY, Liu ML, Baker HW. Quinn's advantage fertilization medium enhances zona pellucida-induced acrosome reaction compared with human tubal fluid medium. *Reprod Biomed Online*. 2011;3:735–739.

Liu DY, Clarke GN, Baker HWG. Hyper-osmotic condition enhances protein tyrosine phosphorylation and zona pellucid binding capacity of human spermatozoa. *Hum. Reprod*, 2006;21,745–752.

Luo SM, Schatten H, Sun QY. Sperm mitochondria in reproduction: good or bad and where do they go? *J Genet Genomics*. 2013;40(11):549-556.

Mahfouz RZ, du Plessis SS, Aziz N, Sharma R, Sabanegh E & Agarwal A. Sperm viability, apoptosis, and intracellular reactive oxygen species levels in human spermatozoa before and after induction of oxidative stress. *Fertil Steril*. 2010;93,814-821.

Mann T. Studies on the metabolism of semen: 3. Fructose as a normal constituent of seminal plasma. Site of formation and function of fructose in semen. *Biochem J*. 1946; 40:481.

Mansour RT, Serour MG, Abbas AM, Kamal A, Tawab NA, Aboulghar MA, Serour GI. The impact of spermatozoa preincubation time and spontaneous acrosome reaction in intracytoplasmic sperm injection: a controlled randomized study. *Fertil Steril*. 2008;90(3):584-91.

Marin-Briggiler CI, Tezon JG, Miranda PV, Vazquez-Levin MH. Effect of incubating human sperm at room temperature on capacitation-related events. *Fertil Steril*. 2002;77,252-259.

Martinez P, Morros A. Membrane lipid dynamics during human sperm capacitation. *Front Biosc*. 1996;1:103–d117.

Matsuura R, Takeuchi T, Yoshida A. Preparation and incubation conditions affect the DNA integrity of ejaculated human spermatozoa. *Asian J Androl*. 2010;12:753–759.

Matson P & Tardif S. A preliminary search for alternatives to albumin as a medium supplement for the culture of human sperm. *Reprod Biol*. 2012;12(3):329-31.

Mehta A, Sigman M. Identification and preparation of sperm for ART. *Urol Clin*. 2014;41(1):169-80.

Menegazzo M, Zuccarello D, Luca G, Ferlin A, Calvitti M, Mancuso F, Calafriore R, Foresta C. Improvements in human sperm quality by long-term *in vitro* co-culture with isolated porcine Sertoli cells. *Hum reproduction*. 2011;26, 2598-2605.

Menezo Y, Testart J, Perrone D. Serum is not necessary in human *in vitro* fertilization, early embryo culture, and transfer. *Fertil Steril*. 1984;42:750-5

Meintjes M, Chantilis SJ, Ward DC, Douglas JD, Rodriguez AJ, Guerami AR, Bookout DM, Barnett BD, Madden JD. A randomized controlled study of human serum albumin and serum substitute supplement as protein supplements for IVF culture and the effect on live birth rates. *Hum Reprod*. 2009;24(4):782-9.

Monteiro RAC, Pariz JR, Pieri PC, Hallak J. An easy, reproducible and cost-effective method for andrologists to improve the laboratory diagnosis of nonobstructive azoospermia: a novel microcentrifugation technique. *Int Braz J Urol*. 2016;42:132-8.

Molina M, Segura JA, Aledo JC, Medina MA, Castro NI, Marquez J. Glutamine transport by vesicles isolated from tumour-cell mitochondrial inner membrane. *Biochem J*. 1995;308:629–33.

Morrell JM, Moffatt O, Sakkas D, Manicardi GC, Bizzaro D, Tomlinson M, Holmes P V. Reduced senescence and retained nuclear DNA integrity in human spermatozoa prepared by density gradient centrifugation. *J Assist Reprod Genet*. 2004;21(6):217-22.

Morris DS, Dunn RL, Schuster TG, Ohl DA, Smith GD. Ideal culture time for improvement in sperm motility from testicular sperm aspirates of men with azoospermia. *J Urol*. 2007;178(5):2087-2091.

Mortimer ST, van der Horst G, Mortimer D. The future of computer-aided sperm analysis. *Asian J Androl*. 2015;17(4):545-53.

Nabi A, Khalili MA, Halvaei I, Roodbari F. Prolonged incubation of processed human spermatozoa will increase DNA fragmentation. *Andrologia*, 2014;46(4),374–379.

Nicholson CM, Abramsson L, Holm SE, Bjurulf E. Bacterial contamination and sperm recovery after semen preparation by density gradient centrifugation using silane-coated silica particles at different g forces. *Hum Reprod*. 2000;15(3):662-6.

Nowicka-Bauer K, Lepczynski A, Ozgo M, Kamieniczna M, Fraczek M et al. Sperm mitochondrial dysfunction and oxidative stress as possible reasons for isolated asthenozoospermia. *J physiol pharmacol*. 2018;69(3).

Okamura N, Tajima Y, Soejima A, Masuda H, Sugita Y. Sodium bicarbonate in seminal plasma stimulates the motility of mammalian spermatozoa through direct activation of adenylate cyclase. *J Biol Chem*. 1985;260, 9699-9705.

Ozmen B, Koutlaki N, Youssry M, Diedrich K, Al-Hasani S. DNA damage of human spermatozoa in assisted reproduction: origins, diagnosis, impacts and safety. *Reprod Biomed Online*. 2007;14:384-95.

Pasqualotto FF, Sobreiro BP, Hallak J, Pasqualotto EB, Lucon AM. Cigarette smoking is related to a decrease in semen volume in a population of fertile men. *BJU Int*. 2006;97(2),324-326.

- Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injections of single spermatozoa into an oocyte. *Lancet*. 1992;340:17-18.
- Pariz JR, Ranéa C, Monteiro RAC, Hallak J. Mitochondrial, axonemal, centriolar defects and loss of sperm DNA integrity as co-factors of ICSI failure in primary ciliary dyskinesia syndrome. *IBJU. In press* 2020.
- Pariz JR, Monteiro RAC, Hallak J. Long-term sperm cryopreservation does not affect post-thaw cryo-survival rates. *JBRA Assist Reprod*. 2020;24(1):3-8.
- Pasha YY, Jorsaraei SG, Zeinalzadeh M, Amiri MG, Ramaji A. Evaluation of preincubation time interval in testicular biopsy to obtain optimum sperm parameters. *Cell J*. 2012;14(1):1–6.
- Pariz JR & Hallak J. Effects of caffeine supplementation in post-thaw human semen over different incubation periods. *Andrologia* 2016,48,1049–1054.
- Pariz JR, Ranea C, Monteiro RAC, Evenson D, Drevet J, Hallak J. Melatonin and caffeine supplementation used as protective and stimulating agents respectively in the cryopreservation of human semen improves survival, viability and motility after thawing compared to traditional TEST-Yolk buffer. *Oxid Med Cell Longev*. 2019:6472945.
- Parinaud J, Milhet P, Vieitez G, Richoilley G. Human sperm capacitation and *in vitro* fertilization in a chemically defined and protein-free medium SMART11. *Hum Reprod*. 1998;13(9):2579-82.
- Palasz AT, Rodriguez-Martinez H, Beltran-Brena P, Perez-Garnelo S, Martinez MF, Gutierrez-Adan A, De la Fuente. Effects of hyaluronan, BSA, and serum on bovine embryo *in vitro* development, ultrastructure, and gene expression patterns. *Mol. Reprod*. 2006;73,1503-1511.
- Petrella C, Hsieh J, Blake E, Thrift K, Zacur H, Zhao Y. Human sperm can survive at room temperature for weeks: Measured by motility and viability of sperm maintained under various conditions. *Fertil. Steril*. 2003;80,210.
- Petrella C, Hsieh J, Thrift K, Jarow JP, Zacur H, Zhao Y. Optimizing incubation conditions for the preservation of sperm motility in processed semen samples. *Fertil Steril*. 2005;84(2):513-5.
- Popal W & Nagy ZP. Laboratory processing and intracytoplasmic sperm injection using epididymal and testicular spermatozoa: what can be done to improve outcomes? *Clinics*. 2013;68(1)125-30.
- Pool TB. Development of culture media for human assisted reproductive technology. *Fertil Steril*. 2004;81(2):287-9.14.
- Pool TB, Martin JE. High continuing pregnancy rates after *in vitro* fertilization-embryo transfer using medium supplemented with a plasma protein fraction containing a and b globulins. *Fertil Steril*. 1994;61:714–719.

