

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Universidade de São Paulo

Fernanda Sicchieri

**Comparação de dois meios para a criopreservação de sêmen quanto aos efeitos da
suplementação lipídica e a ação antioxidante na viabilidade espermática em homens com
parâmetros seminais alterados: estudo clínico randomizado**

Ribeirão Preto

2018

Fernanda Sicchieri

Comparação de dois meios para a criopreservação de sêmen quanto aos efeitos da suplementação lipídica e a ação antioxidante na viabilidade espermática em homens com parâmetros seminais alterados: estudo clínico randomizado

Dissertação apresentada ao Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Área de concentração: Ginecologia e Obstetrícia

Orientadora: Rosana Maria dos Reis

Ribeirão Preto

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Sicchieri, Fernanda

Comparação de dois meios para a criopreservação de sêmen quanto aos efeitos da suplementação lipídica e a ação antioxidante na viabilidade espermática em homens com parâmetros seminais alterados: estudo clínico randomizado.

Ribeirão Preto, 2018.

106 p.: il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Área de concentração: Ginecologia e Obstetrícia.

Orientador: Reis, Rosana Maria.

1. Reprodução humana. 2. Reprodução assistida. 3. Sêmen humano. 4. Espermatozoide. 5. Motilidade progressiva. 7. Fragmentação do DNA espermático

*F*olha de aprovação

Fernanda Sicchieri

Título: Comparação de dois meios para a criopreservação de sêmen quanto aos efeitos da suplementação lipídica e a ação antioxidante na viabilidade espermática em homens com parâmetros seminais alterados: estudo clínico randomizado.

Dissertação apresentada ao Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Área de concentração: Ginecologia e Obstetrícia

Data da aprovação:

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*D*edicatória

Dedico este trabalho aos meus pais e grandes incentivadores, Fernando e Loli, a quem devo meu amor pelo estudo, minha tenacidade em alcançar novos voos e a certeza de que nada é em vão!

*A*gradecimentos

A Deus, o meu bem maior;

Aos meus pais, Fernando e Loli, por todo carinho, amor, ternura e respeito, que foram fundamentais para minha formação pessoal e profissional. Sempre me fizeram acreditar na bondade e no amor que influencia positivamente a sociedade onde vivemos;

À amada irmã Beatriz, meu maior e melhor presente;

À madrinha Vera, minha segunda mãe, pela constante dedicação;

Ao meu amado namorado Gustavo, pelo enorme incentivo e apoio em todas as situações;

À querida e sábia orientadora, Profa. Dra. Rosana Reis, por ter me recebido com muito carinho e confiança. Sempre me proporcionou leveza nos momentos de pressão. Obrigada pela oportunidade que me permitiu tamanho desenvolvimento pessoal e profissional;

À parceira Alessandra Aparecida Vireque, pelo fornecimento do meio de criopreservação testado e por toda ajuda concedida neste estudo;

À amiga e colaboradora Aline Bomfim Silva, pela grande amizade, por todo suporte e carinho dedicados a este estudo desde o início;

À querida amiga Marilda Dantas, pelo auxílio na execução deste projeto, pelo apoio em todos os momentos, pela dedicação e, principalmente, pela valiosa amizade;

À zelosa amiga Fabiana, pela doce amizade, conselhos e valiosa ajuda em todos os momentos;

À amiga Maria Aparecida Vasconcelos, pelo suporte científico e técnico, essenciais para a execução deste trabalho;

Às funcionárias do Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia do HCFMRP-USP, pelo carinho, apoio e por todas as experiências compartilhadas ao longo do caminho;

Ao Laboratório de Citogenética do Departamento de Pediatria do HCFMRP-USP, especialmente à Sônia, por colaborar na realização das leituras de microscopia de fluorescência;

Ao Laboratório Multiusuário de Microscopia Confocal da FMRP-USP, especialmente à Elizabete Rosa, pela paciência, auxílio técnico e treinamento;

Às secretárias Ilza Mazzocato e Suelen Soares pelo constante auxílio;

À Suleimy Mazin, por toda a paciência e enorme ajuda com as análises estatísticas;

Aos meus colegas de pós-graduação por toda ajuda e conselhos recebidos, em especial à Thalita Bertelli e Viviane Santana;

À querida amiga Suêmis, pela força e pelos conselhos dados durante esta trajetória;

Ao CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela concessão da bolsa de mestrado;

Aos componentes da banca avaliadora, pela disponibilidade e pelas valiosas contribuições;

À Universidade de São Paulo, campus Ribeirão Preto, por me oferecer esta experiência maravilhosa;

A todos que de alguma maneira passaram por mim neste período, provavelmente deixaram parte de si e levaram um pouco de mim;

Especialmente a todos os pacientes que aceitaram participar deste estudo.

“A sabedoria consiste em aumentar o bem-estar do mundo.”

(Benjamin Franklin)

*R*esumo

SICCHIERI, F. **Comparação de dois meios para a criopreservação de sêmen quanto aos efeitos da suplementação lipídica e a ação antioxidante na viabilidade espermática em homens com parâmetros seminais alterados: estudo clínico randomizado.** 2018. 106f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

OBJETIVO: Comparar dois meios de congelamento para sêmen: o comercialmente disponível Meio de Congelamento TEST Yolk Buffer-Irvine Scientific – USA (TYB) e o crioprotetor sintético suplementado com fosfatidilcolina (PC) e antioxidante L-acetil-carnitina (ANTIOX-PC – delineado pela Invitra Tecnologia de Reprodução Assistida - Brasil) em relação a motilidade progressiva (PR) e índice de fragmentação do DNA (IFD) em amostras de sêmen obtidas de homens com parâmetros seminais alterados. DESENHO: Ensaio clínico de não-inferioridade. MATERIAIS E MÉTODOS: Foram incluídas amostras de sêmen com parâmetros seminais alterados (astenozoospermia) de 58 voluntários no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. As amostras de sêmen foram submetidas à análise antes e após a criopreservação. A motilidade dos espermatozoides foi avaliada pelo espermograma e a fragmentação do DNA espermático foi analisada pela técnica *transferase-mediated dUTP nick-end labelling* (TUNEL). Antes da criopreservação, todas as amostras de sêmen foram divididas e randomizadas para receber os crioprotetores TYB ou ANTIOX-PC, congelados no período mínimo de 30 dias e descongelados. Uma análise exploratória dos dados foi realizada através de medidas de posição central e dispersão. O teste t pareado foi usado para comparar os grupos. Comparações entre os dois meios, ANTIOX-PC e TYB, e sêmen fresco foram realizadas através de contrastes ortogonais, utilizando o modelo de regressão linear de efeitos mistos. Este modelo foi implementado no programa SAS 9.3 considerando o PROC MIXED. RESULTADOS: A motilidade PR ($P = 0,78$) e o IFD ($P = 0,06$) não foram diferentes quando comparados os meios ANTIOX-PC ($12,40 \pm 11,49$ e $13,33 \pm 10,54$) e o TYB ($12,09 \pm 11,11$ e

15,83 ± 11,04), respectivamente. Esses dados mostraram que o crioprotetor sintético delineado não foi inferior na proteção dos espermatozoides comparado com o meio TYB. Além disso, o ANTIOX-PC reteve taxas mais altas de motilidade total (43,36 ± 26,77) do que o TYB (34,79 ± 22,86; P <0,0001) e reduziu significativamente as taxas de espermatozoides imóveis (56,64 ± 26,77; P <0,0001) em relação ao TYB (65,00 ± 23,00). CONCLUSÃO: O meio ANTIOX-PC não pode ser considerado menos efetivo que o TYB em relação à motilidade PR e ao IFD. Parâmetros cinéticos observados em espermatozoides pós-descongelamento do diluente ANTIOX-PC demonstraram o impacto positivo do tratamento com fosfolipídios/antioxidantes na criotolerância espermática humana na ausência de aditivos animais.

Palavras-chave: Reprodução humana. Sêmen humano. Criopreservação. Fosfolipídio. Antioxidante

*A*bstract

SICCHIELI, F. Comparison of two media for cryopreservation of semen on the effects of lipid supplementation and antioxidant action on sperm viability in men with altered seminal parameters: a randomized clinical trial. 2018. 106p. Thesis (Master) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

OBJECTIVE: To compare two sperm freezing media: commercially available Freezing Medium TEST Yolk Buffer-Irvine Scientific – USA (TYB) and a synthetic cryoprotectant supplemented with phosphatidylcholine (PC) and antioxidant L-acetyl-carnitine (ANTIOX-PC – designed by Invitro Assisted Reproduction Technology - Brazil) in relation to progressive motility and sperm DNA fragmentation index (DFI) in semen samples obtained from men with altered seminal parameters. **DESIGN:** Non-inferiority clinical trial. **MATERIALS AND METHODS:** Were included semen samples with altered seminal parameters (asthenospermia) from 58 volunteers at the Clinical Hospital of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo. Semen samples were subjected to analysis both before and after cryopreservation. The sperm motility was evaluated by the spermogram and the sperm DNA fragmentation was analyzed by the transferase-mediated dUTP nick-end labeling technique (TUNEL). Before cryopreservation, all semen samples were divided and randomized to receive the cryoprotectants TYB or ANTIOX-PC, frozen and thawed after 30 days. An exploratory data analysis was carried out through measures of central position and dispersion. The paired t-test was used to compare the groups. Comparisons between the two media ANTIOX-PC and TYB, and fresh semen were performed through orthogonal contrasts using the mixed effects linear regression model. This model was implemented in the SAS 9.3 program considering PROC MIXED. **RESULTS:** Progressive motility ($P = 0.78$) and DFI ($P = 0.06$) were not different when comparing ANTIOX-PC (12.40 ± 11.49 ; and $13,33 \pm 10.54$) and TYB (12.09 ± 11.11 and 15.83 ± 11.04), respectively. These data showed that the synthetic cryoprotectant designed was not inferior in sperm protection compared to the TYB medium. In addition, ANTIOX-PC retained higher rates of overall motility (43.36 ± 26.77)

than TYB (34.79 ± 22.86 ; $P < 0,0001$) and significantly reduced the immotile sperm rates (56.64 ± 26.77 ; $P < 0,0001$) when compared with TYB (65.00 ± 23.00). CONCLUSION: ANTIOX-PC medium can not be considered less effective than TYB relative to progressive motility and IFD. Kinetic parameters observed in post-thaw sperm from ANTIOX-PC extender demonstrated the positive impact of the phospholipid/antioxidant treatment on human sperm cryotolerance in the absence of animal aditives.

Keywords: Human reproduction. Human semen. Cryopreservation. Phospholipidium. Antioxidant

*L*ista de figuras

Figura 1. Diagrama esquemático do ensaio TUNEL para marcação de danos no DNA espermático.

54

Figura 2. Imagem por microscopia eletrônica de fluorescência do ensaio de TUNEL.

54

Figura 3. Fluxograma do estudo descrevendo as etapas de recrutamento dos voluntários, alocação das amostras de sêmen nos grupos experimentais, seguimento e análise dos dados.

61

Figura 4. Amostra de sêmen do paciente 22 após descongelamento com meio ANTIOX-PC.

68

Figura 5. Amostra de sêmen do paciente 22 após descongelamento com meio TYB.

69

Figura 6. Amostra de sêmen do paciente 27 após descongelamento com meio ANTIOX-PC.

70

Figura 7. Amostra de sêmen do paciente 27 após descongelamento com meio TYB.

71

*L*ista de tabelas

Tabela 1. Valores de referência para os parâmetros seminais macroscópicos e microscópicos.	51
Tabela 2. Medidas de posição central e dispersão das características clínicas dos 58 voluntários.	62
Tabela 3. Medidas de posição central e dispersão dos parâmetros seminais microscópicos analisados nas amostras de sêmen fresco dos 58 voluntários.	62
Tabela 4. Medidas de posição central e dispersão dos parâmetros seminais microscópicos das amostras dos 58 voluntários congeladas com o meio crioprotetor ANTIOX-PC, após o descongelamento.	63
Tabela 5. Medidas de posição central e dispersão dos parâmetros seminais microscópicos das amostras dos 58 voluntários congeladas com o meio crioprotetor TYB, após o descongelamento.	64
Tabela 6. Motilidade PR e IFD pós-congelamento de espermatozoides humanos criopreservados nos meios ANTIOX-PC e TYB.	65
Tabela 7. Parâmetros funcionais de espermatozoides humanos congelados-descongelados nos meios crioprotetores ANTIOX-PC e TYB.	66
Tabela 8. Comparações dos parâmetros funcionais de espermatozoides congelados-descongelados nos meios crioprotetores ANTIOX-PC e TYB com o sêmen fresco (F).	67

*L*ista de abreviaturas e siglas

AGs	Ácidos Graxos
DAPI	4',6-diamidino-phenylindole
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
HCFMRP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
HTF	Human Tubel Fluid
IFD	Índice de Fragmentação do DNA
LAC	L-acetil-carnitina
LC	L-carnitina
NP	Não progressivos
PBS	Phosphate Buffered Saline
PC	Fosfatidilcolina
PE	Fosfatidiletanolamina
PL	Fosfolípido
PR	Progressivos
PUFA	Ácidos graxos poli-insaturados
ReBEC	Registro Brasileiro de Ensaio Clínicos
SSS	Soro Substituto Sintético
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TdT	Terminal desoxinucleotidil Transferase
TUNEL	Transferase-mediated dUTP nick-end labelling
TYB	TEST Yolk Buffer
USP	Universidade de São Paulo

*L*ista de símbolos

cm	centímetros
DP	desvio padrão
°C	grau Celsius
=	igual
IC	intervalo de confiança
LI	limite inferior
LS	limite superior
>	maior
≥	maior igual
±	mais ou menos
Max	máximo
<	menor
μL	microlitros
10 ⁶ /mL	milhões/mililitros
mL	mililitros
Min	mínimo
N	número amostral
w/v	peso/volume
%	por cento
Q1	primeiro quartil
p	P-valor
rpm	rotações por minuto
Q3	terceiro quartil
1:1	um para um
X	vezes

*S*umário

1. Introdução	30
2. Revisão da literatura	35
2.1. Criopreservação espermática	36
2.2. Criopreservação seminal e danos celulares	37
2.3. Meios crioprotetores	40
3. Objetivos	44
3.1. Objetivo principal	45
3.2. Objetivos específicos	45
4. Materiais e métodos	46
4.1. Aspectos éticos	47
4.2. Desenho do estudo	47
4.3. Participantes	47
4.4. Intervenções	48
4.4.1. Coleta do sêmen	48
4.4.2. Espermograma	48
4.4.3. Congelamento	51
4.4.4. Descongelamento	52
4.4.5. Análise da fragmentação do DNA	53
4.5. Tamanho da amostra	57
4.6. Randomização	57
4.6.1. Geração de sequência	57
4.6.2. Alocação	57
4.6.3. Implementação	58
4.7. Mascaramento	58
4.8. Métodos estatísticos	58
5. Resultados	59
5.1. Fluxo de participantes	60

5.2. Base de dados	61
5.3. Desfechos e estimativas	64
6. Discussão	72
6.1. Limitações do estudo	73
6.2. Interpretação	74
7. Conclusão	81
8. Outras Informações	83
8.1. Registro	84
8.2. Aspectos éticos	84
8.3. Financiamento de agência de fomento à pesquisa	84
9. Referências	85
Apêndice	97
Termo de consentimento livre e esclarecido	98
Anexos	102
Primeira e última página de aprovação do CEP	103
Primeira e última página de aprovação do CONEP	105

1. INTRODUÇÃO

A infertilidade é uma condição cada vez mais prevalente, e os fatores masculinos, isoladamente ou em combinação com fatores femininos, são estimados desempenhar um papel significativo em cerca de 40% - 50% na infertilidade conjugal. Com os avanços nas técnicas de reprodução assistida (TRA) o congelamento seminal tornou-se um aspecto integrante da medicina reprodutiva (Mutalik *et al.*, 2014). A preservação de sêmen como programa terapêutico é fundamental em procedimentos como a radioterapia, quimioterapia ou cirurgia invasiva, os quais podem levar à insuficiência testicular ou disfunção ejaculatória. A criopreservação de sêmen é o único método comprovado que pode oferecer aos casais a chance de ter filhos no futuro, após tais condições. Também é indicada na TRA em casos de procedimento de inseminação com doador, em casos de vasectomia, na obtenção de espermatozoides recuperados cirurgicamente, para evitar a necessidade de repetir procedimentos cirúrgicos invasivos e garantir a presença de células viáveis no dia da aspiração folicular nos tratamentos de fertilização assistida.

Apesar do armazenamento de espermatozoides a longo prazo ser uma das ferramentas mais importantes para melhorar as tecnologias de reprodução assistida, a criopreservação de sêmen acarreta alterações biológicas e funcionais dessas células, o que prejudica a capacidade de fertilização (Benson *et al.*, 2012; Mutalik *et al.*, 2014; Chelucci *et al.*, 2015).

A relação próxima entre criopreservação, fragmentação do DNA e baixa qualidade do sêmen, aponta para a necessidade de aprimoramento das tecnologias atualmente disponíveis, pois os métodos convencionais de criopreservação normalmente induzem danos químicos e mecânicos na membrana celular devido a alterações na transição de fase dos lipídios e aumento da peroxidação lipídica (Watson, 1995; Chelucci *et al.*, 2015), associados com a perda da motilidade espermática (Ricker *et al.*, 2006). Além disso, danos osmóticos são frequentemente observados (Ricker *et al.*, 2006).

