



ANA PAULA SYDOR

**AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMÊN HUMANO
COM DIFERENTES MÉTODOS DE ENVASE E CURVAS DE RESFRIAMENTO**

**GUARAPUAVA
2019**

ANA PAULA SYDOR

**AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMÊN HUMANO
COM DIFERENTES MÉTODOS DE ENVASE E CURVAS DE RESFRIAMENTO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Banca Avaliadora, como critério para obtenção
do grau de bacharel(a) em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Dorneles
Tortorella.

GUARAPUAVA
2019

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURA	PÁG.
1 Gráficos comparativos da sobrevivência dos espermatozoides pós criopreservação em diferentes intervalos de tempos.	14
2 Gráfico comparativo da vitalidade dos espermatozoides após a criopreservação em diferentes intervalos de tempo e envase.	16
3 Gráficos comparativos das alterações morfológicas na qualidade seminal em diferentes tipos de envase e curva de resfriamento	17
4 Curva de sobrevivência dos espermatozoides após criopreservação em diferentes tipos de congelamento e envase; RP ou RT = congelamento pelo método rápido e envasado em palheta ou em criotubo; LP ou LT = congelamento pelo método lento e envasado em palheta ou em criotubo.	18

TABELA	PÁG.
1 Avaliação da média e desvio padrão de sêmen <i>in natura</i> e após criopreservação.	13

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
%	Por cento
<	Inferior
±	Mais ou menos
µm	Micrômetro (unidade de medida)
g/mL	Grama por mL
mL	Mililitros
ACPs	Agentes crioprotetores
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa CAMPO REAL
CNS	Conselho Nacional da Saúde
I	Imóvel
IM	Imotilidade
L	Lento
LP	Lento-palheta
LT	Lento-criotubo
Min	Minutos
Mot	Motilidade
NP	Motilidade não progressiva
OMS	Organização Mundial da Saúde
P	Valor
PAISM	Programa de Assistência Integral à Saúde da mulher
PR	Motilidade progressiva
R	Rápido
RP	Rápido-palheta
RT	Rápido-criotubo
TRA	Técnicas de Reprodução Assistida
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	9
2.1 POPULAÇÃO E AMOSTRA.....	9
2.2 ESPERMOGRAMA	9
2.2.1 pH DO SÊMEN	9
2.2.2 VISCOSIDADE DO SÊMEN.....	9
2.2.3 VOLUME SEMINAL	10
2.2.4 MOTILIDADE ESPERMÁTICA.....	10
2.2.5 VITALIDADE ESPERMÁTICA (teste-hiposmótico).....	10
2.2.6 CONCENTRAÇÃO ESPERMÁTICA	10
2.2.7 MORFOLOGIA SEMINAL	10
2.3 CRIOPRESERVAÇÃO	11
2.4 DESCONGELAMENTO	12
2.5 ANÁLISE ESTÁTISTICA.....	12
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	12
4. CONCLUSÃO	19
REFERÊNCIAS.....	20

AValiação DA EFICIÊNCIA DA CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMÊN HUMANO COM DIFERENTES MÉTODOS DE ENVASE E CURVAS DE RESFRIAMENTO

SYDOR, Ana Paula¹ (Campo Real)

TORTORELLA, Rodrigo Dorneles² (Campo Real)

RESUMO

A eficácia da utilização de sêmen humano congelado em programas de inseminação artificial necessita do desenvolvimento de estudos para determinar a melhor curva de resfriamento e o tipo de envase para a criopreservação. Objetivou-se com o trabalho caracterizar o sêmen humano *in natura* e avaliar a eficiência dos métodos de envase e congelamento por meio da criopreservação. Foram utilizadas onze amostras de sêmen de onze voluntários. Na primeira etapa do experimento foi realizada a caracterização do sêmen *in natura*. Na segunda etapa foi realizada a criopreservação do sêmen utilizando o meio crioprotetor Ingá SpermanFreezing na proporção 1:1 (meio - amostra), com os métodos RP (rápido-palheta), RT (rápido-criotubo), LP (lento-palheta) e LT (lento-criotubo). Para a avaliação da viabilidade e comparação dos métodos foi descongelado as amostras em temperatura ambiente e mantidas a 37°C. A motilidade espermática comparada com o sêmen *in natura* teve uma redução de significava em todos os tipos de envase e curva de resfriamento, a vitalidade teve significância no envase em palheta independentemente do método de congelamento e morfologia manteve constante quando comparado o parâmetro normal e quando comparado devido a sua anormalidade teve valor estatístico significativo para defeito na cauda. Com as avaliações estatísticas foi possível, que quando comparado os métodos de congelamento e envase pós criopreservação não há diferença entre eles.