Pool TB, Atiee SH, Martin JE. Oocyte and embryo culture. Basic concepts and recent advances. In: May JV, ed. Assisted reproduction: laboratory considerations. Infertility and Reproductive Medicine Clinics of North America. Philadelphia, PA: W.B. Saunders Co.1998;9:181–203.

Piomboni P, Focarelli R, Stendardi A, Ferramosca A, Zara V. The role of mitochondria in energy production for human sperm motility. *Int J Androl*. 2012;35(2):109-124.

Quinn P. The development and impact of culture media for assisted reproductive technologies. *Fertil Steril*. 2004;81(1):27-9.

Quinn P, Kerin JF, Warnes GM. Improved pregnancy rate in human *in vitro* fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. *Fertil Steril* 1985;44:493–8.

Rehman F, Zhao C, Shah MA, Qureshi MS, Wang X. Semen extenders and artificial insemination in Ruminants. *Vet*. 2013;1;1-8.

Renard P, Grizard GG, Sion JF, Boucher B, Lannou DDL. Improvement of motility and fertilization potential of post thaw human sperm using glutamine. *Cryobiol*. 1996;33:311–319.

Rhemrev J, Lens JW, McDonnell J, Schoemaker J, Vermeiden PW. The post wash total progressively motile sperm cell count is a reliable predictor of total fertilization failure during *in vitro* fertilization treatment. *Fertil Steril*. 2001;76:884-891.

Rogers BJ, Perreault SD. Importance of glycolysable substrates for *in vitro* capacitation of human spermatozoa. *Biol Reprod*. 1990;43:1064-9.

Sangeeta S, Arangasamy A, Kulkarni S, Selvaraju S. Role of amino acids as additives on sperm motility, plasma membrane integrity and lipid peroxidation levels at pre-freeze and post-thawed ram semen. *Anim Reprod Sci*. 2015;161:82-88.

Sposito C, Camargo M, Tibaldi DS, Barradas V, Cedenho AP, Nichi M, Bertolla RP, Spaine DM. Antioxidant enzyme profile and lipid peroxidation products in semen samples of testicular germ cell tumor patients submitted to orchiectomy. *Int Braz J Urol*. 2017;43(4):644-651.

Si Y. Temperature-dependent hyperactivated movement of hamster spermatozoa. *Biol Reprod*. 1999;57,1407-1412.

Suarez SS & Ho H. Hyperactivation of mammalian sperm. *Cel Mol Biol*. 2003;49,351-356.

Storey BT. Mammalian sperm metabolism: oxygen and sugar, friend and foe. *Int J Dev Biol*. 2008;52:427-437.

Shulman A, Hauser R, Lipitz S, Frenkel Y, Dor J, Bider D, Mashiach S, Yogev L, Yavetz H. Sperm motility is a major determinant of pregnancy outcome following intrauterine insemination. *J Assist Reprod Genet*. 1998;11:381–385.

Szczykutowicz J, Kałuża A, Kaźmierowska-Niemczuk M, Ferens-Sieczkowska M. The Potential Role of Seminal Plasma in the Fertilization Outcomes. *BioMed Research International*, 2019.

Turner RM. Tales from the Tail: What Do We Really Know About Sperm Motility? *J Androl*. 2003;24:790-803.

The World Health Report. Life in the 21st century A vision for all. World Health Organization. Geneva; 1998.

Thijssen A, Klerkx E, Huyser C, Bosmans E, Campo R, Ombelet W. Influence of temperature and sperm preparation on the quality of spermatozoa. *Reprod Biomed Online*. 2014;28(4):436-42.

Yavas Y & Selub MR. Intrauterine insemination (IUI) pregnancy outcome is enhanced by shorter intervals from semen collection to sperm wash, from sperm wash to IUI time, and from semen collection to IUI time. *Fertil Steril*. 2004;82(6):1638–1647.

Zhang XD, Chen MY, Gao Y, Han W, Liu DY, Huang GN. The effects of different sperm preparation methods and incubation time on the sperm DNA fragmentation. *Hum Fertil*. 2011;14(3):187-191.

Zhu J, Tsirigotis M, Pelekanos M, Craft I. In-vitro maturation of human testicular spermatozoa. *Hum Reprod*. 1996;11(1):231-2.

Weathersbee PS, Pool TB, Ord T. Synthetic serum substitute (SSS): a globulin-enriched protein supplement for human embryo culture. *J Assist Reprod Genet*. 1995;12:354– 360.

Williams AC & Ford WC. The Role of Glucose in Supporting Motility and Capacitation in Human Spermatozoa. *J Androl*. 2001;22(4):680-95.

World Health Organization (Suíça). WHO Laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5^oed. Geneva; 2010.

ANEXO I - Parecer de aprovação do Comitê de Ética

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA

PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Determinação e padronização de meio de cultura celular, favorável a incubação espermática.

Pesquisador: Jorge Hallak

Área Temática: Reprodução Humana (pesquisas que se ocupam com o funcionamento do aparelho reprodutor, procriação e fatores que afetam a saúde reprodutiva de humanos, sendo que nessas pesquisas serão considerados "participantes da pesquisa" todos os que forem afetados pelos procedimentos delas):
(Manipulação de gametas, pré-embriões, embriões e feto;);

Versão: 4

CAAE: 42790915.9.0000.0065

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: ANDROSCIENCE - CLINICA E LABORATORIO AVANÇADO EM ANDROLOGIA & SAÚDE REPRODUTIVA E SEXUAL MASCULINA EIRELI - EPP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.086.727

Apresentação do Projeto:

INTRODUÇÃO

Procedimentos que envolvem manipulação de gametas e embriões humanos, in vitro, com o objetivo de promover uma gestação em casais considerados inférteis são denominados Técnicas de Reprodução Assistida (TRA). Estas tecnologias incluem tratamentos à base de estimulação hormonal para programar a ovulação, permitindo o coito programado ou ainda inseminação intra-uterina (IIU). Estes tratamentos de baixa complexidade são técnicas simples e de baixo custo, que, no caso da IIU, podem incluir o processamento seminal laboratorial seguida pela introdução da amostra seminal na cavidade uterina da paciente. Por outro lado, técnicas como a fertilização in vitro (FIV) e a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) são tratamentos de alta complexidade, também com a indução da ovulação, porém com a captação dos óvulos maduros e a fertilização realizada em laboratório (in vitro). Com a evolução das técnicas de RHA, foi possível estabelecer a ICSI como um avanço expressivo no tratamento da infertilidade masculina, que consiste na inoculação de um espermatozoide viável no interior do oócito. AICSI é indicada nos