Diferentes estratégias têm sido estudadas para evitar os danos causados aos espermatozoides durante a criopreservação. Uma delas foi a adição de agentes crioprotetores, que permitiu a evolução da técnica de congelamento, expansão de programas de melhoramento genético em grandes áreas da indústria agropecuária e a realização prática das tecnologias de reprodução assistida no tratamento da infertilidade humana (Benson *et al.*, 2012).

Desde a introdução do glicerol como agente crioprotetor permeável em 1949 por Polge *et al.*, e a subsequente descoberta do dimetil sulfóxido em 1959 por Lovelock e Bishop, muitas células e tecidos puderam ser congelados (Polge *et al.*, 1949; Lovelock e Bishop, 1959; Woods *et al.*, 2004). Os meios crioprotetores à base de gema de ovo são ainda utilizados na TRA tanto em humanos como em animais (Kobayashi *et al.*, 2000; Celeghini *et al.*, 2008; Crespilho *et al.*, 2012). A gema de ovo é um concentrado de fosfolipídios (PL) e colesterol, que ajuda a repor lipídios perdidos da membrana espermática durante o processo de congelamento e descongelamento (Bergeron e Manjunath, 2006). No entanto, existe a desvantagem de ser um aditivo de origem animal, por apresentar variação na sua composição de acordo com o manejo e estado nutricional das aves e pelo risco sanitário de transmissão de doenças (Althouse, 2008). Devido a essas razões, é extremamente difícil ter um bom controle de qualidade sobre o resultado da criopreservação de sêmen, o que desafia os pesquisadores a procurarem um substituto da gema de ovo com composição química definida, boa eficácia, segurança e de origem não animal para criopreservação de sêmen humano (Jeyendran *et al.*, 2008; Mutalik *et al.*, 2014; Chelucci *et al.*, 2015).

O potencial crioprotetor da lecitina de soja tem sido investigado como substituto da gema de ovo em diluentes utilizados para a criopreservação de espermatozoides humanos (Jeyendran *et al.*, 2008; Reed *et al.*, 2009). A lecitina é um subproduto do processo de refino do óleo de soja e seus principais componentes são os PL fosfatidiletanolamina,

fosfatidilcolina e fosfatidilinositol. Por razões relativas à propriedade intelectual ou falhas metodológicas nos artigos científicos, informações técnicas detalhadas dos extratos fosfolipídicos utilizados como aditivos dos meios crioprotetores são escassas e frequentemente geram conflitos de nomenclatura. A exemplo, as PC compreendem a fração mais abundante da lecitina de soja e por esse motivo, em alguns contextos, os termos são algumas vezes usados como sinônimos. No entanto, os extratos de lecitina de soja consistem numa mistura de PC e outros compostos, incluindo outras classes de PL (Scholfield *et al.*, 1981).

A formulação crioprotetora ANTIOX-PC, delineada a partir de meio base contendo agente crioprotetor (ACP), carboidratos, proteínas purificadas, o antioxidante L-acetilcarnitina (LAC) e uma espécie de PC sintética de alta pureza (> 99%) (Invitra Tecnologia da Reprodução Assistida LTDA) foi investigada no presente estudo quanto ao potencial de preservar a qualidade do sêmen de homens astenozoospermicos após o descongelamento. No delineamento deste ensaio clínico, nossos pressupostos foram fundamentados na hipótese de que a eficácia desse meio crioprotetor suplementado com fosfatidilcolina (PC) e L-acetilcarnitina (LAC), aferida por parâmetros seminais *in vitro*, seja similar ao meio TEST Yolk Buffer (TYB). Uma das potenciais vantagens do meio proposto é possuir composição química definida, que permite a identificação de todos os componentes adicionados ao meio, incluindo a espécie química e conteúdo do PL e, conseqüentemente, a obtenção de informações precisas acerca de seus mecanismos de ação na célula espermática. Além disso, o meio ANTIOX-PC possui maior prazo de validade devido à ausência de componentes de origem animal, que otimiza o armazenamento isento de degradação e a diminuição do risco de contaminação microbiológica.

Neste ensaio de não-inferioridade foram avaliados dois parâmetros seminais como desfechos primários: motilidade progressiva (PR), através do espermograma e o Índice de

Fragmentação do DNA (IFD) espermático pela técnica *transferase-mediated dUTP nick-end labelling* (TUNEL). Através dessas análises, será possível avaliar com maior precisão se a suplementação lipídica e antioxidante do meio crioprotetor estudado é capaz de melhorar a qualidade dos espermatozoides de homens com parâmetros seminais alterados. Assim sendo, espera-se que os resultados após o descongelamento sejam não-inferiores ao meio crioprotetor contendo gema de ovo.

*R*evisão da literatura

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Criopreservação espermática

A criopreservação de sêmen de mamíferos é um processo complexo influenciado por vários fatores inter-relacionados que afetam o tempo de vida dos espermatozoides. Dentre esses fatores estão as combinações de temperatura de armazenamento, taxa de resfriamento, composição química do diluente, concentração de crioprotetores, espécies reativas de oxigênio (EROS), composição do plasma seminal e condições assépticas (Barbas e Mascarenhas, 2009). Os protocolos de criopreservação dos espermatozoides variam entre as espécies animais devido às suas peculiaridades, que definem os crioprotetores usados para congelamento (Barbas e Mascarenhas, 2009). Esses protocolos fornecem um método econômico e eficiente para preservar o material genético, sendo utilizado na pecuária, medicina animal e reprodução assistida para seres humanos. O sucesso de qualquer protocolo criobiológico depende criticamente da compreensão dos fundamentos subjacentes ao processo e estratégias empregadas para melhorar a eficiência do congelamento (Purdy, 2006b; Barbas e Mascarenhas, 2009; Benson *et al.*, 2012; Ezz *et al.*, 2017).

O método de criopreservação de sêmen inclui as seguintes etapas: 1) redução de temperatura, que diminui gradualmente a atividade metabólica celular e aumenta o tempo de vida das células espermáticas; 2) desidratação celular, que acontece em resposta a diferença de pressão osmótica intracelular e extracelular, o que faz com que a água flua para fora da célula; 3) o congelamento, que interrompe totalmente a atividade celular; e 4) o descongelamento, que reinicia as funções normais das células (Mazur, 1984; Medeiros *et al.*, 2002; Barbas e Mascarenhas, 2009).

A criopreservação de sêmen humano é uma alternativa valiosa para preservação da fertilidade em pacientes com câncer antes de se submeterem a qualquer tratamento oncológico

(Benson *et al.*, 2012). Além dessa situação, a técnica de congelamento pode ser utilizada antes de cirurgias invasivas, que levam à insuficiência testicular ou disfunção ejaculatória; para pacientes que precisam recuperar espermatozoides através de cirurgia, sem ter a necessidade de repetir o procedimento invasivo; e para pacientes sem parceiros masculinos que desejam engravidar. Em outras espécies, é uma tecnologia importante para a preservação de animais ameaçados de extinção e conservação da biodiversidade (Ozkavukcu *et al.*, 2008; Barbas e Mascarenhas, 2009; Thomson *et al.*, 2009; Benson *et al.*, 2012).

Todavia, para empreender sucesso na aplicação da técnica de criopreservação, os espermatozoides devem ter suas características funcionais preservadas, membrana plasmática e organelas íntegras, assim como o genoma haploide intacto (Silva e Gadella, 2006).

2.2. Criopreservação seminal e danos celulares

O processo de criopreservação tem profundos efeitos sobre os espermatozoides, que podem resultar em danos letais às células e, conseqüentemente, redução da fertilidade (Ricker *et al.*, 2006). Os principais comprometimentos da função espermática induzidos pela criopreservação estão associados à modificação da composição lipídica da membrana plasmática, ao metabolismo energético, a fragmentação do DNA genômico e a indução de eventos da apoptose (Martin *et al.*, 2007; Del Valle *et al.*, 2012).

Um dos atributos que mais afetam diretamente a funcionalidade dos espermatozoides é a integridade das membranas (plasmática e mitocondrial), que estão envolvidas não apenas na viabilidade e motilidade dos espermatozoides, mas também na capacidade de interagir com o trato feminino para o processo de fertilização (Medeiros *et al.*, 2002; Chelucci *et al.*, 2015). As membranas contêm uma alta concentração de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia carbonada longa (PUFA), característicos das membranas espermáticas, que estão suscetíveis ao estresse oxidativo e conseqüentemente a peroxidação lipídica (Aitken *et al.*, 1998;

Baumber *et al.*, 2003). Esse processo causa diminuição de PL em diferentes micros domínios da membrana, sendo as quedas mais pronunciadas de PC e fosfatidiletanolamina (PE) (Schuffner *et al.*, 2001; Chelucci *et al.*, 2015). Além dos PL, o colesterol também tem seu teor reduzido em aproximadamente 14% após a criopreservação (Chelucci *et al.*, 2015; Ezz *et al.*, 2017).

No metabolismo energético, as alterações na composição da bicamada lipídica podem causar além de modificação da fluidez e aumento da permeabilidade da membrana (Stubbs e Smith, 1984; Watson, 1995), alterações nas proteínas integrais e nos receptores de membrana (Brenner *et al.*, 2000), subvertendo a ligação de hormônios e fatores de crescimento, que afetam os mais diversos processos celulares (Stubbs e Smith, 1984).

Quanto à fragmentação do DNA genômico, os danos são fortemente correlacionados à quantidade de EROs que estão em desequilíbrio com a capacidade dos antioxidantes em removê-las quando em níveis excessivos (Malvezzi *et al.*, 2014). O aumento de EROS implica em anomalias aos espermatozoides e acarreta em subfertilidade e infertilidade masculina (Lopes *et al.*, 1998). Além disso, as baixas concentrações de enzimas antioxidantes no citoplasma dos gametas masculinos contribuem para torná-los ainda mais vulneráveis (Aitken e Baker, 2006). As EROS são capazes de causar danos significativos ao DNA no genoma mitocondrial e no nuclear, sendo relacionada ao alto IFD espermático. O DNA mitocondrial é particularmente vulnerável ao ataque oxidativo, tornando-se um ótimo marcador para este tipo de estresse. (Sawyer *et al.*, 2003; Aitken e Baker, 2006).

O aumento da fragmentação do DNA espermático tem sido observado em condições de alto estresse oxidativo associado à criopreservação, com consequente perda da motilidade espermática e capacidade fertilizante do espermatozoide (Aitken *et al.*, 1998; Baumber *et al.*, 2003; Cocuzza *et al.*, 2007). Além disso, há evidências de que o dano ao DNA é frequentemente induzido de forma oxidativa, ao invés de outros processos, como a apoptose

destoante (Kodama *et al.*, 1997; Aitken, 1999; Kemal Duru *et al.*, 2000; Aitken e Baker, 2006). Em níveis mais baixos de estresse oxidativo, os espermatozoides podem preservar a sua capacidade de fertilização enquanto carregam níveis significativos de danos em seu DNA. No entanto, os danos ao DNA podem acarretar possíveis aumentos de mutações transmitidas para o embrião, resultado do reparo desordenado do DNA danificado (Aitken e Baker, 2006). A fragmentação do DNA espermático pode provocar a perda prematura da gravidez e uma variedade de patologias na prole, no qual inclui o câncer infantil (Aitken, 1999; Aitken e Baker, 2006; Thomson *et al.*, 2009).

A apoptose representa um processo fisiológico universal de morte celular programada, que pode ser dividida em três fases: indução, execução e degradação (Kerr *et al.*, 1972; Green e Reed, 1998). As mitocôndrias desempenham um papel fundamental durante a fase de execução (Kerr *et al.*, 1972; Green e Reed, 1998; Martin *et al.*, 2007). Proteínas reguladores da apoptose influenciam a permeabilidade da membrana mitocondrial externa, levando à abertura de poros mitocondriais e liberação de fatores pró-apoptóticos do interior da mitocôndria para o citoplasma, como o citocromo C (Reed, 1997; Ravagnan *et al.*, 2002; Martin *et al.*, 2007). Em condições celulares normais, o citocromo C atua na produção de energia, mas após sua liberação pela mitocôndria no citoplasma da célula, participa da ativação da caspase-9 (Reed, 1997). As caspases iniciadoras 8 e 9 ativam a caspase 3 executora, e, durante a fase de degradação, a caspase-3 pode induzir alterações tanto na superfície celular quanto no núcleo (Reed, 1997; Green e Reed, 1998; Susin *et al.*, 1999; Martin *et al.*, 2007). Dessa forma, a dissipação do potencial de membrana mitocondrial com ativação da via das caspases leva ao aumento da permeabilidade da membrana e, conseqüentemente, a morte celular (Martin *et al.*, 2007).

2.3. Meios crioprotetores

Crioprotetores são agentes que proporcionam, interinamente, energia, proteção aos danos ocasionados por baixas temperaturas e conservação do ambiente favorável à sobrevivência da célula armazenada (Purdy, 2006a).

A descoberta dos agentes crioprotetores proporcionou novos entendimentos sobre a física do congelamento de células vivas e, com o intuito de reduzir os danos causados a elas durante o processo de criopreservação, diversas substâncias foram estudadas e mostraram-se eficientes. Entre elas estão diluentes a base de citrato-açúcar, de lactose, de sacarose, de rifina, de Tris, entre outros (Salamon e Maxwell, 2000; Medeiros *et al.*, 2002; Benson *et al.*, 2012). E atualmente, duas formulações básicas de meios para a criopreservação de sêmen humano vem sendo mais utilizadas, sendo o meio com glicerol e o meio com gema de ovo de galinha (Reed *et al.*, 2009).

Os crioprotetores são amplamente utilizados no congelamento de sêmen das mais variadas espécies. O congelamento de sêmen humano começou há mais de meio século, após a primeira gravidez ter sido consumada por inseminação com espermatozoides congelados. O procedimento de criopreservação de sêmen humano se tornou permitido e relevante na medicina reprodutiva quando o uso de glicerol suplementado com gema de ovo foi descoberto, em conjunto com a técnica de congelamento de vapor de nitrogênio líquido (Bunge e Sherman, 1953; Graham *et al.*, 1972; Larson *et al.*, 1997; Jeyendran *et al.*, 2008).

O glicerol é um álcool orgânico que começou a ser usado na criopreservação de células e micro-organismos na década de 50 (Polge *et al.*, 1949; Benson *et al.*, 2012). Em espermatozoides, o glicerol se liga aos PL presentes na cabeça espermática, e reduz a fluidez da membrana, pois interage com ligações proteicas e glicoproteicas, o que interfere no reconhecimento dos receptores da zona pelúcida e, portanto, na capacidade fertilizante do espermatozoide. Apesar de efeito tóxico serem relatados, o glicerol ainda é um dos

crioprotetores utilizados para o sêmen humano (Parks e Graham, 1992; Alvarenga *et al.*, 2000; Benson *et al.*, 2012).

Além do glicerol, a gema do ovo também é utilizada nos diluidores para o congelamento de sêmen humano e de outros animais (Salamon e Maxwell, 1995; Bergeron e Manjunath, 2006; Del Valle *et al.*, 2012), sendo que os principais elementos responsáveis por sua ação crioprotetora são as PCs e as lipoproteínas (Mutalik *et al.*, 2014; Axner e Lagerson, 2016). A ação crioprotetora conferida pela gema de ovo é eficiente, visto que fornece proteção a membrana espermática contra danos celulares causados por baixa temperatura e auxílio na reposição dos lipídios perdidos durante o processo, aumentando a criotolerância do espermatozoide em várias espécies de mamíferos (Benson *et al.*, 2012; Mutalik *et al.*, 2014; Axner e Lagerson, 2016).

Embora o uso da gema de ovo tenha revolucionado a criopreservação de espermatozoides humanos e tornado o procedimento quase rotineiro, o diluente é de origem animal, de composição química indefinida, não estando totalmente isento de veicular micro-organismo e contribuir para a transmissão de doenças infecciosas como a gripe aviária, encefalopatia espongiforme bovina e outras doenças desconhecidas, mas igualmente infecciosas (Ricker *et al.*, 2006; Jeyendran *et al.*, 2008).

Então, para solucionar este problema, tentou-se substituir a gema de ovo por lipoproteínas e PL de origem não animal para criopreservação de sêmen humano e de outras espécies (Aires *et al.*, 2003; Jeyendran *et al.*, 2008).

Entre os aditivos avaliados estava a lecitina de soja, que se mostrou um potencial crioprotetor para substituição da gema de ovo em diluentes utilizados para a criopreservação de espermatozoides humanos (Jeyendran *et al.*, 2008; Reed *et al.*, 2009; Mutalik *et al.*, 2014; Vireque *et al.*, 2016), bovinos (Bousseau *et al.*, 1998; Aires *et al.*, 2003; Kumar *et al.*, 2015),

equinos (Ricker *et al.*, 2006), ovinos (Del Valle *et al.*, 2012; Khalifa *et al.*, 2013), caninos (Axner e Lagerson, 2016) e caprinos (Chelucci *et al.*, 2015).