Palavras-chave: Espermatozoide. Preservação do sêmen. Reprodução. Técnicas.

ABSTRACT

The effectiveness of using frozen human blood in artificial insemination programs is necessary for the development of studies to determine the best cooling curve and the type of environment for cryopreservation. The objective of this work is to characterize a fresh human being and to evaluate the efficiency of the filling and freezing methods through cryopreservation. Eleven samples from eleven volunteers were used. In the first stage of the experiment the characterization of fresh semen was performed. In the second stage, the evaluation of the use of SpermanFreezing cryoprotectant medium in the ratio 1: 1 (half - sample), with the methods RP (fast palette), RT (fast cryotube), LP (palette) and LT (slow cryotube) was used.). For an evaluation of the viability and comparison of the methods, it was thawed as the temperatures at room temperature and kept at 37°C. The sperm motility compared with the same number in nature had a reduction of meaning in all types of filling and cooling curve, a vitality had significance in the reed filling due to its abnormality had significant statistical value for tail defect. With the statistical evaluations allowed, that when freezing methods and send after cryopreservation there is no difference between them.

Keywords: Sperman. Preservation of semen. Reproduction. Techniques.

¹Acadêmico do curso de Biomedicina, Centro Universitário Campo Real.

² Médico Veterinário, Docente do curso de Biomedicina do Centro Universitário Campo Real, Doutor em Ciências Animais na área de Fisiopatologia da Reprodução Animal.

1. INTRODUÇÃO

A infertilidade é a incapacidade de um casal de ter filhos após um ano de relações sexuais normais e sem método de contracepção. Essa incapacidade ocorre devido a diversos fatores, tais como: patologias que afetam diretamente e indiretamente o aparelho reprodutor, estresse, idade, doenças metabólicas e bem estar psicológico (MARTINS et al., 2019). Estima-se que 30% dos problemas estão associados a fatores femininos, outros 30% estão relacionadas as condições masculinas e 40% restantes são separados entre causas do casal (30%) e por causas desconhecidas (10% das situações) (CLINICA GERA, 2018).

Com os avanços da biotecnologia, foram desenvolvidos métodos para que pessoas diagnosticadas inférteis, fossem capazes de conceber filhos biológicos (RÊGO et al., 2019). Alguns métodos utilizados na reprodução humana assistida são: Inseminação artificial, Fertilização *in vitro* e Injeção intracitoplasmática de espermatozoide (LEWIS, 2004). E com isso a criobiologia passou a manifestar interesse, pois exerce papel fundamental na manutenção da fertilidade (HOVATTA, 2003).

A criopreservação consiste na preservação do material genético por tempo indeterminado, a temperaturas abaixo do ponto de congelamento da água, até a utilização em técnicas de reprodução assistidas (SILVA; GUERRA, 2011; CHATDARONG, 2017; SILVA et al., 2018). Destacando que, no processo de criopreservação as células espermáticas sofrem alterações osmóticas, com o choque térmico e/ou estresse oxidativo, que colaboram para a diminuição da viabilidade e aptidão fecundante (CHEUQUEMÁN et al., 2018). Para que a criopreservação seja bem sucedida é necessária uma influência mútua de variáveis, tais como: curva de refrigeração, composição de meios diluidores, concentração e agregação de crioprotetores intra e/ou extracelulares e qualidade seminal (LOPES et al., 2015).

Desta maneira, o estudo visa comparar as curvas de resfriamento e envase das amostras de sêmen humano por meio da criopreservação determinando o melhor método de armazenamento e a curva de resfriamento que podem ser utilizados na eficácia aplicabilidade da técnica.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O projeto de pesquisa foi devidamente submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Centro Universitário Campo Real, de acordo com a Resolução 466/12 do Conselho Nacional da Saúde - CNS. A abordagem dos voluntários e a coleta das amostras só foram realizadas após a aprovação pelo referido comitê, com parecer nº 3.395.808.

2.1 POPULAÇÃO E AMOSTRA

A população foi composta por quatorze indivíduos do sexo masculino com relações sexuais ativas, onde três amostras foram descartadas devido ao critério de exclusão de ejaculado inferior a 2 mL, totalizando assim onze amostras viáveis. As amostras de sêmen foram coletadas em casa no frasco coletor estéril e encaminhadas ao pesquisador em até 30 minutos para análise *in natura*, descrita adiante e logo em seguida foram divididas para o processo de criopreservação pelos métodos RP (rápido-palheta), RT (rápido-criotubo), LP (lento-palheta) e LT (lento-criotubo) e por fim criopreservadas.