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA

Continuação do Parecer: 2.086.727

casos de fator grave de infertilidade masculina, baixa qualidade seminal e repetidas falhas de FIV. A FIV clássica é indicada nos casos de infertilidade multifatorial, permitindo o tratamento da grande maioria de casais inférteis, com ótimos resultados. No entanto, a FIV necessita de um número mínimo de espermatozoides móveis e progressivos para uma adequada fertilização de oócitos, caso contrário, o casal é encaminhado para ICSI. Nos casos de alteração espermática grave, como oligozoospermia, astenozoospermia, teratozoospermia, criptozoospermia ou sêmen criopreservado, a ICSI apresenta taxas de fertilidade e gestação significativamente maiores quando comparados a FIV. Outro fato inovador foi a aplicação da técnica de ICSI em homens com azoospermia obstrutiva ou não obstrutiva utilizando espermatozoides provenientes do testículo e epidídimo, obtidos através de procedimentos cirúrgicos. Embora as taxas de fertilização obtidas com espermatozoides recuperados cirurgicamente sejam satisfatórias, ainda são significativamente baixas quando comparadas com ejaculados frescos, principalmente pela ausência de motilidade espermática. Além disso, existe um risco elevado de transmissão de anormalidades genéticas relacionadas à esterilidade masculina para a prole. Levando em consideração que a qualidade do desenvolvimento embrionário, dependente da qualidade seminal, pode determinar o sucesso da gestação, laboratórios de reprodução humana assistida (RHA) estabelecem protocolos a fim de melhorar a qualidade seminal. Estes protocolos tomaram-se um suporte importante para as técnicas de RA, permitindo a recuperação de espermatozoides viáveis de amostras de sêmen pobres ou de espermatozoides obtidos diretamente do testículo pelo método de aspiração testicular (TESA), extração testicular (TESE), diretamente do epidídimo por aspiração microcirúrgica (MESA) ou aspiração percutânea (PESA). Outro ponto desfavorável dos espermatozoides obtidos por técnicas cirúrgicas é a presença de um número elevado de espermatozoides imaturos, com grande gota citoplasmática ligada à cabeça, e em sua maioria imóveis. Os procedimentos de recuperação destes espermatozoides, mantidos por 24 horas em cultura celular e ambiente anaeróbico antes da recuperação dos oócitos, podem apresentar uma melhora da motilidade e viabilidade destes espermatozoides para realização da ICSI. Com base nestas informações, o desenvolvimento de meios de cultura celular para as técnicas de Reprodução Assistida vem sendo alvo de estudos por investigadores nos últimos anos, com intenção de fornecer novas aplicações a esta tecnologia, estabelecendo uma ferramenta importante nos procedimentos de RA. Inicialmente, os meios utilizados para cultura de gametas e embrião eram os mesmos utilizados para células somáticas. Posteriormente, pesquisadores demonstraram que duas células de embriões de coelhos desenvolveram-se em blastocistos quando incubadas e cultivadas em qualquer soro de coelho ou bovino suplementado com glicose. A partir

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte CEP: 70.750-521
UF: DF Município: BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878 E-mail: conepe@saude.gov.br

**COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA**

Continuação do Parecer: 2.086.727

deste ponto, foram propostos alguns meios de cultura celular para simular o fluido tubário humano in vivo para o desenvolvimento embrionário in vitro, no qual foram utilizadas soluções simples de sais suplementados, tornando-as mais complexas e confiáveis. No início da década 50, Eagles realizou um trabalho pioneiro definindo um conceito mais profundo dos requisitos fundamentais do crescimento de células de mamíferos, reduzindo assim a dependência do soro como único substrato de cultura. Desta forma, foi possível demonstrar que as células necessitam de aminoácidos, vitaminas e sais equilibrados para seu metabolismo normal, permanecendo como base para novas composições de meios. Usando estes dados, durante a década de 60 Whitten, Biggers e Whittingham formularam o meio BWB (Biggers, Whitten e Whittingham) em experimentos embriológicos com ratos, posteriormente constatou-se que este meio não seria adequado para a manutenção de espermatozoides em cultura a longo prazo. Geralmente os meios de cultura possuem relativamente poucos componentes, sendo em sua maioria sais inorgânicos e até dois compostos orgânicos. O primeiro meio utilizado foi a solução de salina/soro fisiológico. A partir dos anos 80, foram publicados os primeiros meios desenvolvidos especificamente para cultura de embrião humano. Menezo et al., inovou a tecnologia com a utilização de solução de salina equilibrada, produzindo um meio com um conjunto complexo de aminoácidos, denominado meio B2. Um ano depois, Quinn et al. publicou a fórmula de um dos meios mais utilizados em toda história da FIV, o fluido tubário humano (HTF) e, logo em seguida, pesquisadores com modificaram a fórmula de HTF original. Pool et al., também formulou uma variante do HTF, o meio pré - implantacional P-1, contendo albuminaséica bovina (BSA). O uso de albumina nos meios de cultura foi proposto por Bungum et al, 2002 como o único suplemento protéico. A grande vantagem desta proteína é a sua disponibilidade comercial, que pode ser a albumina séica humana (HSA) ou bovina. A BSA, albumina de origem animal, atualmente é considerada um risco por ser uma causa provável de introdução de vírus de animais na célula, ou ainda sensibilizando as células à proteínas estranhas. Menezo et al. foi o primeiro a demonstrar que a HSA equivale ao soro de cultura na fertilização in vitro, sendo consolidado por outros estudos. A HSA é amplamente aceita como proteína aditiva de melhor definição para meios de cultura disponível no mercado. Mesmo assim, a variação de lote-a-lote é ainda uma questão a ser resolvida devido a sua variabilidade inerente no sangue do doador e das técnicas de processamento utilizadas por diferentes fabricantes. Com todas estas variáveis, a empresa de biotecnologia britânica Delta Biotechnology desenvolveu a albumina recombinante (rHA) sob o nome comercial de Recombumin TM 28 sendo considerada conveniente para RA. O desenvolvimento do soro substituto sintético (SSS) trouxe benefício para cultura de embriões, presente em alguns meios preparados

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte CEP: 70.750-521
UF: DF Município: BRASÍLIA
Telefone: (61)3315-5878 E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA

Continuação do Parecer: 2.086.727

comercialmente desde 1995. O SSS é preparado a partir de uma fração purificada de soro que não deve conter componentes lipídicos ou outros constituintes do plasma não proteicos e foi especificamente concebido como um suplemento de proteínas para o meio de cultura de FIV humana, sendo utilizado como suplemento em HTF e tornando-se um grande aliado para TRA. Consequentemente, o soro sintético substituto foi rebatizado como de suplemento soro substituto (SSS), contendo uma fração proteica de 16% e de globulinas além de 84% de HSA e, portanto, representa um meio de cultura mais complexo do que a HSA. Atualmente, a maioria dos meios de cultura comerciais utilizados da RHA contêm HSA ou são recomendados para serem suplementados com esta macromolécula, proporcionando uma melhora nos meios de cultura modernos e eliminando a necessidade de suplementação com proteína mais complexas. Algumas considerações inerentes à albumina humana revelam que ela é a proteína mais abundante no trato genital feminino, considerada uma macromolécula com a propriedade de impedir que gametas e embriões se tornem pegajosos, facilitado sua manipulação e impedindo sua aderência no recipiente em que são manipulados. Além disso, a albumina pode anular os efeitos de toxinas, podendo também ser importante para a pressão osmótica coloidal. Existem evidências de que a albumina atua como um potente inibidor da peroxidação lipídica através da ligação dos ácidos graxos que podem ser prejudiciais para as membranas espermáticas. Posteriormente, foi considerado que os aminoácidos são um dos componentes mais importantes do sistema de meio de cultura, sendo amplamente aceitos como fonte de proteína e agente protetor das propriedades dos espermatozoides, ajudando a manter a motilidade e viabilidade. Por outro lado, uma das consequências de ter os aminoácidos, particularmente a glutamina, no meio de cultura é que eles espontaneamente quebram a 37°C e produzem amônio, portanto, é importante conhecer os componentes dos meios de cultura, principalmente glutamina, para evitar os danos celulares. Ao longo da última década ocorreu uma mudança significativa nos preparativos dos meios de cultura: os laboratórios deixaram de produzir seus próprios meios e começaram a utilizar meios comerciais destinados especificamente para técnicas de fertilização in vitro. A capacidade de compra de meio produzidos assepticamente, formulados em empresas especializadas, com processos de fabricação em boas condições submetidas à regulação e inspeção de controle de qualidade, é uma alternativa atraente para todas as clínicas de RA. Apenas algumas clínicas especializadas têm a capacidade de se igualar ao nível de controle de qualidade que os meios de cultura comerciais apresentam. Curiosamente, este movimento para uso de meios de cultura formulados e produzidos comercialmente também resultou em convergência sobre as formulações utilizadas para profissionais ligados a clínicas de RA no mundo. Vários meios de cultura e