Em termos de biossegurança, a lecitina de soja pode ser considerada superior à gema de ovo (Bousseau *et al.*, 1998) e seu uso foi descrito há poucos anos para o congelamento de sêmen humano (Reed *et al.*, 2009). Além disso, há anos, vem sendo relatado que a lecitina não tem efeito citotóxico e nenhum efeito negativo na motilidade espermática (Hong *et al.*, 1986; Fiume, 2001). Em trabalho pioneiro desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa (Vireque *et al.*, 2016; Reis *et al.*, 2013 – Patente nº BR1020130192139), mostrou que o uso da PC isolada, principal constituinte da lecitina de soja, é extremamente eficaz na preservação da motilidade total (T) e PR de espermatozoides humanos. No entanto, a eficiência da PC purificada da soja como diluente aditivo foi considerada fraca em preservar a função mitocondrial da célula espermática durante a criopreservação, o que pode estar associado à ausência da ação dos antioxidantes quando comparada com a gema do ovo (Del Valle *et al.*, 2012; Vireque *et al.*, 2016).

Com todas as objeções das formulações já estudadas, foi proposto um novo meio de criopreservação para sêmen humano neste estudo, delineado pela empresa Invitra Tecnologia da Reprodução Assistida, chamado ANTIOX-PC. Esse meio é co-suplementado com PC de alta pureza obtida da soja e antioxidante LAC, além de outros constituintes da formulação base.

Tem sido sugerido que o mecanismo de proteção da lecitina de soja aconteça pela substituição dos PL da membrana pela PC presente no meio, que forma uma película protetora ao redor do espermatozoide, evitando assim, a formação de cristais de gelos intracelulares e danos mecânicos na membrana espermática. A capacidade dessas células em capturar lipídios e ácidos graxos do meio circundante revela a importância da suplementação lipídica e a reposição do colesterol, uma vez que os lipídios acrescentados se associam fortemente à

membrana do espermatozoide durante a criopreservação, recuperando a perda de PL decorrente do congelamento, a fluidez da membrana e a viabilidade celular (Ricker *et al.*, 2006; Mutalik *et al.*, 2014; Chelucci *et al.*, 2015; Vireque *et al.*, 2016).

A L-acetil-carnitina (LAC) e L-carnitina (LC) são antioxidantes usados na terapêutica de homens com parâmetros seminais alterados, pois as carnitinas tem como função remover o excesso tóxico de acetil-CoA intracelular, protegendo os espermatozoides dos danos oxidativos (Lenzi *et al.*, 2004; Balercia *et al.*, 2005; Sigman *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2007). Alguns estudos mostraram que homens com oligoastenozoospermia e astenozoospermia idiopática, que foram tratados com os antioxidantes citados anteriormente, melhoraram os parâmetros de qualidade do sêmen e taxa de gravidez (Lenzi *et al.*, 2004; Balercia *et al.*, 2005; Sigman *et al.*, 2006). Além disso, a LC tem um papel fundamental na produção de energia celular, atuando como um lançador dos ácidos graxos de cadeia longa ativados (acil-CoA) na mitocôndria, onde ocorre a β -oxidação (Jeulin e Lewin, 1996; Balercia *et al.*, 2005). Após a β -oxidação ocorre a produção de acetil-CoA e, durante sua passagem pelas membranas celulares, o grupo acetil é temporariamente transferido para LC, produzindo a forma bioativa LAC, que afeta positivamente a maturação e motilidade espermática (Lenzi *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2007). Frente a essas peculiaridades relacionadas aos mecanismos e funções, a LC e a LAC, têm sido utilizadas em tratamentos de homens com parâmetros seminais alterados (Jeulin e Lewin, 1996; Lenzi *et al.*, 2004; Balercia *et al.*, 2005; Sigman *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2007).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo principal

Comparar se o meio proposto (ANTIOX-PC) é não inferior ao crioprotetor convencional (TYB).

3.2. Objetivos específicos

- Analisar a ação do meio ANTIOX-PC na motilidade PR espermática em relação ao meio TYB;
- Analisar a ação do meio ANTIOX-PC na fragmentação do DNA espermático em relação ao meio TYB.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Aspectos éticos

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP) e pela Comissão Nacional de Ética e Pesquisa (CONEP) (Anexos 1 e 2). Os participantes somente foram incluídos na pesquisa após assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido que foi lido e explicado por um dos pesquisadores envolvidos (Apêndice).

4.2. Desenho do estudo

Ensaio clínico controlado de não inferioridade com alocação aleatória de alíquotas do sêmen do mesmo indivíduo para dois grupos paralelos (split-body randomized controlled trial): estudo (ANTIOX-PC) e controle (TYB).

4.3. Participantes

Os voluntários para a pesquisa foram recrutados no Setor de Reprodução Humana do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP), onde se apresentaram para realização do espermograma, exame solicitado pelo médico como parte do protocolo assistencial de investigação da infertilidade conjugal. O recrutamento de pacientes foi realizado de fevereiro de 2016 a março de 2018.

Os critérios de elegibilidade dos voluntários foram homens com idade entre 18 e 49 anos, alfabetizados, que conseguiram realizar a coleta de sêmen por masturbação, com abstinência sexual prévia de dois a cinco dias. Após a coleta, analisou-se o sêmen de todos os

voluntários e foram incluídos no estudo aqueles que tiveram as amostras com volume seminal $\geq 1,5$ mL, concentração de espermatozoides $\geq 15 \times 10^6$ /mL e motilidade PR $< 32\%$.

Foram excluídos os pacientes encaminhados para acompanhamento de doenças não associadas com o tratamento de infertilidade.

4.4. Intervenções

A amostra de sêmen de todos os voluntários incluída nos dois grupos, estudo (ANTIOX-PC) e controle (TYB), passaram igualmente pelas mesmas intervenções, conforme descrito nos tópicos subsequentes.

4.4.1. Coleta do sêmen

A coleta foi realizada e analisada no Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia do HCFMRP-USP. Os participantes incluídos estavam de abstinência sexual de dois a cinco dias antes da coleta do sêmen. Logo após a coleta, o sêmen foi colocado em placa aquecida a temperatura de 37°C , para que ocorresse sua liquefação.

4.4.2. Espermograma

O espermograma foi realizado nas amostras de sêmen dos pacientes que consentiram a participação no estudo. Este exame, primeiramente solicitado pelo médico fertilista, foi realizado pelo biologista responsável do laboratório e apenas o volume restante, que normalmente seria descartado, foi encaminhado para a pesquisa e então avaliado pelo pesquisador participante quanto aos critérios de inclusão. Esta foi a primeira análise realizada nas amostras de sêmen dos pacientes incluídos no estudo, feita antes do congelamento e refeita após o descongelamento.

O espermograma foi dividido em duas etapas: análise macroscópica e microscópica.

Análise Macroscópica

- Liquefação: após a coleta, o frasco com a amostra foi colocado em placa aquecida a 37°C para verificar o tempo que levaria a se apresentar com aspecto líquido e homogêneo;
- Volume: após a liquefação, toda a amostra foi aspirada e medida por uma pipeta sorológica;
- Viscosidade: ao desprezar o sêmen após a avaliação do volume, a viscosidade da amostra foi analisada, sendo que essa deveria gotejar ou formar um filamento menor que 2 cm, caso fosse maior, a viscosidade era considerada aumentada.
- Cor: a cor do sêmen foi considerada normal quando se apresentou branco ou cinza opalescente.
- pH: foi determinado através de uma gota de sêmen colocada sobre a fita indicadora de pH que revelou a cor obtida, sendo comparada com a tabela de referência fornecida pelo fabricante.

Análise Microscópica

Foi realizada em um microscópio óptico com platina aquecida a 36,9°C. Além disso, antes de começar a análise microscópica, o sêmen foi muito bem homogeneizado para que a alíquota usada fosse representativa da amostra. Os parâmetros analisados foram:

- Motilidade: foi analisada através de uma alíquota de 5 µL de sêmen colocada sobre a câmara de Makler, de forma a obter uma distribuição homogênea dos espermatozoides, visualizada no aumento de 200 vezes. Fez-se a contagem de 100 espermatozoides classificando-os como progressivos, aqueles que se movem de forma linear, independente da velocidade; não progressivos, todos ou outros tipos de mobilidade com ausência de progressão; e imóveis, aqueles que não apresentam nenhum tipo movimento. Esta análise foi repetida em outra alíquota para a realização da média, caso as contagens não estivessem

equiparadas, uma terceira contagem era realizada. A soma da porcentagem de espermatozoides progressivos e não progressivos da amostra é chamada de motilidade T.

- **Concentração:** foi analisada através da câmara de Makler que fornece diretamente a concentração de espermatozoides em milhões/ml. A contagem foi feita em duplicata em duas diferentes linhas da câmara, obtendo-se uma média aritmética da contagem em milhões/ml, sendo que a diferença das duas não deveria ultrapassar 20%. Em pacientes oligozoospermicos severos, contou-se duas vezes todos os espermatozoides presentes na área quadriculada da câmara (100 quadrados) e dividiu-se o número obtido por 10. De acordo com o resultado, os pacientes são classificados em: normospermicos, quando for $\geq 15,0$ milhões sptz/ml; oligozoospermicos, quando for $< 15,0$ milhões sptz/ml; e azoospermicos, na ausência de espermatozoides na amostra. A concentração total de espermatozoides foi obtida multiplicando-se o valor da concentração pelo volume total do ejaculado.

- **Vitalidade:** a porcentagem de espermatozoides vivos foi analisada através da mistura de 5 μ L de sêmen com 5 μ L de solução de eosina em uma lâmina coberta com lamínula. A contagem de 100 espermatozoides foi realizada em microscópio de contraste de fase negativo, sob aumento de 400 vezes, classificando como vivos, os que não foram corados e mortos, para os que foram corados de rosa.

- **Morfologia:** foi analisada através de um esfregaço em lâmina com uma alíquota de 5 μ L do sêmen, corada com Panótipo Rápido e avaliada sob aumento de 1000 vezes com imersão em óleo. A contagem de 100 espermatozoides foi realizada, classificando-os como normais, quando não foi encontrado nenhum defeito na sua estrutura, ou anormais, quando apresentaram defeito em alguma das partes de acordo com os critérios de Krüger (Kruger *et al.*, 1988).

As amostras foram avaliadas de acordo com os protocolos usados pelo Laboratório de Andrologia do Setor de Reprodução Humana do HCFMRP-USP e os valores de referência

utilizados foram os indicados pela 5ª Edição do Manual da Organização Mundial de Saúde, de acordo com a Tabela 1 (WHO, 2010).

Tabela 1. Valores de referência para os parâmetros seminais macroscópicos e microscópicos.

Parâmetros	Valor de referência
pH	≥ 7.2
Volume seminal (mL)	1.5 (1.4–1.7)
Vitalidade (% espermatozoides vivos)	58 (55–63)
Motilidade PR (% PR)	32 (31–34)
Motilidade T (% PR + NP)	40 (38–42)
Concentração (10^6 /mL)	15 (12–16)
Concentração total (10^6 /ejaculado)	39 (33–46)
Morfologia (% formas normais)	4 (3.0–4.0)

Fonte: Adaptado WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen - Fifth Edition (WHO, 2010). PR = progressivos; NP = não progressivos.

4.4.3. Congelamento

O tempo máximo entre a coleta e a criopreservação do sêmen foi de até 90 minutos, incluindo o tempo necessário para que ocorresse a liquefação (15 - 60 minutos), e o tempo da análise seminal. Após esta etapa, a amostra foi homogeneizada e alíquotas de 500 μ L de sêmen foram colocadas em dois criotubos de 1,5 mL, contendo a identificação do paciente correspondente e numerados como 1 e 2. Em seguida, a lista de alocação aleatória foi consultada, de forma cega, na qual constava qual meio de congelamento seria randomizado em cada criotubo: ANTIOX-PC ou TYB. Os meios crioprotetores foram colocados na proporção de 1:1 (sêmen: meio) e pipetados lentamente, com rotações da ponteira ao redor do

criotubo para homogeneização do material com o meio de congelamento, totalizando um volume final de 1000 μL . Em seguida, retirou-se uma alíquota de 500 μL de cada criotubo, 1 e 2, já contendo sêmen e o respectivo meio de congelamento, que foi colocado em outros dois criotubos, igualmente numerados, que foram congelados com a finalidade de reserva.

Antes de começar o congelamento, todos os criotubos foram acondicionados em um suporte adequado, colocados em béquer contendo água gelada e levados à geladeira durante 30 minutos. Ao serem retirados, os criotubos foram colocados em um suporte adaptado na tampa de uma caixa térmica com nitrogênio líquido, mantendo uma distância de cinco cm entre o suporte e a superfície do nitrogênio, onde ficaram expostos ao vapor durante dez minutos. Por fim, foram mergulhados no nitrogênio líquido, transferidos para uma rack metálica devidamente identificada com os dados do paciente e armazenados em container de nitrogênio líquido a -196°C . As amostras ficaram congeladas por um período mínimo de 30 dias.

4.4.4. Descongelamento

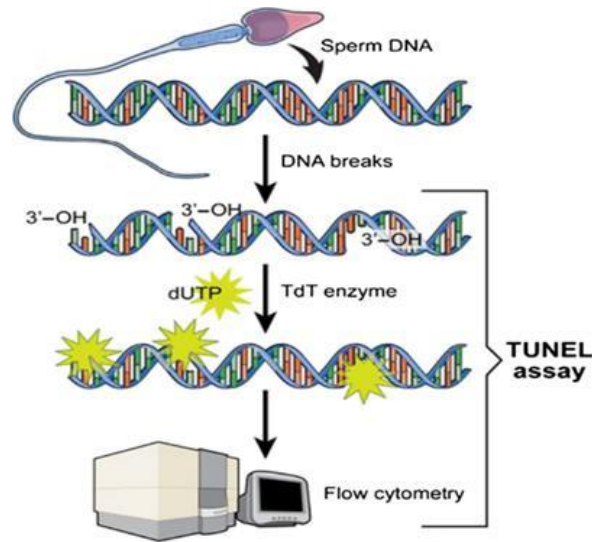
No descongelamento, colocou-se nitrogênio líquido dentro de uma caixa térmica para recolher somente os criotubos que seriam descongelados (um criotubo 1 e um criotubo 2) e os demais ficaram mantidos congelados dentro do container de nitrogênio. Os criotubos foram retirados um por vez para o descongelamento e permaneceu em temperatura ambiente durante 30 minutos. Primeiramente retirou-se o criotubo 1 e, após o descongelamento, retirou-se o criotubo 2, que também foi analisado ao descongelar.

4.4.5. Análise da fragmentação do DNA

A técnica de TUNEL é uma análise com determinada sensibilidade e precisão que detecta e quantifica danos endógenos no DNA durante a apoptose (Young *et al.*, 2003) através do *In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein* (Roche Diagnostics, USA). Neste estudo, a técnica de TUNEL foi realizada nas amostras a fresco e pós descongelamento dos dois meios de criopreservação, ANTIOX-PC e TYB.

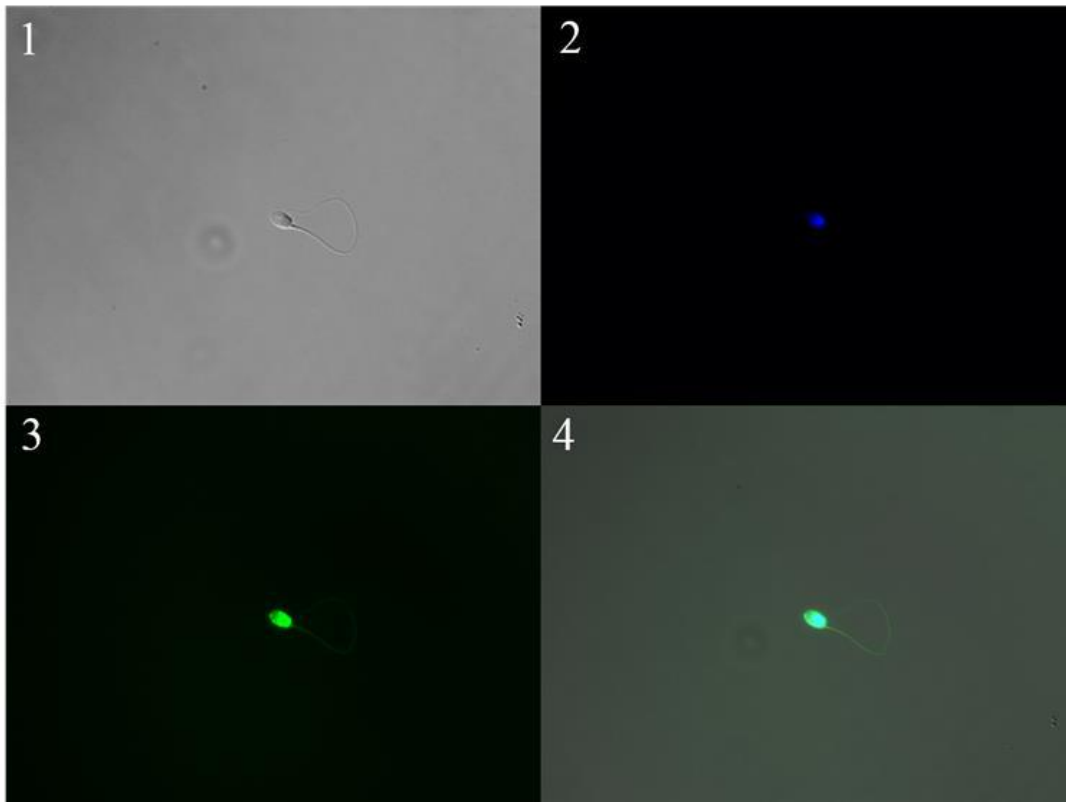
O fundamento deste método baseia-se na inserção de nucleotídeos (d-UTP= 2'-desoxiuridina 5' trifosfato) sinalizados com um corante fluorescente chamado Isotiocianato Fluoresceína (FITC) na região livre 3'OH, tanto em fita simples como em fita dupla, quando ocorre a clivagem do DNA. Essa marcação é catalisada pela enzima conhecida como *terminal desoxynucleotidyl transferase* (TdT) que polimeriza os nucleotídeos inseridos nas regiões de fragmentação do DNA. Após a reação de polimerização, a incorporação de d-UTP fluoresceína em polímeros de nucleotídeos é amplificada por várias reações enzimáticas secundárias e mensurada por microscopia de fluorescência (Figura 1). Os espermatozoides com danos no DNA foram considerados como TUNEL positivo (coloração verde - FITC) e os não corados como TUNEL negativo, como apresentados na figura 2.