Os critérios de inclusão dos voluntários foram indivíduos do sexo masculino, com idade superior a dezoito anos e inferior a cinquenta anos e que estejam em abstinência sexual entre três e cinco dias e que concordem participar do estudo. E os critérios de exclusão foram de indivíduos que não aceitem participar do estudo e ou não assinem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), que apresentem diagnóstico de doenças agudas ou crônicas, estejam em uso de medicações, febre nos últimos 30 dias, usuários de drogas, tabagistas, abstinência sexual solicitada pelo pesquisador (3 a 5 dias) e quantidade de ejaculado inferior à 2 mL.

2.2 ESPERMOGRAMA

O espermograma seguiu as normas da 5ª edição do manual da Organização Mundial de Saúde para análise de sêmen humano (WHO, 2010).

2.2.1 pH DO SÊMEN

O pH é avaliado após a liquefação de preferência 30 minutos ou dentro de 1 hora após a ejaculação. Para a avaliação seguiu-se os critérios do manual da OMS misturando a amostra do sêmen, espalhando uma gota uniformemente sobre o papel de pH e aguardando cerca de 30 segundos até a cor se impregnar e torna-se uniforme. Em seguida comparado a faixa de calibração para ler o pH que tem como referência no manual o valor de 7,2 (WHO, 2010).

2.2.2 VISCOSIDADE DO SÊMEN

A viscosidade foi relatada através da introdução de uma vareta de vidro na amostra observando o comprimento do fio que se forma após a remoção. A viscosidade é relatada como anormal se o fio for superior a 2 cm (WHO, 2010).

2.2.3 VOLUME SEMINAL

O volume do ejaculado foi mensurado através da pesagem da amostra no recipiente em que foi coletado. Os resultados dos pesos foram anotados para realizar o cálculo do número de espermatozoides (WHO, 2010). Para isso foi coletado a amostra em um recipiente descartável, limpo e pré-pesado, logo em seguida pesado o frasco com o ejaculado, subtraído o peso do recipiente e a partir disso calculado o peso da amostra considerando que a densidade do sêmen seja de 1 g/mL (AUGER et al., 1995).

2.2.4 MOTILIDADE ESPERMÁTICA

A motilidade espermática do sêmen *in natura* e pós descongelamento foi avaliado segundo os critérios da OMS em microscópio com aumento de 400 vezes. As avaliações pós descongelamentos foram nos primeiros 30 minutos, 60 minutos, 120 minutos e 180 minutos e classificados em motilidade progressiva (PR), motilidade não progressiva (NP) e imotilidade (IM) (WHO, 2010).

2.2.5 VITALIDADE ESPERMÁTICA (teste-hiposmótico)

A avaliação da vitalidade espermática foi realizada pelo método hiposmótico adotando os critérios da OMS, seguindo o manual que relata a necessidade de incubação do meio hiposmótico com a amostra a 37°C por exatamente 30 minutos e depois transferido uma alíquota para a lâmina e foi executada a contagem e replicação (WHO, 2010).

2.2.6 CONCENTRAÇÃO ESPERMÁTICA

A concentração foi avaliada segundo os critérios da OMS, que compreendem em realizar a contagem na câmara de Neubauer de 200 espermatozoides por replicado na em um aumento de 400 vezes e calcular a concentração por mL e o número total de espermatozoides por ejaculado (WHO, 2010).

2.2.7 MORFOLOGIA SEMINAL

Para a avaliação da morfologia seguiu-se os critérios de Kruger (KRUGER et al., 1996), onde a morfologia normal é caracterizada pela cabeça ser lisa e oval, eixo longo da cabeça deve ter entre 5 e 6 μm , enquanto o eixo curto entre 2,5 e 3,5 μm , o acrossoma deve cobrir 40 a 60% da cabeça do espermatozoide, e não pode ter anomalia de peça intermediária

ou cauda e a peça intermediária deve ter menos que 1 µm de largura e até uma vez e meia o comprimento da cabeça do espermatozoide. Sendo necessário a contagem de 200 espermatozoides por replica em ótica com aumento de 1000 vezes e realizado os cálculos.

2.3 CRIOPRESERVAÇÃO

Para a criopreservação foi utilizado o meio crioprotetor Ingá SpermFreezing, da empresa Ingámed-Materiais médicos hospitalares, com a seguinte composição:

Água para injetáveis (H₂O, Diluente), Citrato de sódio (C₆H₅Na₃O₇.2H₂O, Tampão e Nutriente), Frutose (C₆H₁₂O₆, Nutriente), Gentamicina Sulfato 0,1 g/L (C₆OH₁₂₅N₁₅O₂₅S, Conservante), Gema de ovo inativada (Gema de ovo, Crioprotetor), Glicerol (C₃H₈O₃, Crioprotetor), TES (C₆H₁₅NO₆S, Tampão) e TRIS (NH₂C(CH₂OH)₃, Tampão) (INGÁ MATERIAIS HOSPITALARES LTDA, 2019).