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte CEP: 70.750-521
UF: DF Município: BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878 E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA

Continuação do Parecer: 2.086.727

diferentes métodos de processar as amostras foram propostos como fatores adicionais com o objetivo de recuperar espermatozoides de amostras pobres. Estudos referentes a meios de cultura para embriões estão bem fundamentados na literatura, no entanto, como intuito de melhorar as taxas de fertilidade in vitro nos casos de infertilidade por fator masculino, há muitas controvérsias no que diz respeito ao melhor meio a ser utilizado. Estudos têm mostrado resultados discordantes em termos de melhora em cultura na motilidade espermática e a importância do tipo de meio empregado, muitas vezes devido a pequenas concentrações das amostras. Enquanto alguns grupos não mostraram diferenças na qualidade dos espermatozoides em cultura de imediato, outros documentam uma melhora na motilidade espermática com variações significativas entre os estudos. De acordo com o manual da Organização Mundial da Saúde 2010 42, a cultura celular destinada à fertilização in vitro pode envolver diversos meios de cultura, como Tyrode's, Earle's, Ham's F-10 ou HTF. Entretanto, não existe um protocolo determinado sobre o melhor meio de cultura, bem como os sistemas aplicados e períodos de incubação. Por exemplo, quanto a ensaios com HSA em espermatozoides humanos, estudos não mostram diferenças significativas na motilidade, porém, outros confirmaram que a cultura espermática melhora a motilidade e sugerem 4 horas de incubação, ou ainda, períodos de 48 horas. Também foram propostos tempos de incubação prolongados de 24 a 96 horas, entretanto, é possível que com um tempo maior comprometa a sensibilidade e especificidade do ensaio. Schuffner et al., 2002 relatou que procedimentos de manutenção dos espermatozoides vivos por curtos e prolongados períodos de tempo em cultura in vitro invariavelmente induzem a danos celulares irreversíveis, com drástica redução de seu potencial de fertilização, tornando um desafio para a rede de fabricantes de meios de cultura celular e uma incógnita para a rotina andrológica. Ao contrário de todas as células existentes no corpo de mamíferos, os espermatozoides são células especializadas com características estruturais que refletem atividades únicas. Além disso, os espermatozoides são altamente móveis e consomem uma quantidade considerável de energia e necessitam passar por várias barreiras como células do cumulus, zona pelúcida e membrana vitelina; barreiras físicas que devem transpor para que ocorra a fertilização. Somente espermatozoides morfolologicamente normais e hiperativos são capazes de atravessar e atingir a zona pelúcida sem nenhuma atividade enzimática, processo este conhecido como capacitação que envolve uma série de mudanças morfológicas na cabeça e na cauda. Durante o trânsito do trato reprodutivo feminino ocorre a preparação dos espermatozoides para realizarem a reação acrossômica (AR), expressar motilidade, hiperatividade e, por fim, fertilizar o oócito. Todavia, alterações funcionais espermáticas, como ausência de motilidade, podem impedir que ele atinja o objetivo final de fertilização, ilustrando,

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
 Bairro: Asa Norte CEP: 70.750-521
 UF: DF Município: BRASILIA
 Telefone: (61)3315-5878 E-mail: conepe@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA

Continuação do Parecer: 2.086.727

assim, a necessidade da ICSI. Os espermatozoides são células altamente diferenciadas que atuam principalmente como veículos para o transporte seguro de material genético paterno à contraparte materna. Uma das mudanças mais importantes atingida pelos espermatozoides durante o trânsito epididimal é o desenvolvimento de motilidade progressiva, dependente da energia. A energia utilizada na motilidade é essencialmente em forma de ATP intracelular gerado por oxidação dos substratos, frutose, glicose, sorbitol, lactado ou piruvato. A motilidade do espermatozoide também pode ser gerada pela batida do flagelo longo e depende de energia obtida através da fosforilação oxidativa ou glicólise que ocorre dentro da célula espermática. Estudos retrospectivos observaram que a glicólise é necessária para espermatozoides de camundongo, rato e humanos para alcançar a motilidade hiperativa e penetrar na zona pelúcida durante a fertilização. No plasma seminal humano, ao contrário de outros fluidos do corpo, a frutose, em vez de glicose, é geralmente o principal açúcar redutor e, portanto, serve como principal substrato glicolítico dos espermatozoides no sêmen. Por outro lado, Williams e Ford 60 demonstraram que a percentagem de motilidade em espermatozoides humanos, bem como a sua velocidade de percurso, é estatisticamente maior quando incubadas em meios contendo glicose. O plasma seminal possui enzimas necessárias para produzir tanto sorbitol, fonte de energia encontrada em grande quantidade, quanto frutose, porém, estudos conduzidos por Misro e Ramya, 2012 demonstraram que os espermatozoides humanos podem produzir via(s) alternativas e gerar energia necessária para sustentar sua motilidade. Adicionalmente, Garolla et. al (2005) demonstraram que a carnitina, um nutriente sintetizado a partir de um aminoácido essencial, pode ser um composto alternativo para o beneficiar a motilidade espermática progressiva em alguns casos de idiopática astenozoospermia. Substâncias estimuladoras, tais como cafeína ou pentoxifilina, também podem melhorar a viabilidade e motilidade dos espermatozoides, mas seus efeitos ainda não estão estabelecidos na literatura. A adição de pentoxifilina em amostra espermática testicular parece contribuir no ganho ou melhora da motilidade, porém, alguns estudos demonstram suas propriedades tóxicas, tornando-se contraindicada para o uso em RA. O processamento de espermatozoides depende de técnicas variadas para garantir sua viabilidade e melhorar seus aspectos funcionais. O processamento inicial geralmente envolve diluição e meios específicos formulados para produzir um ambiente favorável durante o período de incubação. Os tratamentos subsequentes utilizados na preparação dos procedimentos para TRA, em parte, para melhorar a capacidade funcional do espermatozoide, dependem muito da qualidade do meio e protocolo empregado. Estudos mostraram uma melhora nas taxas de fertilização após o período de cultura de espermatozoides antes da fertilização in vitro e ICSI. Embora melhoramentos na motilidade dos

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
 Bairro: Asa Norte CEP: 70.750-521
 UF: DF Município: BRASILIA
 Telefone: (61)3315-5878 E-mail: conepe@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA

Continuação do Parecer: 2.086.727

espermatozoides sejam vistos quando são incubados em um determinado meio por longos períodos, não há diretrizes para sugerir a duração e o uso do meio de cultura para uma resposta favorável a motilidade. Durante o processo de preparação de espermatozoides para a RA, os espermatozoides são separados do plasma seminal, que desempenha um papel protetor contra radicais livres de oxigênio (ROS), tornando a amostra susceptível ao ataque destes ROS sintetizados pela respiração mitocondrial ou exógena derivada de radiação ionizante. Consequentemente, a peroxidação lipídica da membrana plasmática dos espermatozoides por induzida pelas ROS resulta na destruição ou alterações celulares que influenciam nas funções espermáticas, na capacidade de fertilização e até mesmo em sua sobrevivência. Além disso, as ROS podem causar danos substanciais ao material genético do espermatozoide, tais como quebras de DNA, mutações, deleções cromossômicas, dicêntricos e troca de cromátides irmãs. O uso de espermatozoides danificados em RA pode produzir um decréscimo significativo na taxa de sucesso na fertilização. Para evitar tais danos, a adição de fatores antioxidantes exógenos à manipulação do espermatozoide em meio de cultura pode aumentar a taxa de sucesso da RA. Em estudo recente, foi observado que o uso de suplementos antioxidantes no meio de cultura durante a incubação pode reduzir os radicais livres e oxidantes. Além disso, sugere-se que as culturas testiculares não devem ser cultivadas por mais de 48 horas, pois o ambiente torna-se favorável aos efeitos nocivos dos ROS e desenvolvimento de anomalias cromossômicas estruturais em espermatozoides *in vitro*.

HIPÓTESE

Ao longo dos anos, houve um aumento substancial no conhecimento sobre a fisiologia, bioquímica, genética e controle epigenético de gametas e embrião de mamíferos. Esta avaliação espermática global permite a identificação e determinação dos melhores meios de cultivo através de alterações das características funcionais dos espermatozoides, nos quais precisam ser considerados para determinar qual sistema a ser aplicado, enfatizando que é essencial que o meio de cultura seja uma parte do sistema de cultura, sendo apenas um componente do conjunto do laboratório de RA e do protocolo clínico 81. A falta de consenso nos estudos sobre qual sistema de cultura e período de incubação a serem aplicados nos leva a diversos questionamentos e diferentes hipóteses possíveis em tentativa de buscar um meio confiável para manter e melhorar a motilidade e viabilidade espermática em tempo adequado.

METODOLOGIA

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
 Bairro: Asa Norte CEP: 70.750-521
 UF: DF Município: BRASÍLIA
 Telefone: (61)3315-5878 E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA

Continuação do Parecer: 2.086.727

Inicialmente, será realizada a análise seminal, a amostra será obtida por masturbação em recipiente plástico estéril e atóxico, após um período de abstinência ejaculatória de 2 a 5 dias, em área anexa ao laboratório com a avaliação dos parâmetros de concentração e motilidade espermática, seguindo os critérios estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde em 2010 (OMS). Seguida pela avaliação da viabilidade espermática pelo teste hiposmótico (HOS) desenvolvido para avaliar a integridade funcional da membrana espermática a leitura será realizada em microscópio de luz Nikon (Eclipse E-200) com contraste de fase, considerando espermatozoides viáveis aqueles que apresentarem curvatura ou inchaço de cauda. Após a avaliação inicial, as amostras serão separadas em alíquotas, processadas e mantidas nos meios de cultura durante 4 horas em incubadora SANYO MCO – 5AC (Osaka, Japão) a 37°C em uma atmosfera de CO₂ (5%). O processamento seminal será realizado por gradiente descontínuo de densidade (Isolate, Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA) com o objetivo de separar espermatozoides viáveis dos inviáveis, excluir células redondas e debris celulares do líquido seminal. Em seguida será realizado os testes de função espermática na amostra seminal à fresco e nas amostras processadas por diferentes períodos de incubação será avaliado a hiperatividade espermática assistida por computador Sperm Computer Analysis SCA (SL, Barcelona, Espanha) sendo avaliado a motilidade em seis campos aleatórios em que o sistema SCA identificará e classificará cada espermatozoide de acordo com a sua motilidade, calculando sua velocidade média de movimento e hiperatividade. A dosagem de radicais livres (ROS) que será realizada pelo método de quimiluminescência, utilizando o luminol como agente luminescente. A reação do luminol com os ROS presentes nas amostras seminais resultarão em emissão de luz proporcional à quantidade de ROS presente. E posteriormente a avaliação da integridade do DNA espermático pelo método descrito por Evenson 2002, por Citômetro de Fluxo Fortessa, BD (Franklin Lakes, NJ, USA), após a coloração com laranja de acridina. uma alíquota será congelada em nitrogênio líquido e encaminhada para posterior leitura no Laboratório de Imunologia e Alergia (LIM 60) na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo onde serão analisadas. Protocolos de incubação: Os protocolos serão divididos em 4 grupos, definidos de acordo com o meio de cultura e suplementos utilizados (Anexo I), que irá conter amostras distribuídas aleatoriamente. Determinar qual o melhor meio será utilizado, sendo definido após apresentar o resultado mais favorável após incubação por 4 horas em incubadora SANYO MCO – 5AC (Osaka, Japão) a 37°C em uma atmosfera de CO₂ (5%). 2ª Etapa - Após definição do melhor meio a ser utilizado, será determinado então qual a melhor suplementação utilizada que produza um melhor resultado a motilidade espermática após incubação durante 4 horas em incubadora SANYO MCO – 5AC (Osaka,

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
 Bairro: Asa Norte CEP: 70.750-521
 UF: DF Município: BRASILIA
 Telefone: (61)3315-5878 E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA

Continuação do Parecer: 2.086.727

Japão) a 37°C em uma atmosfera de CO₂ (5%).3a Etapa- Nesta fase será definido qual o período de incubação mais indicado para as células espermáticas mantidas em incubadora SANYO MCO – 5AC(Osaka, Japão) a 37 °C em uma atmosfera de CO₂ a 5%.Os protocolos serão divididos em grupos, de acordo com o meio de cultura e suplementos utilizados, que irá conter amostras distribuídas aleatoriamente. Os meios e suplementos disponíveis comercialmente foram definidos conforme literatura recente que deverão ser adicionados a amostra seminal processada para posterior avaliação.

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO/EXCLUSÃO

Serão incluídos pacientes que apresentem concentração de espermatozoides acima de 10 milhões/ml e motilidade progressiva (PR) abaixo de 32%. As amostras que não atenderem as características do estudo, pacientes azoospermicos ou que não assinarem o TCLE serão excluídos do estudo.

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVOS PRIMÁRIOS

Este estudo tem como objetivos:

1. Investigar quais diferentes meios de cultura celular são adequados para cultura de células espermática humana.
- 2.Determinar o melhor meio de cultura do ponto de vista funcional do espermatozoide3. Evidenciar se o tempo de ensaio utilizado na rotina andrológica influencia na qualidade e motilidade espermática.

OBJETIVO SECUNDÁRIO

Evidenciar se o tempo de ensaio utilizado na rotina andrológica influencia na qualidade e motilidade espermática.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

RISCOS

A participação do paciente não oferecerá quaisquer danos e riscos referentes à vida social, sexual e mental, terá apenas o desconforto da coleta do sêmen, havendo total isenção de ônus da sua parte.

BENEFÍCIOS

A pesquisa trará benefícios futuros para o melhor procedimento de recuperação espermática nos

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
 Bairro: Asa Norte CEP: 70.750-521
 UF: DF Município: BRASILIA
 Telefone: (61)3315-5878 E-mail: conepe@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA

Continuação do Parecer: 2.086.727

procedimentos de FIV e ICSI, a determinação de um meio e tempo de incubação eficaz será determinante para o sucesso da gestação de casais inférteis. Os pacientes inclusos na pesquisa não terão benefícios.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Verificar item "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Verificar item "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

ANÁLISE DE RESPOSTA AO PARECER CONSUBSTANCIADO CONEP Nº 2.011.560:

1. Quanto a Folha de Rosto, documento "FR.pdf", postado em 21/02/2017, solicita-se apresentar o item "Patrocinador Principal" com os campos preenchidos, assinados e datado com a identificação do responsável pela instituição que proporcionará o patrocínio para a pesquisa (Norma Operacional CNS nº001 de 2013 item 3.3.a).