Figura 1. Diagrama esquemático do ensaio TUNEL para marcação de danos no DNA espermático.



Fonte: Malvezzi *et al.* (2014)

Figura 2. Imagem por microscopia eletrônica de fluorescência do ensaio de TUNEL.



Análise da fragmentação do DNA pelo método de TUNEL em espermatozoides humanos. Imagens da mesma amostra de sêmen sob aumento de 1000X em microscópio de fluorescência. (1) Espermatozoide em campo claro; (2) espermatozoide corado com o DAPI (contra-corante nuclear); (3) espermatozoide corado em verde com FITC (DNA fragmentado – TUNEL).

Para a análise da fragmentação do DNA procedeu-se ao preparo do material e das lâminas conforme descrito a seguir. Primeiramente, uma alíquota de 500 μ L de sêmen a fresco foi retirada e colocada em tubo cônico de 15 mL para três lavagens consecutivas. A primeira lavagem foi feita com 1 mL do meio *Human Tubal Fluid* (HTF) (Irvine Scientific, CA, EUA) suplementado a 10% com Soro Substituto Sintético (SSS) (Irvine Scientific) e centrifugada a 3000 rpm, durante 5 minutos, a 25°C; as duas últimas lavagens foram feitas com 3 mL de solução tampão fosfato salino (PBS) 1X (Sigma-Aldrich, MO, EUA), centrifugadas a 3000 rpm, durante 10 minutos, a 25°C. Ao retirar o sobrenadante das duas primeiras lavagens, o pellet foi resuspendido e homogeneizado com o PBS 1X para a próxima centrifugação, enquanto na última foi retirado o sobrenadante e o pellet resuspendido com um volume de PBS 1X de acordo com a concentração espermática. Após a terceira lavagem, foi feito um esfregaço em lâmina com uma alíquota homogeneizada de 20 μ L e visualizado em microscópio sob aumento de 400x para verificar a concentração. Caso o espaçamento entre os espermatozoides estivesse ideal para a realização da técnica, era marcada a região da lâmina onde seria realizada a reação e colocada para secar a temperatura ambiente. Duas lâminas de cada amostra foram preparadas (uso para uso e outra de reserva) e devidamente identificadas com o número correspondente do paciente.

Para fixação do material, após a secagem, as lâminas foram imersas em um frasco com Metanol 80% (LS Chemicals, Índia) durante 20 minutos no congelador, colocadas novamente à temperatura ambiente e guardadas até que a reação de fragmentação do DNA fosse efetuada. A reação de TUNEL foi feita periodicamente em baterias de sete lâminas, sendo um controle positivo e seis para análise. O controle positivo era preparado em todas as reações e da mesma forma que as demais: uma alíquota pequena de sêmen era incubada por aproximadamente cinco horas com solução de água oxigenada, para fragmentar o DNA dos

espermatozoides presentes na amostra, e em seguida era realizada as centrifugações para que a lâmina controle positivo fosse preparada.

No momento da reação de TUNEL foi preparada a solução de permeabilização, Triton X 100 (Sigma-Aldrich) a 0,01% e PBS 1X, sendo homogeneizada em agitador até dissolver todo o conteúdo. Cada uma das lâminas foi organizada em cima de um gelox envolto com plástico e coberta com 500 μ L da solução permeabilizante sobre a região demarcada, que ficou reagindo por dois minutos. Passado o tempo, as lâminas foram ajustadas com solução tampão PBS 1X e colocadas em temperatura ambiente para secagem. Para a reação do TUNEL, foi utilizado o *In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein* (Roche Diagnostics, Suíça).

Em um micro tubo de 1,5 mL foi preparado uma mistura de 200 μ L com os reagentes do *kit*, sendo 10 μ L de *Enzyme Solution*, que contém o TdT; 90 μ L de *Label Solution*, que tem a mistura de nucleotídeos; e 100 μ L de PBS 1X. Foram aplicados 27 μ L da mistura de nucleotídeos em cada lâmina, colocadas em uma câmara úmida protegida da luz e levadas à estufa a 37°C durante uma hora, para que ocorresse a marcação das fitas de DNA fragmentadas. As reações foram interrompidas no momento em que as lâminas foram lavadas em PBS 1X até as lamínulas caírem no frasco, colocando-as em temperatura ambiente para secagem.

Por fim, para inibir a fotodegradação de corantes fluorescentes, foi pipetado cerca de 8 μ L de *VECTASHIELD Antifade Mounting Medium with DAPI* (Vector Laboratories, CA, EUA) sobre a região marcada de cada lâmina, cobertas com lamínula, seladas com esmalte, guardadas em uma câmara escura e analisadas logo após a reação.

As amostras foram analisadas através do Microscópio Invertido de Fluorescência Leica DMI 6000B (Leica Microsystems, Alemanha) e a contagem de 100 espermatozoides foi feita por duas vezes e em campos diferentes (Delbes *et al.*, 2013; Fortunato *et al.*, 2013;

Berteli *et al.*, 2017), sendo TUNEL positivo as células espermáticas coradas em verde. O IFD foi dado pelo percentual de fragmentação normal (<20%), moderada (de 20 a 30%) ou alta (>30%).

4.5. Tamanho da amostra

O cálculo do tamanho da amostra foi realizado através de um software online (<https://www.sealedenvelope.com/power/continuous-noninferior/>), utilizando critério de não inferioridade. Determinou-se que seria necessário avaliar 63 casos por grupo para ter uma segurança de 80% que, caso não se observasse diferença significativa entre os grupos, o crioprotetor ANTIOX-PC não causaria uma redução maior que 0,5 desvios padrões nos parâmetros avaliados quando comparado com o crioprotetor TYB. No entanto, ao final da pesquisa, a amostra foi de 58 voluntários.

4.6. Randomização

4.6.1. Geração de sequência

A geração da sequência de alocação aleatória foi através do site *QuickCalcs - GraphPad Software*, que criou uma lista de duas colunas (1 e 2) atribuídas aleatoriamente ao tipo de meio que cada amostra iria receber (ANTIOX-PC e TYB).

4.6.2. Alocação

Após a realização do espermograma e da seleção da amostra para a pesquisa, o sêmen do mesmo paciente foi dividido em duas alíquotas de 500 µL cada, em criotubos nomeados como 1 e 2, que receberam os respectivos meios de congelamento de acordo com a lista de alocação aleatória.

4.6.3. Implementação

A lista de alocação aleatória foi gerada pela pesquisadora participante que ficou responsável por consultá-la e destinar os meios ANTIOX-PC e TYB para as devidas amostras.

4.7. Mascaramento

A pesquisadora principal, que administrou as intervenções e avaliou os desfechos, foi cega para as atribuições de grupo. Porém não se obteve sucesso no mascaramento, pois o meio ANTIOX-PC apresentou micelas visíveis durante o espermograma, o que revelava o meio crioprotetor que estava sendo analisado.

4.8. Métodos estatísticos

Foi realizada uma análise exploratória de dados através de medidas de posição central e de dispersão. O teste t pareado foi utilizado para comparar os grupos experimentais. Os testes foram implementados no programa SAS versão 9.3. As comparações entre os dois meios (ANTIOX-PC e TYB) e o sêmen fresco foi realizada através de contrastes ortogonais utilizando o modelo de regressão linear de efeitos mistos. Este modelo foi implementado no programa SAS versão 9.3 considerando o PROC MIXED.

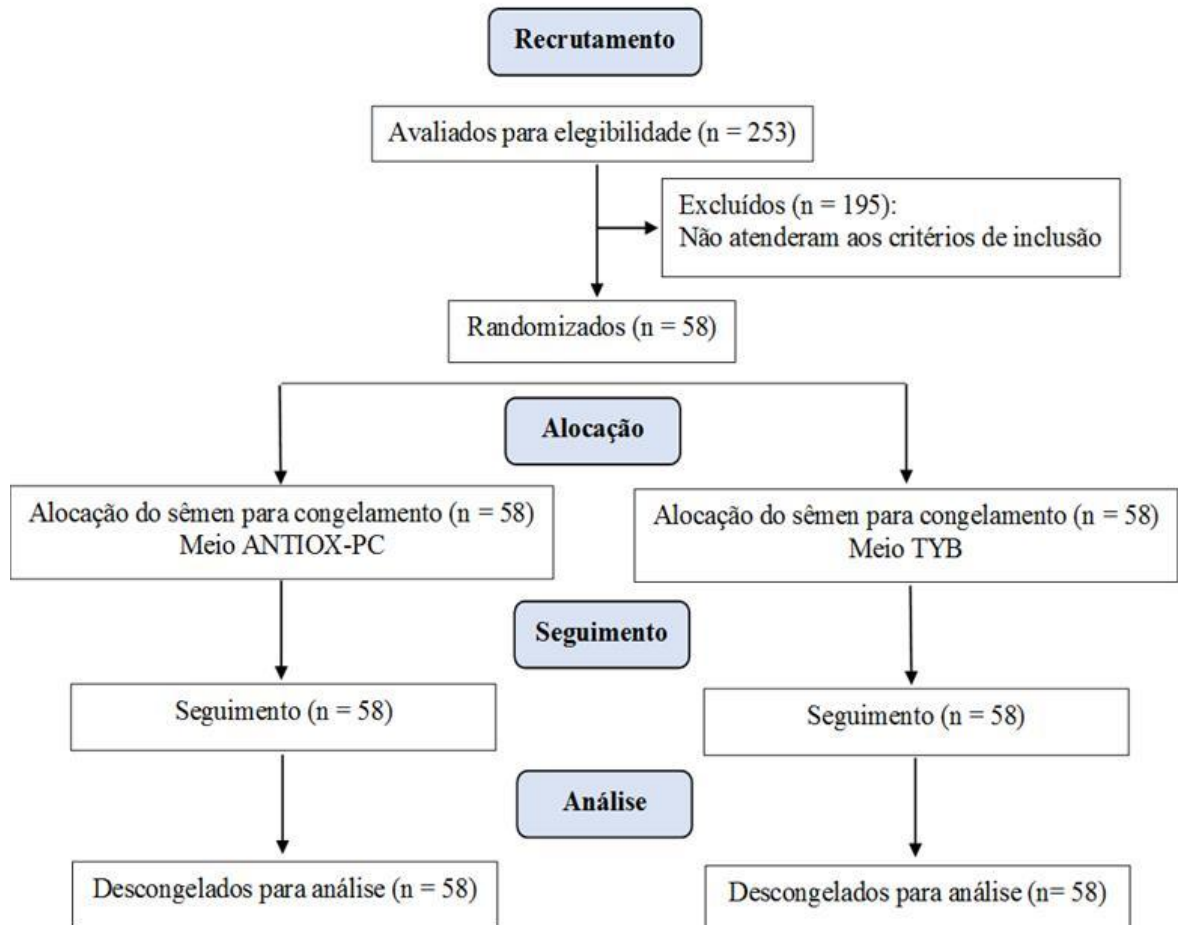
*R*esultados

5. RESULTADOS

5.1. Fluxo de participantes

Foram abordados para a pesquisa e avaliados para elegibilidade 253 homens. Dentre eles, 195 foram excluídos por não atenderem os critérios de inclusão, sendo: 74 por oligozoospermia; 87 por normozoospermia; 22 por azoospermia; 11 por hipospermia; e um por criptozoospermia (ausência de espermatozoides no sêmen fresco e observados no sedimento após centrifugação). No total, 58 homens foram incluídos na pesquisa. As amostras foram randomizadas para dois grupos de congelamento, meio ANTIOX-PC e TYB, e descongeladas após um período mínimo de 30 dias. O número amostral proposto não foi alcançado, pois existiu a dificuldade na obtenção de pacientes com a anormalidade na motilidade PR e normalidade nos outros parâmetros. Não houve desistência de voluntários (Figura 3).

Figura 3. Fluxograma do estudo descrevendo as etapas de recrutamento dos voluntários, alocação das amostras de sêmen nos grupos experimentais, seguimento e análise dos dados.



5.2. Base de dados

Na tabela 2 encontram-se sumarizadas as características clínicas dos 58 participantes da pesquisa: idade no dia da inclusão, tempo de abstinência ejaculatória, parâmetros seminais macroscópicos como volume do ejaculado e pH e o tempo de congelamento das amostras.

Tabela 2. Medidas de posição central e dispersão das características clínicas dos 58 voluntários.

Variável	N	Média	DP	Mediana	Q1	Q3	Min	Max
Idade	58	33,50	5,84	34,50	30	38	20	45
Abstinência	58	3,97	1,12	4	3	5	2	5
Volume	58	2,94	0,91	2,90	2,2	3,4	1,5	5,2
pH	58	8,41	0,39	8,5	8	8,5	7,5	9
Tempo	58	63,19	63,41	36	32	44	30	214

N: número amostral; DP: desvio padrão; Q1: primeiro quartil; Q3: terceiro quartil; Min: mínimo; Max: máximo.

Na Tabela 3 estão apresentadas as medidas de posição central e dispersão dos parâmetros seminais microscópicos (concentração, concentração total, motilidade PR, motilidade não progressiva (NP), imotilidade, motilidade T, morfologia e vitalidade) e IFD espermático das 58 amostras de sêmen fresco.

Tabela 3. Medidas de posição central e dispersão dos parâmetros seminais microscópicos analisados nas amostras de sêmen fresco dos 58 voluntários.

Parâmetros (F)	N	Média	DP	Mediana	Q1	Q3	Min	Max
Concentração (x10 ⁶ /ml)	58	57,61	40,37	50,00	24,00	74,50	15,00	193,00
Concentração T (milhões)	58	163,37	120,34	131,45	85,00	219,00	23,25	645,00
Motilidade PR (%)	58	17,88	8,46	20,00	12,00	25,00	2,00	30,00
Motilidade NP (%)	58	43,45	12,09	44,00	35,00	52,00	14,00	65,00
Imotilidade (%)	58	38,67	16,34	35,00	25,00	52,00	15,00	81,00
Motilidade T (%)	58	61,33	16,34	65,00	48,00	75,00	19,00	85,00
Morfologia (%)	58	2,33	1,68	2,00	1,00	3,00	0	9,00

Vitalidade (%)	58	76,55	11,92	80,00	73,00	83,00	32,00	92,00
IFD (%)	58	9,03	7,69	6,50	4,00	13,00	0	42,00

(F): sêmen fresco; N: número amostral; DP: desvio padrão; Q1: primeiro quartil; Q3: terceiro quartil; Min: mínimo; Max: máximo; Concentração T: concentração total; PR: progressivo; NP: não progressivo; Motilidade T: motilidade total (PR+NP); IFD: índice de fragmentação do DNA.

Na Tabela 4 estão apresentadas as medidas de posição central e dispersão dos parâmetros seminais microscópicos (concentração, concentração total, motilidade PR, motilidade NP, imotilidade, motilidade T, morfologia, vitalidade) e IFD espermático das 58 amostras de sêmen congeladas com o meio ANTIOX-PC, após o descongelamento.

Tabela 4. Medidas de posição central e dispersão dos parâmetros seminais microscópicos das amostras dos 58 voluntários congeladas com o meio crioprotetor ANTIOX-PC, após o descongelamento.

Parâmetros (A)	N	Média	DP	Mediana	Q1	Q3	Min	Max
Concentração (x10 ⁶ /ml)	58	13,88	12,90	11,00	6,50	15,00	1,10	63,00
Concentração T (milhões)	58	6,94	6,45	5,50	3,25	7,50	0,55	31,50
Motilidade PR (%)	58	12,40	11,49	9,00	2,00	20,00	0	39,00
Motilidade NP (%)	58	30,97	18,46	33,00	16,00	46,00	2,00	68,00
Imotilidade (%)	58	56,64	26,77	51,50	34,00	82,00	19,00	98,00
Motilidade T (%)	58	43,36	26,77	48,50	18,00	66,00	2,00	81,00
Morfologia (%)	58	2,29	1,75	2,00	1,00	3,00	0	9,00
Vitalidade (%)	58	48,71	26,26	58,00	23,00	71,00	4,00	87,00
IFD (%)	58	13,33	10,74	9,50	6,00	18,00	1,00	57,00

(A): sêmen congelado com o meio ANTIOX-PC; N: número amostral; DP: desvio padrão; Q1: primeiro quartil; Q3: terceiro quartil; Min: mínimo; Max: máximo; Concentração T: concentração total; PR: progressivo; NP: não progressivo; Motilidade T: motilidade total (PR+NP); IFD: índice de fragmentação do DNA.