RESPOSTA: Informamos que foi adicionado (Nome do arquivo: FR_OFICIAL_RANEA) o patrocinador principal atual (Laboratório Androscience, Responsável Dr. Jorge Hallak).

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

2. Quanto ao documento "PROJETO_MESTRADO_ROSA_ALICE.pdf", postado em 08/12/2016:

2.1. Na página 1 de 29, do projeto detalhado e nos demais documentos do protocolo de pesquisa, solicita-se a correção do nome da aluna que irá executar a pesquisa, visto que o documento "Inclusao_pesquisadora_executante.pdf", postado em 8/12/2016, informa a substituição da aluna Rosa Alice Casemiro Monteiro por Caroline Ranéa.

RESPOSTA: Foram realizadas as alterações solicitadas em relação ao nome da pesquisadora executante (Nome do documento: OFICIAL_PROJETO_MESTRADO_RANEA; página 1).

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

2.2. No item "3. Materiais e Métodos", solicita-se esclarecer qual a faixa etária dos participantes da

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde	
Bairro: Asa Norte	CEP: 70.750-521
UF: DF	Município: BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878	E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA

Continuação do Parecer: 2.086.727

pesquisa que serão recrutados para participar do estudo. Ressalta-se que caso seja prevista a inclusão de participantes de pesquisa com idade inferior a 18 anos deverá ser apresentado o Termo de Assentimento nos termos no item II.2 Resolução CNS nº 466 de 2012.

RESPOSTA: Foi adicionada a informação solicitada (Página 12 no item desenho do estudo): "Este estudo prospectivo utilizará amostras seminais obtidas de 50 pacientes inférteis com faixa etária estabelecida entre 21 e 45 anos, encaminhados a clínica de rotina andrológica do Laboratório Androscience – Clínica e Laboratório de Referência em Criopreservação e Reprodução Masculina entre Julho de 2017 à Julho de 2019, mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo II)".

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

3. Quanto ao documento "Termo_de_consentimento.pdf", postado em 8/12/2016:

3.1. Na página 1 de 3, solicita-se suprimir os campos de preenchimento: "Documento de identidade nº", visto que essa não é uma informação necessária para a obtenção do consentimento livre e esclarecido do participante de pesquisa.

RESPOSTA: Retiramos o campo documento de identidade nº no TCLE visto que essa não é uma informação necessária para a obtenção do consentimento livre e esclarecido do participante de pesquisa. (Nome do documento: 2017_RANEA_TCLE_OFICIAL; página 1).

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

3.2. Conforme o item V da Resolução CNS nº 466 de 2012, "considera-se que toda pesquisa envolvendo seres humanos envolve risco. O dano eventual poderá ser imediato ou tardio, comprometendo o indivíduo ou a coletividade". Ressalta-se o item II.22 da mesma resolução que define como "Risco da pesquisa – possibilidade de danos à dimensão física, psíquica, moral, intelectual, social, cultural ou espiritual do ser humano, em qualquer pesquisa e dela decorrente". Solicita-se adequação apontando os riscos aos quais os participantes estarão expostos.

RESPOSTA: Apontamos os riscos (risco mínimo) da pesquisa aos quais os participantes estarão expostos, visto que a participação não oferecerá quaisquer danos e riscos referentes à vida social, sexual e mental, terá apenas o desconforto da coleta do sêmen, havendo total isenção de ônus da sua parte. (Nome do documento: 2017_RANEA_TCLE_OFICIAL; página 2).

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte CEP: 70.750-521
UF: DF Município: BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878 E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA

Continuação do Parecer: 2.086.727

3.3. Na página 15 de 29, no item "3.5.3. Teste de integridade do DNA (SCSA)", do documento "PROJETO_MESTRADO_ROSA_ALICE.pdf", postado em 8/12/2016, lê-se "Uma alíquota de sêmen será congelada em nitrogênio líquido para posterior leitura [...]". Neste sentido, o TCLE deve conter consentimento de autorização para a coleta, depósito, armazenamento e utilização do material biológico humano (Resolução CNS 441/11, itens 2.II e 6; Portaria MS 2.201/11, Capítulo II, Artigos 5º e Capítulo III, Artigo 8). Solicita-se adequação.

RESPOSTA: Foi adicionado a informação no termo de consentimento para a autorização para a coleta, depósito, armazenamento e utilização do material biológico humano, sendo que para a avaliação da integridade do DNA (SCSA) será necessário o armazenamento de uma alíquota (100µl) da amostra biológica (sêmen) durante 3 dias para posterior leitura, o restante das amostras serão descartadas após análise. (Nome do documento: 2017_RANEA_TCLE_OFICIAL; página 3).

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

3.4. O documento está escrito em forma de declaração. No entanto, o consentimento deve ser apresentado em forma de convite, esclarecendo em linguagem acessível todos os procedimentos e garantias (Resolução CNS nº 466 de 2012, item IV) para, ao final, o participante declarar que está de acordo. Solicita-se adequação.

RESPOSTA: Reescrevemos o TCLE em forma de convite e esclarecemos todos os procedimentos que serão realizados na pesquisa. (Nome do documento: 2017_RANEA_TCLE_OFICIAL; página 3).

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

3.5. O TCLE é um documento no qual o pesquisador comunica ao possível participante ou responsável como será a pesquisa para a qual está sendo convidado, fornecendo a ele (a) todos os esclarecimentos necessários para decidir livremente se quer participar ou não. Solicita-se, portanto, a reformulação do TCLE, tendo como referência o capítulo IV da Resolução CNS nº 466 de 2012.

RESPOSTA: Reformulamos o TCLE conforme Resolução CNS nº 466 de 2012. (Nome do documento: 2017_RANEA_TCLE_OFICIAL; páginas 1-5).

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

3.6. Solicita-se incorporar ao TCLE a página de assinaturas. Se, por questões de configuração, tal página continuar constituindo-se em uma folha separada, solicita-se o cuidado de obter a rubrica do participante de pesquisa nas demais folhas do TCLE, considerando-se a proteção do

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte CEP: 70.750-521
UF: DF Município: BRASÍLIA
Telefone: (61)3315-5878 E-mail: conepe@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA

Continuação do Parecer: 2.086.727

participante e do pesquisador (Resolução CNS nº 466 de 2012 item IV.5.d).

RESPOSTA: Vide documento "2017_RANEA_TCLE_OFICIAL.pdf".

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

3.7. O participante de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do TCLE. O pesquisador responsável, ou membro da equipe delegada pelo pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do TCLE apondo sua assinatura sua assinatura na última página do referido Termo. Solicita-se incluir um espaço destinado a rubrica ou inserir a informação de que todas as páginas serão rubricadas. Conforme Resolução CNS nº 466 de 2012 item IV.5.d.

RESPOSTA: O participante da pesquisa e o membro da equipe delegada pelo pesquisador responsável rubricaram todas as folhas do TCLE (páginas 1-5), incluindo a assinatura do pesquisador responsável (página 5) e destinamos um espaço na página 5 para a informação de que todas as páginas do TCLE serão rubricadas. (Nome do documento: 2017_RANEA_TCLE_OFICIAL).

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

3.8. Solicita-se incluir no TCLE uma breve descrição do que é o CEP, qual sua função no estudo, seu horário de funcionamento e suas formas de contato (Resolução CNS nº 466 de 2012, item IV.5.d).

RESPOSTA: Descrevemos todas as informações pertinentes sobre o comitê de ética em pesquisa (CEP): é um colegiado interdisciplinar e independente, com "munus público", que deve existir nas instituições que realizam pesquisas envolvendo seres humanos no Brasil, criado para defender os interesses dos sujeitos em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro dos padrões éticos (Normas e Diretrizes Regulamentadoras da Pesquisa Envolvendo Seres Humanos – Resolução CNS 196/96, II.4). Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o CEP – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 2661-6442 ramais 16, 17, 18 (8:00 às 19:00hs) – e-mail: cappesq@hcnet.usp.br. (Nome do documento: 2017_RANEA_TCLE_OFICIAL; página 4).

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

3.9. Na página 3 de 3, solicita-se excluir os dados da pesquisadora Rosa Alice Casemiro Monteiro e incluir os dados da pesquisadora Caroline Ranéa.

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte CEP: 70.750-521
UF: DF Município: BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878 E-mail: conepe@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA

Continuação do Parecer: 2.086.727

RESPOSTA: Foram incluídos os dados da pesquisadora executante: PESQUISADOR (A) EXECUTANTE: Caroline Ranéa

CARGO/FUNÇÃO: Biomédica

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 31097

UNIDADE DO HCFMUSP: Divisão de Clínica Urológica

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

4. Quanto o documento "PB_INFORMACOES_BÁSICAS_DO_PROJETO_479276.pdf", postado em 21/02/2017:

4.1. Na página 4 de 8, no item "Riscos", solicita-se apresentar os riscos da pesquisa. De acordo com o item V da Resolução CNS Nº 466 de 2012, "considera-se que toda pesquisa envolvendo seres humanos envolve risco".

RESPOSTA: Incluímos o risco da pesquisa, sendo que a mesma não oferecerá quaisquer danos (risco mínimo). (Nome do documento: PB_INFORMACOES_BASICAS_DO_PROJETO; página 4).

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

4.2. Na página 4 de 8, no item "benefícios", solicita-se apresentar os benefícios do estudo para os participantes de pesquisa e a coletividade. Solicita-se adequação.

RESPOSTA: A pesquisa trará benefícios futuros para o melhor procedimento de recuperação espermática nos procedimentos de FIV e ICSI, a determinação de um meio e tempo de incubação eficaz será determinante para o sucesso da gestação de casais inférteis. Os pacientes incluídos na pesquisa não terão benefícios (Nome do documento: PB_INFORMACOES_BASICAS_DO_PROJETO; página 5).

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

4.3. Na página 5 de 8, no item "Centros Coparticipantes", solicita-se esclarecer como se dará a participação do Laboratório Androscience na pesquisa, visto que o pesquisador Jorge Hallak se encontra como responsável tanto pelo centro de pesquisa coordenador do estudo como pelo centro coparticipante.

RESPOSTA: Adicionamos como se dará a participação do Laboratório Androscience na pesquisa, sendo que está será fundamental, por estar participando efetivamente de todas as etapas da pesquisa desde a coleta do material biológico, procedimentos realizados, análise estatística e

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte CEP: 70.750-521
UF: DF Município: BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878 E-mail: conepe@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA

Continuação do Parecer: 2.086.727

interpretação de resultados. (Nome do documento: PB_INFORMACOES_BASICAS_D0_PROJETO; página 6).

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

5. Demais alterações realizadas no projeto de pesquisa conforme solicitado, inclusão de objetivo secundário e critérios de inclusão e exclusão:

RESPOSTA: Objetivo secundário: Evidenciar se o tempo de ensaio utilizado na rotina andrológica influencia na qualidade e motilidade espermática. (Nome do documento: OFICIAL_PROJETO_MESTRADO_RANEA; página 12).

Critérios de inclusão/exclusão: Serão incluídos pacientes que apresentem concentração de espermatozoides acima de 10 milhões/ml e motilidade progressiva (PR) abaixo de 32%. As amostras que não atenderem as características do estudo, pacientes azoospermicos ou que não assinarem o TCLE serão excluídos do estudo. (Nome do documento: OFICIAL_PROJETO_MESTRADO_RANEA; página 12).

Informamos que todos os documentos estão disponíveis para o recurso "copiar/ colar".

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

Considerações Finais a critério da CONEP:

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - Conep, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº 466 de 2012 e na Norma Operacional nº 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Protocolo aprovado.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMACOES_BASICAS_DO_PROJETO_479276.pdf	09/05/2017 15:56:46		Aceito
Outros	2017_RANEA_Carta_Reparos.pdf	09/05/2017 15:54:06	Jorge Hallak	Aceito
Outros	2017_RANEA_Carta_Reparos.docx	09/05/2017	Jorge Hallak	Aceito

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
 Bairro: Asa Norte CEP: 70.750-521
 UF: DF Município: BRASILIA
 Telefone: (61)3315-5878 E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA

Continuação do Parecer: 2.086.727

Outros	2017_RANEA_Carta_Reparos.docx	15:53:18	Jorge Hallak	Aceito
Folha de Rosto	FR_OFICIAL_RANEA.pdf	09/05/2017 15:38:48	Jorge Hallak	Aceito
Outros	2017_RANEA_FR_EDITAVEL.pdf	05/05/2017 13:20:11	Jorge Hallak	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	OFICIAL_PROJETO_MESTRADO_RAN EA.pdf	05/05/2017 13:12:52	Jorge Hallak	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	OFICIAL_PROJETO_MESTRADO_RAN EA.docx	05/05/2017 13:12:21	Jorge Hallak	Aceito
Outros	Alteracao_DocCepFmusp1.docx	04/05/2017 13:53:44	Jorge Hallak	Aceito
Outros	Alteracao_DocCepFmusp1.pdf	04/05/2017 13:53:09	Jorge Hallak	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	2017_RANEA_TCLE_OFICIAL.doc	04/05/2017 13:51:53	Jorge Hallak	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	2017_RANEA_TCLE_OFICIAL.pdf	04/05/2017 13:51:38	Jorge Hallak	Aceito
Outros	Inclusao_pesquisadora_executante.pdf	08/12/2016 16:36:03	Jorge Hallak	Aceito
Outros	2015_etica_Cappersq_editavel.pdf	08/12/2016 16:29:08	Jorge Hallak	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	declaracao_de_destinacao_final_de_resi duos_editavel.docx	08/12/2016 16:15:45	Jorge Hallak	Aceito
Parecer Anterior	2015_etica_Cappersq_Meios_de_Cultur a.pdf	08/12/2016 15:46:20	Jorge Hallak	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	biorrepositorio.pdf	08/12/2016 14:38:13	Jorge Hallak	Aceito
Outros	Carta de Retificação_data_calculo amostral.pdf	23/03/2015 15:42:30		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte CEP: 70.750-521
UF: DF Município: BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878 E-mail: conepe@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA

Continuação do Parecer: 2.086.727

BRASILIA, 29 de Maio de 2017

Assinado por:
Jorge Alves de Almeida Venancio
(Coordenador)

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte CEP: 70.750-521
UF: DF Município: BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878 E-mail: conep@saude.gov.br

ANEXO II - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

NOME:..... DATA NASCIMENTO:/...../.....
SEXO : M ☐ F ☐ ENDEREÇO..... Nº..... APT:
BAIRRO:..... CIDADE..... CEP:.....
TELEFONE: DDD (....) RESPONSÁVEL LEGAL.....
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../..... ENDEREÇO:
Nº APT:..... BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Determinação de meios de cultura favoráveis para incubação espermática.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Dr. Jorge Hallak	CARGO/FUNÇÃO: Médico
INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 65473	UNIDADE DO HCFMUSP: Divisão de Clínica Urológica
PESQUISADOR (A) EXECUTANTE: Caroline Ranéa	CARGO/FUNÇÃO: Biomédica
INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 31097	UNIDADE DO HCFMUSP: Divisão de Clínica Urológica

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☒	RISCO MÉDIO ☐
RISCO BAIXO ☐	RISCO MAIOR ☐

Esclarecimento: A sua participação não oferecerá quaisquer danos e riscos referentes à vida social, sexual e mental, terá apenas o desconforto da coleta do sêmen, havendo total isenção de ônus da sua parte

3. AVALIAÇÃO DO BENEFÍCIO DA PESQUISA:

A pesquisa trará benefícios para o melhor procedimento de recuperação espermática nos procedimentos de FIV e ICSI. A determinação de um meio e tempo de incubação eficaz será determinante para o sucesso da gestação de casais inférteis.