Na Tabela 5 estão apresentadas as medidas de posição central e dispersão dos parâmetros seminais microscópicos (concentração, concentração total, motilidade PR, motilidade NP, imotilidade, motilidade T, morfologia e vitalidade) e o IFD espermático das 58 amostras de sêmen congeladas com o meio TYB, após o descongelamento.

Tabela 5. Medidas de posição central e dispersão dos parâmetros seminais microscópicos das amostras dos 58 voluntários congeladas com o meio crioprotetor TYB, após o descongelamento.

Parâmetros (B)	N	Média	DP	Mediana	Q1	Q3	Min	Max
Concentração (x10 ⁶ /ml)	58	16,56	13,01	14,25	8,00	21,50	1,90	64,00
Concentração T (milhões)	58	8,28	6,50	7,13	4,00	10,75	0,95	32,00
Motilidade PR (%)	58	12,09	11,11	9,50	1,00	20,00	0	41,00
Motilidade NP (%)	58	22,71	13,84	26,00	9,00	34,00	1,00	46,00
Imotilidade (%)	58	65,00	23,00	57,50	44,00	89,00	29,00	99,00
Motilidade T (%)	58	34,79	22,86	42,50	11,00	55,00	1,00	71,00
Morfologia (%)	58	2,28	1,66	2,00	1,00	3,00	0	10,00
Vitalidade (%)	58	45,81	20,60	47,50	28,00	65,00	6,00	8,00
IFD (%)	58	15,83	11,04	13,00	8,00	21,00	3,00	49,00

(B): sêmen congelado com o meio TYB; N: número amostral; DP: desvio padrão; Q1: primeiro quartil; Q3: terceiro quartil; Min: mínimo; Max: máximo; Concentração T: concentração total; PR: progressivo; NP: não progressivo; Motilidade T: motilidade total (PR+NP); IFD: índice de fragmentação do DNA.

5.3. Desfechos e estimativas

Os dois desfechos primários, motilidade PR e o IFD espermático, analisados neste estudo não mostraram diferenças significativas entre os meios de criopreservação ANTIOX-PC e TYB (Tabela 6). Desta maneira, a nova formulação proposta neste estudo (ANTIOX-

PC) se mostrou não-inferior ao meio convencional (TYB) em relação a esses parâmetros. A motilidade PR dos espermatozoides congelados com o meio ANTIOX-PC apresentou uma média de $12,40 \pm 11,49$, enquanto a média obtida com o meio TYB foi de $12,09 \pm 11,11$, sendo a diferença entre as médias de 1,29 ($p = 0,78$).

As médias dos percentuais de espermatozoides com danos no DNA após os ciclos de congelamento-descongelamento nos meios ANTIOX-PC e TYB foram de $13,33 \pm 10,74$ % e $15,83 \pm 11,04$ %, respectivamente, sendo a diferença entre as médias de 2,5 ($p = 0,06$). A proporção de espermatozoides com DNA fragmentado (TUNEL+) quantificada no sêmen fresco e após o congelamento-descongelamento nos meios ANTIOX-PC e TYB dos 58 pacientes elegíveis para o estudo permitiu distinguir, na mesma amostra, espermatozoides com e sem danos no DNA. A marcação de TUNEL em espermatozoides obtidos das amostras de sêmen dos pacientes 22 e 27 e criopreservados nos meios ANTIOX-PC e TYB é mostrada nas figuras 4 a 7.

Tabela 6. Motilidade PR e IFD pós-congelamento de espermatozoides humanos criopreservados nos meios ANTIOX-PC e TYB.

Parâmetros	N	ANTIOX-PC		TYB		Diferença Médias	p
		Média	DP	Média	DP		
Motilidade PR (%)	58	12,40	11,49	12,09	11,11	1,29	0,7801
IFD (%)	58	13,33	10,74	15,83	11,04	-2,5	0,0633

N: número amostral; DP: desvio padrão; PR: progressivo; IFD: índice de fragmentação do DNA. Resultados considerados significativos quando $p < 0,05$.

Os outros parâmetros seminais microscópicos também foram analisados após o descongelamento. Houve diferença estatística significativa entre os grupos quanto à

motilidade NP, motilidade T e imotilidade. Os demais parâmetros não apresentaram diferenças entre os grupos (Tabela 7).

Tabela 7. Parâmetros funcionais de espermatozoides humanos congelados-descongelados nos meios crioprotetores ANTIOX-PC e TYB.

Parâmetros	N	ANTIOX-PC		TYB		Diferença Médias	p
		Média	DP	Média	DP		
Concentração (x10 ⁶ /ml)	58	13,88	12,90	16,56	13,01	-2,68	0,4245
Concentração T (milhões)	58	6,94	6,45	8,28	6,50	-1,34	0,9147
Motilidade NP (%)	58	30,97	18,46	22,71	13,84	8,26	<.0001
Imotilidade (%)	58	56,64	26,77	65,00	23,00	-8,36	0,0001
Motilidade T (%)	58	43,36	26,77	34,79	22,86	8,57	0,0001
Morfologia (%)	58	2,29	1,75	2,28	1,66	0,01	0,8479
Vitalidade (%)	58	48,71	26,26	45,81	20,60	2,9	0,2139

N: número amostral; DP: desvio padrão; Concentração T: concentração total; NP: não progressivo; Motilidade T: motilidade total (PR+NP). Resultados considerados significativos quando $p < 0,05$.

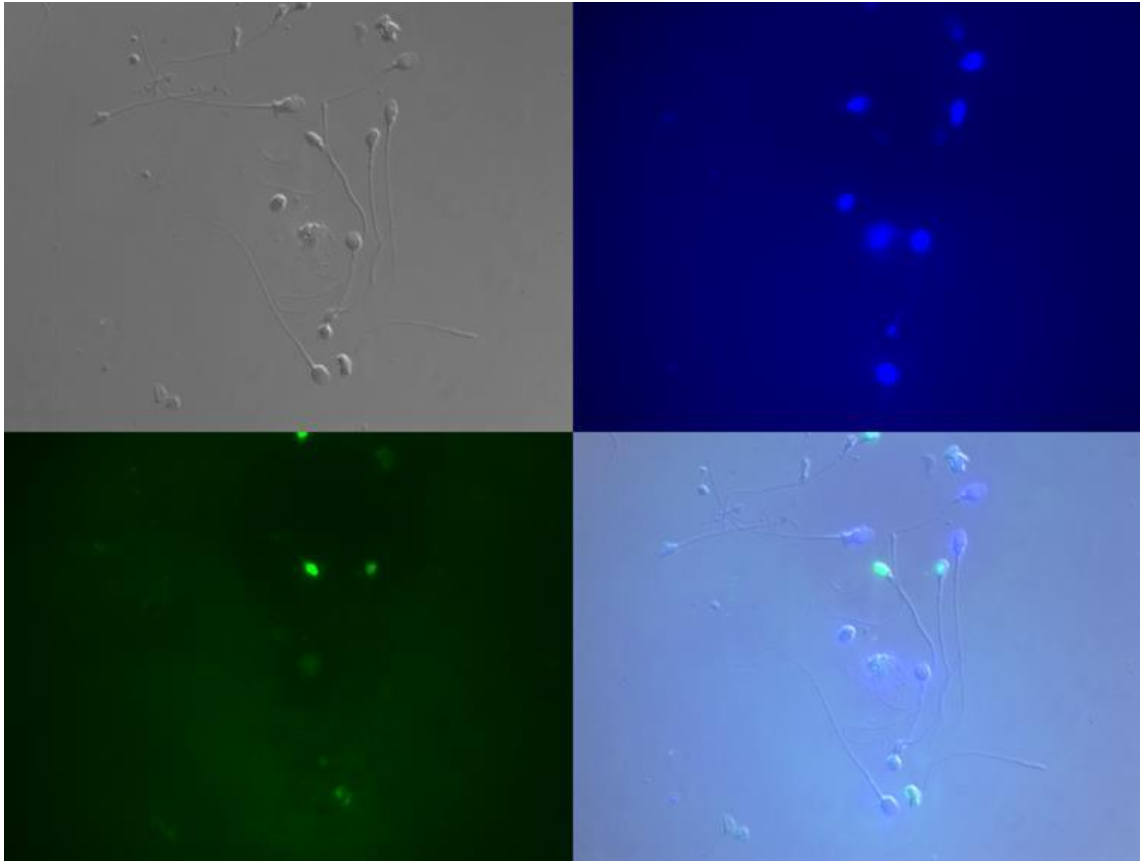
Todos os parâmetros seminais das amostras descongeladas (ANTIOX-PC e TYB) em comparação com os parâmetros da amostra a fresco mostraram diferença estatística significativa, com exceção da morfologia (Tabela 8).

Tabela 8. Comparações dos parâmetros funcionais de espermatozoides congelados-descongelados nos meios crioprotetores ANTIOX-PC e TYB com o sêmen fresco (F).

Parâmetros	N	ANTIOX-PC		TYB		FRESCO		<i>p</i> A x F	<i>p</i> B x F
		Média	DP	Média	DP	Média	DP		
Concentração (x10 ⁶ /ml)	58	13,88	12,90	16,56	13,01	57,61	40,37	<0,0001	<0,0001
Concentração T (milhões)	58	6,94	6,45	8,28	6,50	163,37	120,34	<0,0001	<0,0001
Motilidade PR (%)	58	12,40	11,49	12,09	11,11	17,88	8,46	<0,0001	<0,0001
Motilidade NP (%)	58	30,97	18,46	22,71	13,84	43,45	12,09	<0,0001	<0,0001
Imotilidade (%)	58	56,64	26,77	65,00	23,00	38,67	16,34	<0,0001	<0,0001
Motilidade T (%)	58	43,36	26,77	34,79	22,86	61,33	16,34	<0,0001	<0,0001
Morfologia (%)	58	2,29	1,75	2,28	1,66	2,33	1,68	0,7013	0,5652
Vitalidade (%)	58	48,71	26,26	45,81	20,60	76,55	11,92	<0,0001	<0,0001
IFD (%)	58	13,33	10,74	15,83	11,04	9,03	7,69	0,0017	<0,0001

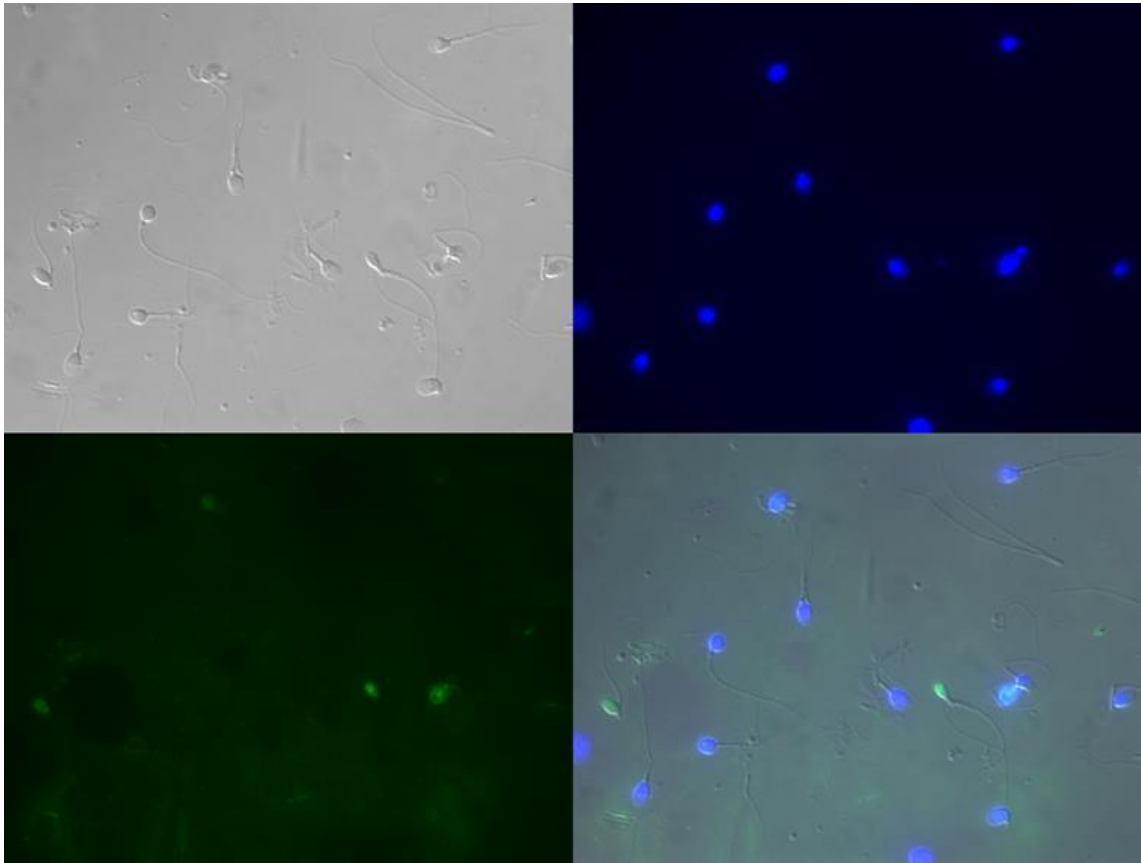
N: número amostral; DP: desvio padrão; PR: progressivo; Concentração T: concentração total; NP: não progressivo; Motilidade T: motilidade total (PR+NP); IFD: índice de fragmentação do DNA. Resultados considerados significativos quando $p < 0,05$.

Figura 4. Amostra de sêmen do paciente 22 após descongelamento com meio ANTIOX-PC.



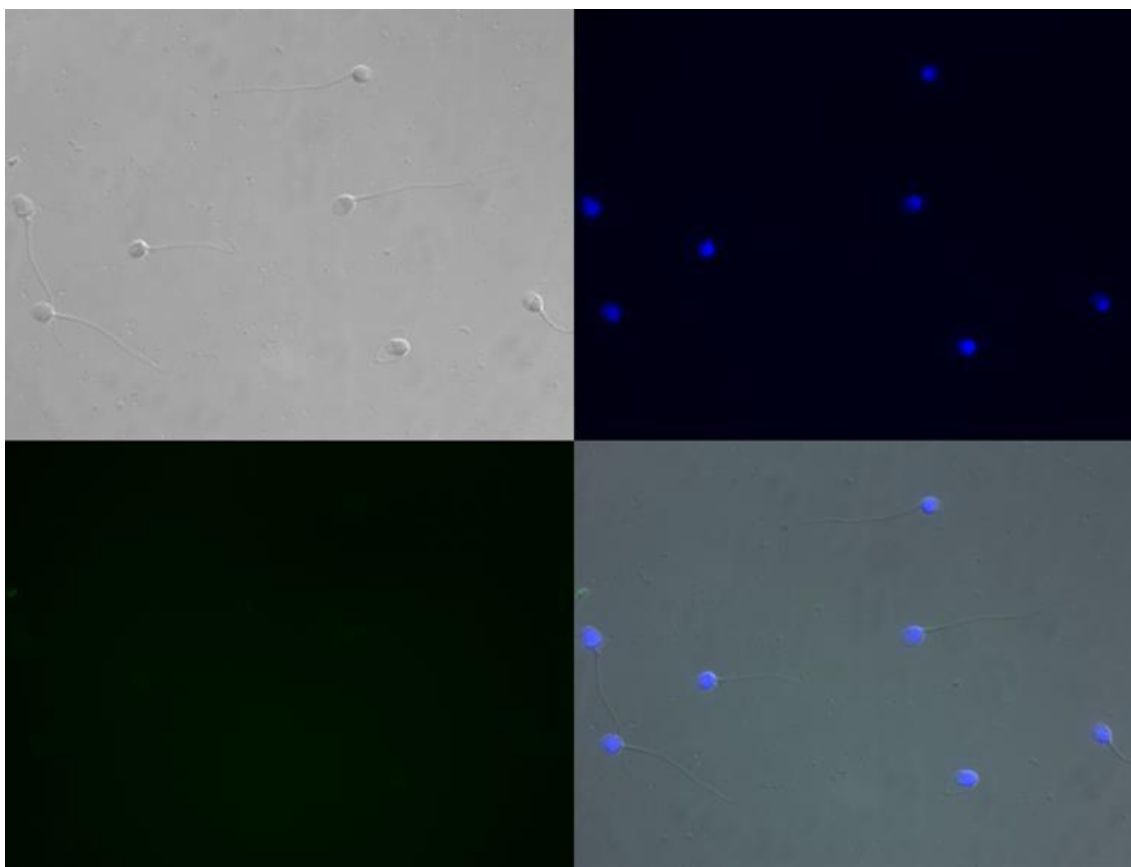
Figuras da mesma amostra de sêmen sob aumento de 1000X em microscópio de fluorescência. Imagem superior esquerda: espermatozoides inteiros em campo claro; Imagem superior direita: espermatozoides corados com o DAPI (contra-corante nuclear); Imagem inferior esquerda: espermatozoides corados em verde com FITC (DNA fragmentado - TUNEL positivo); Imagem inferior direita: sobreposição das imagens com o corante DAPI e FITC.

Figura 5. Amostra de sêmen do paciente 22 após descongelamento com meio TYB.