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 36 meses

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

Sr. Está sendo convidado a participar da pesquisa **“Determinação e padronização de meios de cultura favoráveis para incubação espermática”** com a finalidade de melhorar a qualidade seminal, dando suporte para as técnicas de Reprodução Assistida. Estes procedimentos dependem da qualidade do meio de cultura e protocolo empregado. Na tentativa de buscar um meio favorável para manter e melhorar a motilidade e viabilidade dos *espermatozoides*, o presente estudo tem como objetivo avaliar diferentes meios de cultura celular e estabelecer quais são adequados para cultura de células espermática humana e verificar se o tempo utilizado na rotina andrológica influencia na qualidade e motilidade espermática. Para isso, será realizada uma coleta de sêmen por masturbação para análise seminal de rotina realizado no laboratório. Todos os procedimentos serão realizados se houver necessidade durante o acompanhamento clínico do paciente. Caso a amostra se enquadre nas condições do estudo, será submetida a testes que avaliam a qualidade estrutural e funcional dos *espermatozoides* a fim de verificar o efeito dos meios de cultura e suas variações, sendo avaliados em diferentes períodos de incubação os seguintes parâmetros: Viabilidade e hiperatividade espermática, processamento seminal, dosagem de radicais livres de oxigênio, avaliação da atividade mitocondrial dos *espermatozoides*, avaliação da integridade do DNA. Para a avaliação da integridade do DNA (SCSA®) será necessário o armazenamento de uma alíquota (100µl) da amostra biológica (sêmen) durante 3 dias para posterior leitura, o restante da amostra será descartada no mesmo dia da coleta, após sua análise.

SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO

1. Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o **Dr Jorge Hallak**. Que pode ser encontrado no endereço Av. Dr o. Enéias de carvalho Aguiar, 255 - 7o andar através dos Telefones (11) 3069-8080 / (11) 3073-0623. O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) é um colegiado interdisciplinar e independente, com “munus público”, que deve existir nas instituições que realizam pesquisas envolvendo seres humanos no Brasil, criado para defender os interesses dos sujeitos em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro dos padrões éticos (Normas e Diretrizes Regulamentadoras da Pesquisa Envolvendo Seres Humanos – Resolução CNS 196/96, II.4). Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o CEP – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 2661-6442 ramais 16, 17, 18 (8:00 às 19:00hs) – e-mail: cappesq@hcnet.usp.br;
2. Garantia a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;
3. Direito de confidencialidade: as informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, sendo mantidas em sigilo e protegida no arquivo de prontuário do Laboratório

Androscience. Não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente; A liberação ou publicação de informações que identifiquem pacientes é proibida.

4. Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;
5. Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação;
6. Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa;
7. Estar ciente de que não sou obrigado a participar deste estudo e de que a minha participação ou não no mesmo é uma decisão voluntária. Estou ciente também de que estou livre para voltar atrás na minha decisão de autorizar a participação neste estudo em qualquer instante.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo **“Determinação de meios de cultura favoráveis para incubação espermiática.”**

Eu discuti com o Dr. Jorge Hallak, sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Que ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

..... Data: ____/____/____

Assinatura do paciente /representante legal

..... Data: ____/____/____

Assinatura da testemunha

Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semianalfabeto ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

..... Data: ____/____/____

Assinatura do responsável pelo estudo

Anexo III. Composição dos meios de cultura utilizados no estudo

COMPONENTES	MEIO DE CULTURA HTF®	MEIO DE CULTURA CSCM®	MEIO DE CULTURA SR®	MEIO DE CULTURA G-IVF®
Sal e íons	Cloreto de Sódio, Cloreto de Potássio, Fosfato de Potássio, Cloreto de Cálcio, Sulfato de Magnésio;	Cloreto de Sódio, Cloreto de Potássio, Fosfato de Potássio, Cloreto de Cálcio, Sulfato de Magnésio	Cloreto de Sódio, Cloreto de Potássio, Cloreto de Cálcio, Fosfato de Potássio, Sulfato de Magnésio, Lactato de sódio	Cloreto de Sódio, Cloreto de Potássio, Cloreto de Cálcio, Fosfato de Sódio, Sulfato de Magnésio
Tampão	Bicarbonato de sódio	Bicarbonato de sódio		Bicarbonato de sódio
Substratos de energia	Piruvato de Sódio, Glicose, Lactato de Sódio	Piruvato de Sódio, Glicose, Lactato de Sódio	Piruvato de Sódio, Glicose	Piruvato de Sódio, Glicose
Antioxidante	-	EDTA, Citrato de sódio	EDTA	EDTA
Indicador de Ph	Vermelho fenol	Vermelho fenol		-
Antibiótico	Gentamicina	Gentamicina	Gentamicina	Gentamicina
Aminoácidos	-	Alanina, Asparagina, Ácido Aspártico, Ácido Glutâmico, Glicina, Glutamina, Prolina, Serina, Arginina, Cistina, Histidina, isoleucina, Leucina, Lisina, Metionina, Fenilalanina, Treonina, Triptofano, Tirosina, Valina	-	Alanina, Asparagina, Alanina-guatamina, Glutamato, Prolina Taurina
Uso incubadora CO ₂	Sim	Sim	Sim	Sim

Anexo IV. Estudos na literatura sobre incubação espermática e meios de cultura

AUTOR	N	TEMPO INCUBAÇÃO	INCUBAÇÃO	MEIO DE CULTURA	PARAMETROS SEMINAIS	TESTES FUNCIONAIS
Cicaré <i>et al.</i>, 2015	26	22 horas	37°C em 5% CO ₂	Ham's F10+HSA®	-	↑ ROS, Fragmentação DNA
Calamera <i>et al.</i>, 2000	20	48 horas	37°C em 5% CO ₂	Ham's F10+HSA®	↓ Motilidade *	↑ ROS
Ahmed <i>et al.</i>, 2018	40	5 horas	37°C em 5% CO ₂	<i>PureSperm</i> gradiente de centrifugação	-	↑ Condensação cromatina, fragmentação DNA
Liu <i>et al.</i>, 2011	53	2 horas	37°C em 5% CO ₂	Quinn's advantage fertilization (QAF)	↑ Hiperatividade, velocidade curvilínea	-
Hosseini & Khalili, 2017	27	24 horas	25°C	Ham's F10+HSA®	↑ Motilidade	-
Thijssen <i>et al.</i>, 2014	41	24 horas	23°C	EBSS +HSA®	↑ Motilidade	-
Nabi <i>et al.</i>, 2014	21	3 horas	37°C em 5% CO ₂	Ham's F10+HSA®	-	↑ Fragmentação de DNA [£]
Pasha <i>et al.</i>, 2012	30	4 horas	-	Ham's F10+HSA®	↓ Concentração, Motilidade	-

N : número de amostras incluídas;

* Motilidade diminuiu em 48 horas, mas em 6 horas já haviam observado queda desse parâmetro;

£Aumento da fragmentação de DNA observada a partir de 1 hora.