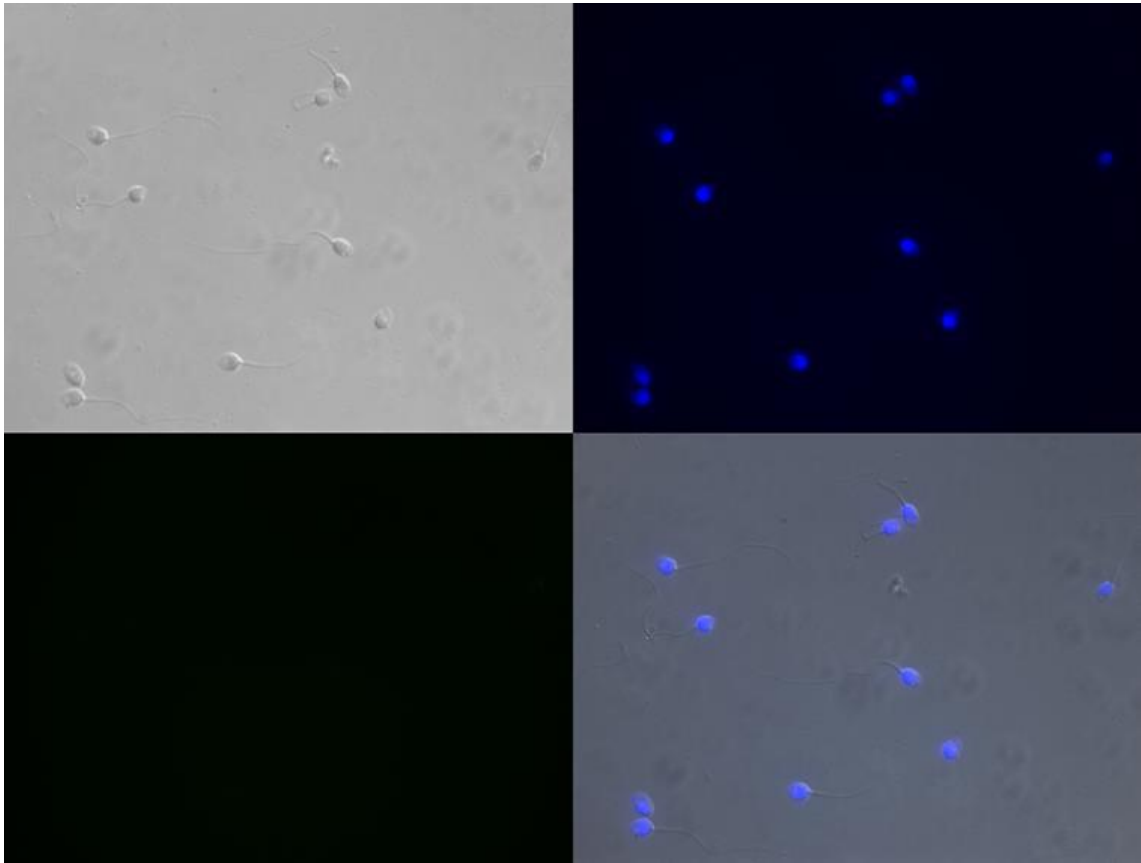
Figuras da mesma amostra de sêmen sob aumento de 1000X em microscópio de fluorescência. Imagem superior esquerda: espermatozoides inteiros em campo claro; Imagem superior direita: espermatozoides corados com o DAPI (contra-corante nuclear); Imagem inferior esquerda: espermatozoides corados em verde com FITC (DNA fragmentado - TUNEL positivo); Imagem inferior direita: sobreposição das imagens com o corante DAPI e FITC.

Figura 6. Amostra de sêmen do paciente 27 após descongelamento com meio ANTIOX-PC.



Figuras da mesma amostra de sêmen sob aumento de 1000X em microscópio de fluorescência. Imagem superior esquerda: espermatozoides inteiros em campo claro; Imagem superior direita: espermatozoides corados com o DAPI (contra-corante nuclear); Imagem inferior esquerda: espermatozoides corados em verde com FITC (TUNEL negativo); Imagem inferior direita: sobreposição das imagens com o corante DAPI e FITC.

Figura 7. Amostra de sêmen do paciente 27 após descongelamento com meio TYB.



Figuras da mesma amostra de sêmen sob aumento de 1000X em microscópio de fluorescência. Imagem superior esquerda: espermatozoides inteiros em campo claro; Imagem superior direita: espermatozoides corados com o DAPI (contra-corante nuclear); Imagem inferior esquerda: espermatozoides corados em verde com FITC (TUNEL negativo); Imagem inferior direita: sobreposição das imagens com o corante DAPI e FITC.

*D*iscussão

6. DISCUSSÃO

6.1. Limitações do estudo

Este estudo mostrou algumas limitações nos resultados de determinados parâmetros seminais microscópicos após o descongelamento quando comparados com a análise da amostra a fresco e entre os dois meios de criopreservação (ANTIOX-PC e TYB). A discordância observada na análise das amostras após o descongelamento em relação à amostra a fresco foi a concentração de espermatozoides em milhões/mL e a concentração total. Essa diferença era esperada, pois como a amostra foi diluída na proporção de 1:1 (500 µL de amostra: 500 µL de meio) para criopreservação, a quantidade de espermatozoides por ml se tornou menor. A concentração total apresentou uma queda ainda mais acentuada, pois para o seu cálculo foi feita a multiplicação da concentração em milhões/mL pelo volume da amostra, que foi padronizada em alíquotas de 500 µL.

A comparação dos parâmetros seminais e do IFD entre os meios de criopreservação ANTIOX-PC e TYB não mostrou discrepâncias. No entanto, a presença das micelas no meio ANTIOX-PC pode ter influenciado parâmetros importantes no momento da análise. Observou-se que a presença das micelas em escala superior a 50 µm dificultavam a leitura devido à sobreposição aos espermatozoides, além de revelar o meio que estava sendo analisado, impossibilitando o sucesso do mascaramento. A vitalidade espermática não apresentou diferença significativa entre o meio ANTIOX-PC e TYB após o descongelamento, no entanto, é um dos parâmetros que pode ter sido minimizado pelas micelas encontradas no meio ANTIOX-PC. O método utilizado para análise da vitalidade é a coloração da lâmina pela eosina, que deixa os espermatozoides mortos corados de rosa e os vivos sem coloração. Deste modo, a contagem dos espermatozoides mortos no meio crioprotetor ANTIOX-PC pode

ter sido sobrestimada no momento da leitura, pois os espermatozoides corados se destacavam com facilidade mesmo aqueles sobrepostos pelas micelas.

A motilidade PR foi a única que não apresentou diferença estatística, sendo que todas as outras motilidades apresentaram um resultado superior do meio ANTIOX-PC em relação ao meio TYB. Dentre elas estão: aumento na motilidade NP, aumento na motilidade T e diminuição dos espermatozoides imóveis. No entanto, é possível que a diminuição da imotilidade tenha se dado devido à ausência de movimento e dificuldade de visualização dos espermatozoides imóveis por detrás das micelas. Ainda assim, há a possibilidade de que esses parâmetros tenham realmente aumentado, pois foi observado o aumento da motilidade NP e, conseqüentemente, da motilidade T. Além disso, um estudo feito anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa (Vireque *et al.*, 2016) mostrou que a suplementação da PC de soja aumentou a taxa de espermatozoides NP quando comparado ao meio crioprotetor convencional a base de gema de ovo. Até esta etapa de desenvolvimento da pesquisa optou-se por manter a composição rica em micelas, já que os processos industriais de ultrafiltração e/ou homogeneização podem interferir na concentração final e nas características finais da formulação crioprotetora proposta.

6.2. Interpretação

No presente estudo, analisamos a eficácia crioprotetora de uma formulação sintética para o congelamento sêmen humano à base de PC obtida da soja (L α -fosfatidilcolina) e o antioxidante L-acetil-carnitina (ANTIOX-PC) em comparação com a formulação contendo gema de ovo (TYB), elegendo como desfechos primários a motilidade PR e IFD dos espermatozoides após o descongelamento. Também apresentamos dados referentes a esses dois meios de congelamento e suas fontes lipídicas sobre a motilidade NP, motilidade T, percentual de espermatozoides imóveis, morfologia e vitalidade. Os percentuais de

espermatozoides recuperados após o congelamento-descongelamento com motilidade PR (12,4% vs 12,09%) e com o DNA fragmentado (13,33% vs 15,83%) não evidenciaram diferenças significativas entre os meios ANTIOX-PC e TYB. Quanto ao parâmetro IFD, a ausência de significância pode ser decorrente do número amostral. É importante ressaltar que houve uma tendência ($p < 0,06$) na redução do IFD em espermatozoides criopreservados no meio ANTIOX-PC, observação que poderá ser confirmada ou refutada com o aumento da casuística, conforme previamente calculada.

Embora o número amostral não tenha sido alcançado neste ensaio clínico, o estudo apresenta um ineditismo por ter avaliado o impacto de dois meios crioprotetores com fontes lipídicas distintas em amostras obtidas de 58 voluntários astenozoospermicos. Ademais, a investigação do impacto de uma formulação crioprotetora sintética contendo suplementação antioxidante (ANTIOX-PC) na preservação da qualidade do sêmen de homens astenozoospermicos é igualmente inédita e pode potencialmente contribuir para o aprimoramento da criopreservação de amostras seminais de baixa qualidade na TRA, em bancos de sêmen e em programas de preservação de fertilidade. Os estudos identificados na literatura relativos ao congelamento de sêmen humano com lecitina soja ou PC em substituição à gema de ovo apresentam uma casuística de 20 a 28 pacientes (Reed *et al.*, 2009; Vireque *et al.*, 2016), com exceção de um estudo prévio conduzido pelo nosso grupo de pesquisa com casuística de 63 voluntários (Silva, 2017). Além disso, todos estes estudos foram realizados com sêmen de voluntários normospermicos.

Em estudo recente, Gomez-Torres *et al.* (2017) demonstraram que parâmetros funcionais como concentração, motilidade PR e vitalidade foram menos alterados após a criopreservação em amostras com parâmetros seminais normais do que em amostras com parâmetros seminais alterados, o que reforça a importância dos bons resultados obtidos em nosso estudo. Em concordância, outros estudos evidenciaram que o sêmen de baixa qualidade

tem maior vulnerabilidade a alterações induzidas pela criopreservação (Kalthur *et al.*, 2008; Mutalik *et al.*, 2014) e que é necessário determinar se o sêmen com parâmetros alterados têm resultados semelhantes às amostras normais (Mutalik *et al.*, 2014).

No entanto, resultados apresentados por Silva (2017) mostraram que amostras com parâmetros seminais normais tiveram resultados similares, com exceção da vitalidade que se mostrou inferior, quando comparados aos resultados apresentados neste estudo.

De forma geral, sabe-se que a criopreservação de espermatozoides é uma técnica importante que permite o armazenamento prolongado de células reprodutivas, tanto em pacientes normospérmicos quanto em pacientes com baixa qualidade do sêmen (Ozkavukcu *et al.*, 2008; Barbas e Mascarenhas, 2009; Thomson *et al.*, 2009; Benson *et al.*, 2012; Tiwari *et al.*, 2017). Porém, é bem estabelecido que esta técnica de conservação provoca danos aos espermatozoides (Thomson *et al.*, 2009; Zribi *et al.*, 2012; Nabi *et al.*, 2017; Tiwari *et al.*, 2017). A motilidade PR está entre os parâmetros mais intolerantes ao congelamento de sêmen normal (Gomez-Torres *et al.*, 2017; Nabi *et al.*, 2017) e de baixa qualidade (Gomez-Torres *et al.*, 2017), podendo ser um forte preditor da capacidade de fertilização da amostra em procedimentos de reprodução assistida (Donnelly *et al.*, 2001; Nabi *et al.*, 2017).

Os marcadores mais importantes da função espermática e da estabilidade genômica são, respectivamente, a motilidade dos espermatozoides (Nishijima *et al.*, 2015; Axner e Lagerson, 2016; Tiwari *et al.*, 2017) e a integridade do DNA espermático (Tiwari *et al.*, 2017). Com base em nossos resultados, a motilidade PR do sêmen criopreservado nos meios ANTIOX-PC e TYB após o descongelamento foi reduzida 30% quando comparada com a motilidade PR do sêmen a fresco. Como esperado, outros estudos também encontraram uma superioridade na motilidade PR do sêmen fresco em comparação com as amostras diluídas com crioprotetores após o descongelamento (Reed *et al.*, 2009; Vireque *et al.*, 2016). Analisando amostras de sêmen de pacientes normospérmicos, os estudos de Vireque *et al.*

(2016) e Silva (2017) relataram uma redução da motilidade PR de espermatozoides criopreservados de 61% e 73% em meios à base de PC e 45% e 73% com o meio TYB em comparação com sêmen fresco. Entretanto, Mutalik *et al.* (2014) observaram que um dos grupos testado depois da criopreservação, contendo colesterol e PC de soja, apresentou motilidade PR semelhante à amostra a fresco utilizando um número amostral de 28 pacientes.

A comparação da motilidade PR observada entre os meios crioprotetores ANTIOX-PC e TYB, após o descongelamento, não mostrou diferenças significativas. Portanto, podemos inferir que o meio crioprotetor ANTIOX-PC foi efetivo em preservar com a mesma eficiência do meio padrão-ouro TYB a motilidade PR de espermatozoides humanos após o descongelamento. Com um casuística de 11 pacientes Jeyendran *et al.* (2008) não identificaram diferenças na motilidade PR de espermatozoides humanos criopreservados em meio à base de lecitina de soja ou gema de ovo, mas é importante observar que o número amostral é insuficiente para uma conclusão mais definitiva. Em seu estudo comparativo de meios crioprotetores à base de lecitina ou gema de ovo, Reed *et al.* (2009) não analisaram como desfecho a motilidade PR, apenas a motilidade T. Reforçando nossos achados, Vireque *et al.* (2016) e Silva (2017) não detectaram diferença na motilidade PR das amostras congeladas com crioprotetores a base lecitina de soja ou PC em comparação com a gema de ovo em sêmen de homens normospermicos. Os resultados de Mutalik *et al.* (2014) mostraram que a motilidade PR foi maior nas amostras criopreservadas com meio à base de lipossoma (PC de soja + colesterol) em comparação àquelas criopreservadas com meio glicerol citrato de gema de ovo em uma casuística de 28 pacientes

Em nosso estudo, foi observado aumento na fragmentação do DNA espermático após o descongelamento. Porém, quando comparados os meios ANTIOX-PC e TYB, não houve diferença significativa em relação ao IFD, mesmo que o meio ANTIOX-PC tenha apresentado resultados ligeiramente melhores que o meio TYB. Acreditamos que ao completar o número

amostral proposto, será possível aferir de forma inequívoca se a ausência de significância foi influenciada pela casuística ou se corresponde de fato a performance do meio ANTIOX-PC em proteger a integridade da cromatina da célula espermática durante o congelamento. O estudo de Silva (2017) também mostrou que o IFD espermático foi inferior no sêmen fresco em relação às amostras descongeladas, e que o IFD foi similar entre os meios crioprotetores suplementados com PC e gema de ovo. Essa similaridade entre o IFD obtido após o descongelamento com os meios crioprotetores à base de gema de ovo e lecitina de soja também foi encontrada por Reed *et al* (2009), indicando que ambos forneceram a mesma proteção durante a criopreservação e o descongelamento. Chelucci *et al.* (2015) mostraram que a lecitina de soja além de ser considerada uma alternativa adequada para substituição dos meios de origem animal, também pode assegurar um menor IFD e maior taxa de fertilização na espécie em estudo.

Inversamente ao IFD espermático e a motilidade PR, que não apresentaram diferença significativa entre os meios ANTIOX-PC e TYB neste estudo, outros parâmetros mostraram-se superiores nas amostras criopreservadas com o meio ANTIOX-PC em comparação ao meio TYB, evidenciando que o crioprotetor avaliado pode ser uma boa alternativa para substituir o meio convencional. Os parâmetros otimizados no congelamento com o meio ANTIOX-PC foram a motilidade NP, a motilidade T e a imotilidade. Esses dados estão de acordo com os achados de Silva (2017), que obteve um aumento na motilidade NP e T e uma redução na imotilidade dos espermatozoides após o descongelamento com o meio ANTIOX-PC em comparação com o meio TYB.

Vireque *et al.* (2016), observaram um aumento na motilidade espermática NP em amostras tratadas com PC de soja isolada em comparação com aquelas tratadas com lipídeos da gema de ovo. O aumento do parâmetro motilidade NP em espermatozoides tratados com a espécie química de PC utilizada na formulação crioprotetora ANTIOX-PC tem sido

observado com atenção nos três trabalhos conduzidos pelo nosso grupo. A retenção de maiores índices de espermatozoides NP associada ao aumento na motilidade T pode estar associada a inibição prematura da reação acrossômica. No entanto, esta hipótese precisa ser melhor investigada. Em 2014, outros pesquisadores apresentaram resultados semelhantes aos nossos, com motilidade T maior nas amostras criopreservadas com lipossoma em comparação àquelas criopreservadas com meio à base de gema de ovo (Mutalik *et al.*, 2014).

No presente estudo, o único parâmetro que não apresentou diferença significativa entre as amostras congeladas e a fresco foi a morfologia. Embora não tenha sido feitas análises para aferir essa característica espermática, algumas amostras de sêmen congeladas nos dois meios apresentaram-se com bastante danos quando analisadas em campo claro através da microscopia de fluorescência, no momento da leitura do ensaio de TUNEL. As células espermáticas mostravam-se com as caudas enroladas e até mesmo rompidas.

Embora a gema de ovo seja o diluente comumente utilizado em espermatozoides de várias espécies (Benson *et al.*, 2012; Nishijima *et al.*, 2015), protocolos sem este aditivo vem sendo desenvolvidos (Bousseau *et al.*, 1998). Nenhum componente sintético ou quimicamente definido foi análogo à gema de ovo, com exceção da lecitina de soja, que apresentou uma recuperação comparativamente alta de espermatozoides (Bousseau *et al.*, 1998; Del Valle *et al.*, 2012; Nishijima *et al.*, 2015). Essa comparação pode existir pelo fato da lecitina de soja não ter efeito citotóxico (Fiume, 2001) e apresentar um mecanismo de proteção ideal, que pode formar uma película protetora ao redor do espermatozoide que impede dano mecânico nas membranas espermáticas decorrentes da criopreservação (Ricker *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2009; Chelucci *et al.*, 2015). Além do mais, as vantagens do uso de extratos fosfolipídicos quanto a questões sanitárias são indiscutíveis, pois reduz o risco potencial de contaminação microbiológica pela ausência de aditivos de origem animal (Aires *et al.*, 2003; Nishijima *et al.*, 2015).

Com base nos achados deste ensaio clínico com foco em parâmetros seminais (espermograma), fica evidente a eficácia desta nova formulação crioprotetora contendo a combinação inédita da PC obtida da soja e antioxidante LAC, que pode ser um ótimo substituto dos meios contendo aditivos de origem animal.

Apesar deste novo meio crioprotetor trazer novas perspectivas para a criopreservação de sêmen humano, outros eventos precisam ser esclarecidos em relação à funcionalidade e capacidade fertilizante da célula espermática. Além do mais, essa nova formulação precisa ser investigada na prática clínica, com a finalidade de avaliar os efeitos da PC de alta pureza e o antioxidante LAC na taxa de fertilização, qualidade do desenvolvimento embrionário e taxa de gestação.

Existem meios sintéticos para congelamento de sêmen humano como o Sperm Freezing Medium da empresa ORIGIO e o Sperm Cryoprotec da empresa Nidacon, porém ambas as formulações não contêm aditivos lipídicos de importância documentada para a estabilização da membrana espermática como a PC e também não possuem antioxidante para proteção mais eficaz da função mitocondrial e do DNA, como a L-carnitina. A empresa Vitrolife comercializa meio crioprotetor sintético para sêmen humano que contém colesterol, mas não inclui fosfolípidios e L-carnitina, o que demonstra a importância e inovação deste trabalho.

O desenvolvimento do meio crioprotetor ANTIOX-PC é resultado de uma pesquisa conduzida em um modelo de parceria público-privada entre a startup Invitra Tecnologia da Reprodução Assistida LTDA e a Universidade de São Paulo. Além dos avanços alcançados com esta pesquisa, a geração de conhecimento científico e da capacitação de recursos humanos, o desenvolvimento de um produto 100% nacional e inovador, em um segmento predominantemente dominado por grandes empresas multinacionais, contribui de forma relevante para o avanço tecnológico do nosso país.

*C*onclusão

7. CONCLUSÃO

A nova formulação crioprotetora proposta neste estudo (ANTIOX-PC) não se mostrou inferior ao meio padrão-ouro (TYB) em relação a criopreservação de espermatozoides de homens astenozoospermicos.

O crioprotetor ANTIOX-PC não se mostrou inferior ao meio TYB em relação a motilidade PR e IFD de espermatozoides obtidos de homens com astenozoospermia e apresenta vantagens importantes relacionadas à composição química definida, a redução do risco potencial de contaminação devido à ausência de aditivos de origem animal e, conseqüentemente, um maior prazo de validade e melhor controle de qualidade e segurança nos procedimentos de reprodução assistida.

8. OUTRAS INFORMAÇÕES

8.1. Registro

Este estudo clínico aprovado e registrado pelo Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos (ReBEC): RBR-785GHF

8.2. Aspectos éticos

Este projeto foi aprovado pelo CEP do HCFMRP-USP e pela CONEP.

8.3. Financiamento de agência de fomento à pesquisa

A pesquisadora contou com bolsa do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Modalidade Mestrado, no período de vigência de 01/09/2015 a 31/08/2017 e Processo nº 159139/2015-5. O apoio institucional foi de extrema importância para que houvesse dedicação exclusiva ao estudo.

R eferências

AIRES, V. A. et al. In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. **Theriogenology**, v. 60, n. 2, p. 269-279, 2003/07/01/ 2003. ISSN 0093-691X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X02013699> >.

AITKEN, R. J. The Amoroso Lecture. The human spermatozoon--a cell in crisis? **J Reprod Fertil**, v. 115, n. 1, p. 1-7, Jan 1999. ISSN 0022-4251 (Print)0022-4251. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

AITKEN, R. J.; BAKER, M. A. Oxidative stress, sperm survival and fertility control. **Mol Cell Endocrinol**, v. 250, n. 1-2, p. 66-9, May 16 2006. ISSN 0303-7207 (Print)0303-7207. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2005.12.026> >.

AITKEN, R. J. et al. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. **Biol Reprod**, v. 59, n. 5, p. 1037-46, Nov 1998. ISSN 0006-3363 (Print)0006-3363. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

ALTHOUSE, G. C. Sanitary procedures for the production of extended semen. **Reprod Domest Anim**, v. 43 Suppl 2, p. 374-8, Jul 2008. ISSN 0936-6768. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01187.x> >.

ALVARENGA, M. A. et al. Acrosomal ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethylene glycol using two packaging systems. **Equine Vet J**, v. 32, n. 6, p. 541-5, Nov 2000. ISSN 0425-1644 (Print)0425-1644. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

AXNER, E.; LAGERSON, E. Cryopreservation of Dog Semen in a Tris Extender with 1% or 2% Soya Bean Lecithin as a Replacement of Egg Yolk. **Reprod Domest Anim**, v. 51, n. 2, p. 262-8, Apr 2016. ISSN 0936-6768. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/rda.12675> >.

BALERCIA, G. et al. Placebo-controlled double-blind randomized trial on the use of L-carnitine, L-acetylcarnitine, or combined L-carnitine and L-acetylcarnitine in men with idiopathic asthenozoospermia. **Fertil Steril**, v. 84, n. 3, p. 662-71, Sep 2005. ISSN 0015-0282. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.03.064> >.

BARBAS, J. P.; MASCARENHAS, R. D. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. **Cell Tissue Bank**, v. 10, n. 1, p. 49-62, Feb 2009. ISSN 1389-9333. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10561-008-9081-4> >.

BAUMBER, J. et al. Reactive oxygen species promote tyrosine phosphorylation and capacitation in equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 60, n. 7, p. 1239-47, Oct 15 2003. ISSN 0093-691X (Print)0093-691x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

BENSON, J. D. et al. The cryobiology of spermatozoa. **Theriogenology**, v. 78, n. 8, p. 1682-99, Nov 2012. ISSN 0093-691x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.06.007> >.

BERGERON, A.; MANJUNATH, P. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. **Mol Reprod Dev**, v. 73, n. 10, p. 1338-44, Oct 2006. ISSN 1040-452X (Print)1040-452x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/mrd.20565> >.

BERTELI, T. S. et al. Magnetic-activated cell sorting before density gradient centrifugation improves recovery of high-quality spermatozoa. **Andrology**, v. 5, n. 4, p. 776-782, Jul 2017. ISSN 2047-2919. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/andr.12372> >.

BOUSSEAU, S. et al. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. **Theriogenology**, v. 50, n. 5, p. 699-706, Oct 1 1998. ISSN 0093-691X (Print)0093-691x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

BRENNER, R. R.; BERNASCONI, A. M.; GARDA, H. A. Effect of experimental diabetes on the fatty acid composition, molecular species of phosphatidyl-choline and physical properties of hepatic microsomal membranes. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 63, n. 3, p. 167-76, Sep 2000. ISSN 0952-3278 (Print)0952-3278. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1054/plef.2000.0175> >.

BUNGE, R. G.; SHERMAN, J. K. Fertilizing capacity of frozen human spermatozoa. **Nature**, v. 172, n. 4382, p. 767-8, Oct 24 1953. ISSN 0028-0836 (Print)0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

CELEGHINI, E. C. et al. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. **Anim Reprod Sci**, v. 104, n. 2-4, p. 119-31, Mar 3 2008. ISSN 0378-4320 (Print)0378-4320. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.02.001> >.

CHELUCCI, S. et al. Soybean lecithin-based extender preserves spermatozoa membrane integrity and fertilizing potential during goat semen cryopreservation. **Theriogenology**, v. 83, n. 6, p. 1064-74, Apr 1 2015. ISSN 0093-691x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.12.012> >.

COCUZZA, M. et al. Clinical relevance of oxidative stress and sperm chromatin damage in male infertility: an evidence based analysis. **Int Braz J Urol**, v. 33, n. 5, p. 603-21, Sep-Oct 2007. ISSN 1677-5538 (Print)1677-5538. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

CRESPILHO, A. M. et al. Comparison of in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or new lecithin based extenders. **Livestock Science**, v. 149, n. 1, p. 1-6, 2012/11/01/ 2012. ISSN 1871-1413. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S187114131200176X> >.

DEL VALLE, I. et al. Soy lecithin interferes with mitochondrial function in frozen-thawed ram spermatozoa. **J Androl**, v. 33, n. 4, p. 717-25, Jul-Aug 2012. ISSN 0196-3635. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.2164/jandrol.111.014944> >.

DELBES, G. et al. The use of complimentary assays to evaluate the enrichment of human sperm quality in asthenoteratozoospermic and teratozoospermic samples processed with Annexin-V magnetic activated cell sorting. **Andrology**, v. 1, n. 5, p. 698-706, Sep 2013. ISSN 2047-2919. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.2047-2927.2013.00106.x> >.

DONNELLY, E. T.; MCCLURE, N.; LEWIS, S. E. M. Cryopreservation of human semen and prepared sperm: effects on motility parameters and DNA integrity. **Fertility and Sterility**, v. 76, n. 5, p. 892-900, 2001/11/01/ 2001. ISSN 0015-0282. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015028201028345> >.

EZZ, M. A. et al. The effect of cholesterol loaded cyclodextrins on post-thawing quality of buffalo semen in relation to sperm DNA damage and ultrastructure. **Reprod Biol**, v. 17, n. 1, p. 42-50, Mar 2017. ISSN 1642-431x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.repbio.2016.12.001> >.

FIUME, Z. Final report on the safety assessment of Lecithin and Hydrogenated Lecithin. **Int J Toxicol**, v. 20 Suppl 1, p. 21-45, 2001. ISSN 1091-5818 (Print)1091-5818. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

FORTUNATO, A. et al. Sperm DNA Fragmentation Assays Correlate with Sperm Abnormal Morphology and the Pregnancy Outcome | OMICS International. **Journal of Fertilization: In Vitro - IVF-Worldwide, Reproductive Medicine, Genetics & Stem Cell Biology**, v. 1, n. 1, p. 101, 2013-05-07 2013. ISSN 2375-4508. Disponível em: < <https://www.omicsonline.org/open-access/sperm-dna-fragmentation-assays-correlate-with-sperm-abnormal-morphology-and-the-pregnancy-outcome-2375-4508-1000101.php?aid=15656> >.

GOMEZ-TORRES, M. J. et al. Effectiveness of human spermatozoa biomarkers as indicators of structural damage during cryopreservation. **Cryobiology**, v. 78, p. 90-94, Oct 2017. ISSN 0011-2240. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2017.06.008> >.

GRAHAM, E. F.; CRABO, B. G.; BROWN, K. I. Effect of some zwitter ion buffers on the freezing and storage of spermatozoa. I. Bull. **J Dairy Sci**, v. 55, n. 3, p. 372-8, Mar 1972. ISSN 0022-0302 (Print)0022-0302. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(72\)85499-7](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(72)85499-7) >.

GREEN, D. R.; REED, J. C. Mitochondria and apoptosis. **Science**, v. 281, n. 5381, p. 1309-12, Aug 28 1998. ISSN 0036-8075 (Print)0036-8075. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

HONG, C. Y. et al. Effect of phosphatidylcholine, lysophosphatidylcholine, arachidonic acid and docosahexaenoic acid on the motility of human sperm. **Int J Androl**, v. 9, n. 2, p. 118-22, Apr 1986. ISSN 0105-6263 (Print)0105-6263. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

JEULIN, C.; LEWIN, L. M. Role of free L-carnitine and acetyl-L-carnitine in post-gonadal maturation of mammalian spermatozoa. **Hum Reprod Update**, v. 2, n. 2, p. 87-102, Mar-Apr 1996. ISSN 1355-4786 (Print)1355-4786. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

JEYENDRAN, R. S. et al. Cryopreservation of human sperm in a lecithin-supplemented freezing medium. **Fertil Steril**, v. 90, n. 4, p. 1263-5, Oct 2008. ISSN 0015-0282. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.10.068> >.

KALTHUR, G. et al. Effect of cryopreservation on sperm DNA integrity in patients with teratospermia. **Fertil Steril**, v. 89, n. 6, p. 1723-7, Jun 2008. ISSN 0015-0282. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.06.087> >.

KEMAL DURU, N.; MORSHEDI, M.; OEHNINGER, S. Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. **Fertil Steril**, v. 74, n. 6, p. 1200-7, Dec 2000. ISSN 0015-0282 (Print)0015-0282. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer**, v. 26, n. 4, p. 239-57, Aug 1972. ISSN 0007-0920 (Print)0007-0920. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

KHALIFA, T.; LYMBEROPOULOS, A.; THEODOSIADOU, E. Association of soybean-based extenders with field fertility of stored ram (*Ovis aries*) semen: a randomized double-blind parallel group design. **Theriogenology**, v. 79, n. 3, p. 517-27, Feb 2013. ISSN 0093-691x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.11.009> >.

KOBAYASHI, H. et al. Sperm Cryosurvival in Three Commercially Available Cryopreservatives: A Comparative Study. **Fertility and Sterility**, v. 74, n. 3, 2000/09/01 2000. ISSN 1556-5653. Disponível em: < <http://www.fertstert.org/article/S0015028200014412/abstract> >. Disponível em: <

<http://www.fertstert.org/article/S0015028200014412/fulltext> >.Disponível em: <
<http://www.fertstert.org/article/S0015028200014412/pdf> >.

KODAMA, H. et al. Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. **Fertil Steril**, v. 68, n. 3, p. 519-24, Sep 1997. ISSN 0015-0282 (Print)0015-0282. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

KRUGER, T. F. et al. Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. **Fertil Steril**, v. 49, n. 1, p. 112-7, Jan 1988. ISSN 0015-0282 (Print)0015-0282. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

KUMAR, P. et al. Liposome-based semen extender is suitable alternative to egg yolk-based extender for cryopreservation of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. **Anim Reprod Sci**, v. 159, p. 38-45, Aug 2015. ISSN 0378-4320. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.05.010> >.

LARSON, J. M. et al. An intrauterine insemination-ready cryopreservation method compared with sperm recovery after conventional freezing and post-thaw processing. **Fertil Steril**, v. 68, n. 1, p. 143-8, Jul 1997. ISSN 0015-0282 (Print)0015-0282. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

LENZI, A. et al. A placebo-controlled double-blind randomized trial of the use of combined l-carnitine and l-acetyl-carnitine treatment in men with asthenozoospermia. **Fertil Steril**, v. 81, n. 6, p. 1578-84, Jun 2004. ISSN 0015-0282 (Print)0015-0282. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2003.10.034> >.

LOPES, S. et al. Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. **Hum Reprod**, v. 13, n. 4, p. 896-900, Apr 1998. ISSN 0268-1161 (Print)0268-1161. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

LOVELOCK, J. E.; BISHOP, M. W. Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide. **Nature**, v. 183, n. 4672, p. 1394-5, May 16 1959. ISSN 0028-0836 (Print)0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

MALVEZZI, H. et al. Sperm quality after density gradient centrifugation with three commercially available media: a controlled trial. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 12, p. 121, Dec 2 2014. ISSN 1477-7827. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/1477-7827-12-121> >.

MARTIN, G. et al. Kinetics of occurrence of some features of apoptosis during the cryopreservation process of bovine spermatozoa. **Hum Reprod**, v. 22, n. 2, p. 380-8, Feb 2007. ISSN 0268-1161 (Print)0268-1161. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/del399> >.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **Am J Physiol**, v. 247, n. 3 Pt 1, p. C125-42, Sep 1984. ISSN 0002-9513 (Print)0002-9513. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1152/ajpcell.1984.247.3.C125> >.

MEDEIROS, C. M. et al. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 327-44, Jan 1 2002. ISSN 0093-691X (Print)0093-691x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

MUTALIK, S. et al. Liposome encapsulated soy lecithin and cholesterol can efficiently replace chicken egg yolk in human semen cryopreservation medium. **Syst Biol Reprod Med**, v. 60, n. 3, p. 183-8, Jun 2014. ISSN 1939-6368. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3109/19396368.2014.902521> >.

NABI, A. et al. Pentoxifylline increase sperm motility in devitrified spermatozoa from asthenozoospermic patient without damage chromatin and DNA integrity. **Cryobiology**, v. 76, p. 59-64, Jun 2017. ISSN 0011-2240. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2017.04.008> >.

NISHIJIMA, K. et al. Motility and fertility of rabbit sperm cryopreserved using soybean lecithin as an alternative to egg yolk. **Theriogenology**, v. 84, n. 7, p. 1172-5, Oct 15 2015. ISSN 0093-691x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.06.018> >.

OZKAVUKCU, S. et al. Effects of cryopreservation on sperm parameters and ultrastructural morphology of human spermatozoa. **J Assist Reprod Genet**, v. 25, n. 8, p. 403-11, Aug 2008. ISSN 1058-0468 (Print)1058-0468. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10815-008-9232-3> >.

PARKS, J. E.; GRAHAM, J. K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v. 38, n. 2, p. 209-22, Aug 1992. ISSN 0093-691X (Print)0093-691x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

POLGE, C.; SMITH, A. U.; PARKES, A. S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, v. 164, n. 4172, p. 666, Oct 15 1949. ISSN 0028-0836 (Print)0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

PURDY, P. H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v. 63, n. 3, p. 215-225, 2006/06/01/ 2006a. ISSN 0921-4488. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0921448805000763> >.

_____. The post-thaw quality of ram sperm held for 0 to 48 h at 5 degrees C prior to cryopreservation. **Anim Reprod Sci**, v. 93, n. 1-2, p. 114-23, Jun 2006b. ISSN 0378-4320 (Print)0378-4320. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.07.002> >.

RAVAGNAN, L.; ROUMIER, T.; KROEMER, G. Mitochondria, the killer organelles and their weapons. **J Cell Physiol**, v. 192, n. 2, p. 131-7, Aug 2002. ISSN 0021-9541 (Print)0021-9541. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.10111> >.

REED, J. C. Cytochrome c: can't live with it--can't live without it. **Cell**, v. 91, n. 5, p. 559-62, Nov 28 1997. ISSN 0092-8674 (Print)0092-8674. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

REED, M. L. et al. Soy lecithin replaces egg yolk for cryopreservation of human sperm without adversely affecting postthaw motility, morphology, sperm DNA integrity, or sperm binding to hyaluronate. **Fertil Steril**, v. 92, n. 5, p. 1787-90, Nov 2009. ISSN 0015-0282. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.05.026> >.

RICKER, J. V. et al. Equine sperm membrane phase behavior: the effects of lipid-based cryoprotectants. **Biol Reprod**, v. 74, n. 2, p. 359-65, Feb 2006. ISSN 0006-3363 (Print)0006-3363. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod.105.046185> >.

SALAMON, S.; MAXWELL, W. M. Storage of ram semen. **Anim Reprod Sci**, v. 62, n. 1-3, p. 77-111, Aug 18 2000. ISSN 0378-4320 (Print)0378-4320. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SALAMON, S.; MAXWELL, W. M. C. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. **Animal Reproduction Science**, v. 37, n. 3, p. 185-249, 1995/02/01/ 1995. ISSN 0378-4320. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0378432094013271> >.

SAWYER, D. E. et al. Quantitative analysis of gene-specific DNA damage in human spermatozoa. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 529, n. 1, p. 21-34, 2003/08/28/ 2003. ISSN 0027-5107. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0027510703001015> >.

SCHOLFIELD, C. R. Composition of Soybean Lecithin. *Jornal of the American Oil Chemists' Society*, v. 58, n. 10, p. 889-92, Oct 1981.

SCHUFFNER, A.; MORSHEDI, M.; OEHNINGER, S. Cryopreservation of fractionated, highly motile human spermatozoa: effect on membrane phosphatidylserine externalization and lipid peroxidation. **Hum Reprod**, v. 16, n. 10, p. 2148-53, Oct 2001. ISSN 0268-1161 (Print)0268-1161. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SIGMAN, M. et al. Carnitine for the treatment of idiopathic asthenospermia: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Fertil Steril**, v. 85, n. 5, p. 1409-14, May 2006. ISSN 0015-0282. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.10.055> >.

SILVA, A. B. Criopreservação de sêmen humano em meio Test Yolk Buffer ou meio sintético suplementado com fosfolípido e antioxidante: ensaio clínico controlado. 83 f. Dissertação

(Mestrado em Biologia da Reprodução) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

SILVA, P. F.; GADELLA, B. M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, v. 65, n. 5, p. 958-78, Mar 15 2006. ISSN 0093-691X (Print)0093-691x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.010> >.

STUBBS, C. D.; SMITH, A. D. The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function. **Biochim Biophys Acta**, v. 779, n. 1, p. 89-137, Jan 27 1984. ISSN 0006-3002 (Print)0006-3002. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SUSIN, S. A. et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. **Nature**, v. 397, n. 6718, p. 441-6, Feb 4 1999. ISSN 0028-0836 (Print)0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/17135> >.

THOMSON, L. K. et al. Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. **Hum Reprod**, v. 24, n. 9, p. 2061-70, Sep 2009. ISSN 0268-1161. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/dep214> >.

TIWARI, A. et al. A new media without animal component for sperm cryopreservation: motility and various attributes affecting paternal contribution of sperm. **J Assist Reprod Genet**, v. 34, n. 5, p. 647-657, May 2017. ISSN 1058-0468. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10815-017-0888-4> >.

Universidade de São Paulo. Rosana Maria dos Reis, Alessandra Aparecida Vireque, Marilda Hatsumi Yamada Dantas, Oswaldo Felipe Lemos Leite Ortiz da Silva. Composição sintética para criopreservação de semen, seu processo de preparação e uso. BR n. 1020130192139, 29 jul 2013.

VIREQUE, A. A. et al. Effects of n-6 and n-3 polyunsaturated acid-rich soybean phosphatidylcholine on membrane lipid profile and cryotolerance of human sperm. **Fertil**

Steril, v. 106, n. 2, p. 273-283.e6, Aug 2016. ISSN 0015-0282. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.03.044> >.

WATSON, P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reprod Fertil Dev**, v. 7, n. 4, p. 871-91, 1995. ISSN 1031-3613 (Print)1031-3613. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

World Health Organization, WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. Geneva: World Health Organization; 2010.

WOODS, E. J. et al. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. **Cryobiology**, v. 48, n. 2, p. 146-56, Apr 2004. ISSN 0011-2240 (Print)0011-2240. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2004.03.002> >.

YOUNG, K. E. et al. Evaluation of chromosome breakage and DNA integrity in sperm: an investigation of remote semen collection conditions. **J Androl**, v. 24, n. 6, p. 853-61, Nov-Dec 2003. ISSN 0196-3635 (Print)0196-3635. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

ZHANG, S. et al. The cryoprotective effects of soybean lecithin on boar spermatozoa quality. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 22, p. 6476-6480, 2011-05-10 2009. Disponível em: < <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/66170> >.

ZRIBI, N. et al. Effect of freezing-thawing process and quercetin on human sperm survival and DNA integrity. **Cryobiology**, v. 65, n. 3, p. 326-31, Dec 2012. ISSN 0011-2240. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2012.09.003> >.

ZHOU, X.; LIU, F.; ZHAI, S. Effect of L-carnitine and/or L-acetyl-carnitine in nutrition treatment for male infertility: a systematic review. **Asia Pac J Clin Nutr**, v. 16 Suppl 1, p. 383-90, 2007. ISSN 0964-7058 (Print)0964-7058. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

A pên dice

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pesquisador responsável: Profa. Dra. Rosana Maria dos Reis

Pesquisador participante: Fernanda Sicchieri

Pesquisador envolvido: Aline Bomfim Silva

Instituição proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP-USP)

Temos o prazer em convidá-lo a participar da nossa pesquisa intitulada “**Comparação de dois meios para a criopreservação de sêmen quanto aos efeitos da suplementação lipídica e a ação antioxidante na viabilidade espermática em homens com parâmetros seminais alterados: estudo clínico randomizado**”.

A justificativa para a realização desta pesquisa é que os métodos convencionais de congelamento de sêmen ainda causam danos aos espermatozoides e redução da fertilidade masculina. Dessa forma, estamos propondo um novo meio chamado ANTIOX-PC na tentativa de manter a qualidade do sêmen após o descongelamento. O meio proposto possui composição química definida, o que permite a identificação de todos os componentes adicionados ao meio e, conseqüentemente, a obtenção de informações precisas sobre seus mecanismos de ação no espermatozoide.

O objetivo deste estudo é comparar dois meios para o congelamento de sêmen humano: o convencional, que é o mais utilizado atualmente, chamado TEST YOLK BUFFER; e o meio testado, chamado ANTIOX-PC. Ao final da pesquisa será possível verificar se o meio proposto apresenta resultados iguais ou superiores ao meio convencional.

A sua participação neste estudo consiste em fornecer uma parte da amostra do sêmen que foi colhida hoje no Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia, para a realização do espermograma, que foi solicitado para avaliar a sua qualidade seminal. Para fazer esse exame

utiliza-se apenas uma alíquota do sêmen, sendo o restante normalmente descartado. Então pedimos que permita a utilização deste material que será descartado, para ser utilizado neste estudo. Os procedimentos que serão utilizados nessa pesquisa são: o espermograma, que avalia o sêmen quantitativa e qualitativamente, e um teste chamado TUNEL, que avalia os danos no DNA (molécula onde fica armazenado o material genético do espermatozoide). Essas análises serão feitas antes do congelamento da amostra e após o descongelamento das mesmas. Além disso, o armazenamento do material biológico será necessário, pois caso venha acontecer algum imprevisto nas reações realizadas durante o estudo, não haverá necessidade de você voltar para coletar novamente. Estas amostras serão armazenadas em containers de nitrogênio, em uma sala específica de criopreservação, no laboratório de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP-USP). O armazenamento do sêmen será de dois anos, de acordo com o cronograma da pesquisa correspondente. Ao final do período de realização da pesquisa, o material congelado armazenado será descartado conforme normas vigentes de órgãos técnicos competentes.

Sua participação na pesquisa poderá gerar possível desconforto por se tratar de uma coleta de sêmen por masturbação, o que causa certo constrangimento, porém será garantida a total privacidade e confidencialidade durante sua realização. Além disso, poderá gerar riscos, como sentir algum mal-estar durante a coleta, mas será realizada em ambiente hospitalar onde tem equipe profissional treinada caso necessário.

A participação neste estudo não trará qualquer benefício direto a você. Como benefício indireto, estará ajudando a avaliar métodos que podem ajudar no aperfeiçoamento da técnica de congelamento de sêmen atualmente disponível.

Não iremos avaliar condições de saúde/doença dos voluntários. Os resultados de todos os exames os quais serão realizados durante a pesquisa estarão disponíveis para o paciente

caso tenha interesse, estando o pesquisador à total disposição para esclarecer quaisquer dúvidas antes e durante a pesquisa.

O voluntário possui a liberdade de recusar a participar ou retirar seu consentimento em qualquer fase do estudo, sem penalização alguma ou prejuízo, bastando informar à equipe responsável da sua desistência.

O sêmen coletado não será utilizado de forma alguma para nenhum outro fim que não seja o que foi proposto por esta pesquisa, assim como será garantido o sigilo, a privacidade e a proteção da sua imagem, garantindo a não utilização das informações em seu prejuízo.

Caso alguma outra pesquisa ou avaliação ainda não definida dentro deste estudo forem necessárias, com esta amostra armazenada, o seu consentimento será solicitado novamente por meio de um novo TCLE (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido). Também será informado quando houver transferência, perda ou destruição do seu material biológico, assim como o fim do armazenamento.

O voluntário receberá uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido devidamente assinada pelo pesquisador.

A participação no estudo não acarretará custos para você e não haverá nenhum tipo de ganho financeiro com sua participação nessa pesquisa, que é por livre espontaneidade.

O voluntário tem direito a indenização conforme as leis vigentes no país, caso ocorra dano decorrente de sua participação na pesquisa.

Em caso de dúvidas de cunho jurídico poderá entrar em contato com o CEP (Comitê de Ética em Pesquisa), que tem a função de avaliar e acompanhar os aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos, pelo telefone (16) 3602-2228 de segunda a sexta das 8:00 às 17:00 horas. Para acompanhamento e assistência durante a pesquisa ou caso venha sofrer qualquer problema de saúde em virtude de sua participação, poderá entrar em contato com os responsáveis: Dra. Rosana Maria dos Reis (orientadora da pesquisa) pelo telefone (16)

36022926 ou e-mail romareis@fmrp.usp.br e Fernanda Sicchieri (aluna de mestrado da pesquisa) pelo celular (16) 991566961 ou e-mail festicchieri@hotmail.com.

Eu, _____ fui informado dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão se assim desejar. As pesquisadoras Dra. Rosana Maria dos Reis e/ou Fernanda Sicchieri certificaram-me de que todos os dados desta pesquisa serão confidenciais. Em caso de dúvidas poderei entrar em contato com as pesquisadoras e procurá-las diretamente no Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia, situado na Avenida Bandeirantes nº 3900, Campus Universitário da USP, 1º andar, Ribeirão Preto-SP; ou o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, situado na Avenida dos Bandeirantes nº 3900, Campus Universitário da USP, 1º andar, Ribeirão Preto, SP.

Declaro que concordo em participar deste estudo autorizando a coleta, o depósito, o armazenamento e a utilização do meu material biológico. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Nome do participante do estudo

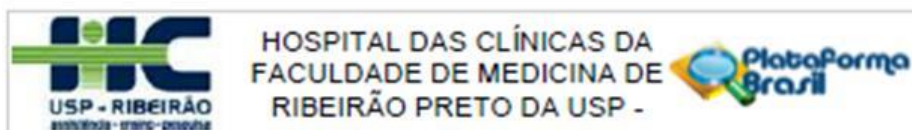
_____, _____, ____/____/____
Assinatura do participante do estudo Local Data

Nome do pesquisador que aplicou o TCLE

_____, _____, ____/____/____
Assinatura do pesquisador Local Data

*A*nexos

ANEXO 1 - Primeira e última página de aprovação do CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Comparação de dois meios para a criopreservação de sêmen quanto aos efeitos da suplementação lipídica e a ação antioxidante na viabilidade espermática em homens com parâmetros seminais alterados: estudo clínico randomizado

Pesquisador: Rosana Maria dos Reis

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);
(Reprodução assistida);

Versão: 3

CAAE: 44677215.0.0000.5440

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP -

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.239.279

Apresentação do Projeto:

INTRODUÇÃO: A criopreservação de sêmen é uma alternativa valiosa na reprodução humana assistida, entretanto têm efeitos negativos sobre os espermatozoides, como a diminuição da motilidade progressiva, indução de fragmentação do DNA genômico e a modificação da composição lipídica da membrana plasmática. Os meios crioprotetores convencionais utilizam em sua formulação a gema de ovo, um diluente de origem animal e de composição química indefinida. Recentemente, em trabalho pioneiro do nosso grupo de pesquisa, foi desenvolvido um meio crioprotetor para sêmen humano sem aditivos de origem animal suplementado com fosfatidicolina (PC) com alto grau de pureza (>99%), principal constituinte da lectina de soja, com resultados consistentes na crioproteção do espermatozoide e nos parâmetros de motilidade progressiva e vitalidade pós descongelamento. No entanto, ainda não temos dados disponíveis sobre os efeitos desta composição crioprotetora em sêmen de homens com parâmetros seminais alterados. **DESENHO DO ESTUDO:** As amostras de sêmen de voluntários serão analisadas para a determinação dos parâmetros seminais por meio do espermograma e do índice de fragmentação

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900
UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hosp.usp.br



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DE
RIBEIRÃO PRETO DA USP -



Continuação do Parecer: 1.239.279

Ausência	TCLE versão 3.docx	28/07/2015 19:03:28		Aceito
Outros	Carta versão 3.docx	28/07/2015 19:03:59		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_510055.pdf	28/07/2015 19:06:42		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Sim

RIBEIRAO PRETO, 22 de Setembro de 2015

Assinado por:
MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
(Coordenador)

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900
UF: SP Município: RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hosp.usp.br

Página 04 de 04

ANEXO 2 - Primeira e última página de aprovação do CONEP

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Comparação de dois meios para a criopreservação de sêmen quanto aos efeitos da suplementação lipídica e a ação antioxidante na viabilidade espermática em homens com parâmetros seminais alterados: estudo clínico randomizado

Pesquisador: Rosana Maria dos Reis

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);
(Reprodução assistida);

Versão: 4

CAAE: 44677215.0.0000.5440

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP -

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.770.747

Apresentação do Projeto:

INTRODUÇÃO

A criopreservação de sêmen é uma alternativa valiosa para homens que precisam se submeter a terapias potencialmente esterilizantes, como a quimio e radioterapia, ou cirurgia invasiva, que podem levar a insuficiência testicular ou disfunção ejaculatória. Também para aqueles que precisam recuperar espermatozoides cirurgicamente, em casos de oligo ou azoospermia, para evitar a necessidade de repetir o procedimento invasivo. No entanto, para empreender sucesso na aplicação da técnica de criopreservação, os espermatozoides devem ter preservadas suas características funcionais, dependendo para tal da integridade da membrana plasmática e das organelas, assim como de um genoma haploide. O processo de criopreservação tem profundos efeitos sobre os espermatozoides, muitos dos quais resultam em dano subletal às células e, conseqüentemente, redução da fertilidade. Os principais comprometimentos da função espermática induzidos pela criopreservação estão associados a modificação da composição lipídica da membrana plasmática, ao metabolismo energético, a fragmentação do DNA genômico e a

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-PLAN - 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