O meio foi armazenado segundo as orientações do fabricante, protegido de luz a uma temperatura inferior a -20°C e retirado do freezer antes da utilização, sendo conservado a 37°C durante todo o método de criopreservação (INGÁ MATERIAIS MÉDICOS HOSPITALARES LTDA, 2019).

Após a realização dos critérios do sêmen *in natura* a amostra foi separada para definir a sobrevivência dos espermatozoides, o meio foi adicionado com o volume equivalente à proporção 1:1 (amostra-meio). Que foi padronizado para o estudo sendo 2 mL de ejaculado e 2 mL de meio. Foi necessário realizar a homogeneização lentamente da amostra-meio para não formar bolhas e em seguida transferindo para palhetas 0,25 mL ou criotubos de 2 mL identificados e encaminhados para a criopreservação pelo método lento ou rápido, totalizando assim quatro análises diferentes: RP (rápido-palheta), RT (rápido-criotubo), LP (lento-palheta) e LT (lento-criotubo) e por fim criopreservadas (CAVALCANTE et al., 2006).

Para o método de congelamento lento foram utilizadas quatro palhetas e dois criotubos, foram colocados horizontalmente em compartimento do congelador Freezer Compacto, utilizando um termômetro digital e ajustado para programa de número seis, que apresenta o seguinte padrão de resfriamento: temperatura inicial da amostra em torno de 37°C; resfriamento inicial da amostra em torno de -5,4°C por minuto até -5,7°C, a amostra permanece a -5,7°C durante dez minutos; resfriamento de -1°C por minuto de -5,7°C até -6,5°C no período de 1 hora e cinquenta minutos; a amostra estabiliza a -6,5°C, essa temperatura e permanece até a quarta hora. Após o término do programa, as palhetas e os criotubos foram mergulhados em nitrogênio líquido, a uma temperatura de -196°C (CAVALCANTE et al., 2006).

No congelamento rápido foi utilizado um botijão térmico de nitrogênio líquido. Foi utilizado quatro palhetas de 0,25 mL e dois criotubos de 2 mL foram colocados

horizontalmente, 10cm acima do nível do nitrogênio líquido permanecendo por 10 minutos e, em seguida foram mergulhadas e mantidas por cerca de 24 a 48 horas em um botijão de nitrogênio a temperatura média de -196°C (CAVALCANTE et al., 2006).

2.4 DESCONGELAMENTO

As amostras foram descongeladas em temperatura ambiente, variando de 18°C a 30°C , acima da bancada do laboratório, por um período de dez minutos, e após mantidas em banho-maria a uma temperatura de 37°C por três horas durante o período de análises da motilidade, vitalidade e morfologia, seguindo os mesmos parâmetros do sêmen *in natura* (CAVALCANTE et al., 2006).

2.5 ANÁLISE ESTÁTISTICA

Análises dos grupos com o sêmen *in natura* pelo método não paramétrico pareado Witcoxon. A comparação dos métodos foi feita pelo ANOVA Karust-Waltz seguida com Dumps.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os voluntários apresentaram média de idade de $22,55 \pm 2,94$ anos (variando de 20 a 29). A análise inicial do sêmen *in natura* apresentou o volume (mL) de $3,55 \pm 0,89$ (variando de 2 a 4,757 mL), o pH $7,45 \pm 0,52$, e a concentração ($\times 10^6/\text{mL}$) $286,6 \pm 121,1$ (98 a 409 milhões). A motilidade progressiva (porcentagem de espermatozoides com motilidade progressiva graus A + B, segundo a OMS) apresentou o valor $64,59 \pm 8,32$, não progressiva $17,50 \pm 7,04$ e imotilidade $17,50 \pm 6,11$. Tendo a vitalidade deste critério o valor de $61,95 \pm 7,75$. A morfologia (porcentagem de espermatozoides normais de acordo com o critério de Krüger) com os valores de espermatozoides normais de $2,77 \pm 0,68$ e espermatozoides com defeito na cabeça de $54,73 \pm 13,55$, defeitos na cauda de $26,32 \pm 12,23$, e defeitos na peça intermediária de $13,27 \pm 5,49$ (Tabela 1).

Tabela 1 – Avaliação da média e desvio padrão de sêmen *in natura* e após criopreservação.

Sêmen <i>in natura</i>		Após criopreservação			
		Método rápido	Método lento		
		Palheta (RP)	Criotubo (RT)	Palheta (LP)	Criotubo (LT)
Volume (mL)	$3,55 \pm 0,89$	-	-	-	-
pH	$7,45 \pm 0,52$	-	-	-	-
Conc. ($\times 10^6/\text{mL}$)	$286,6 \pm 121,1$	-	-	-	-

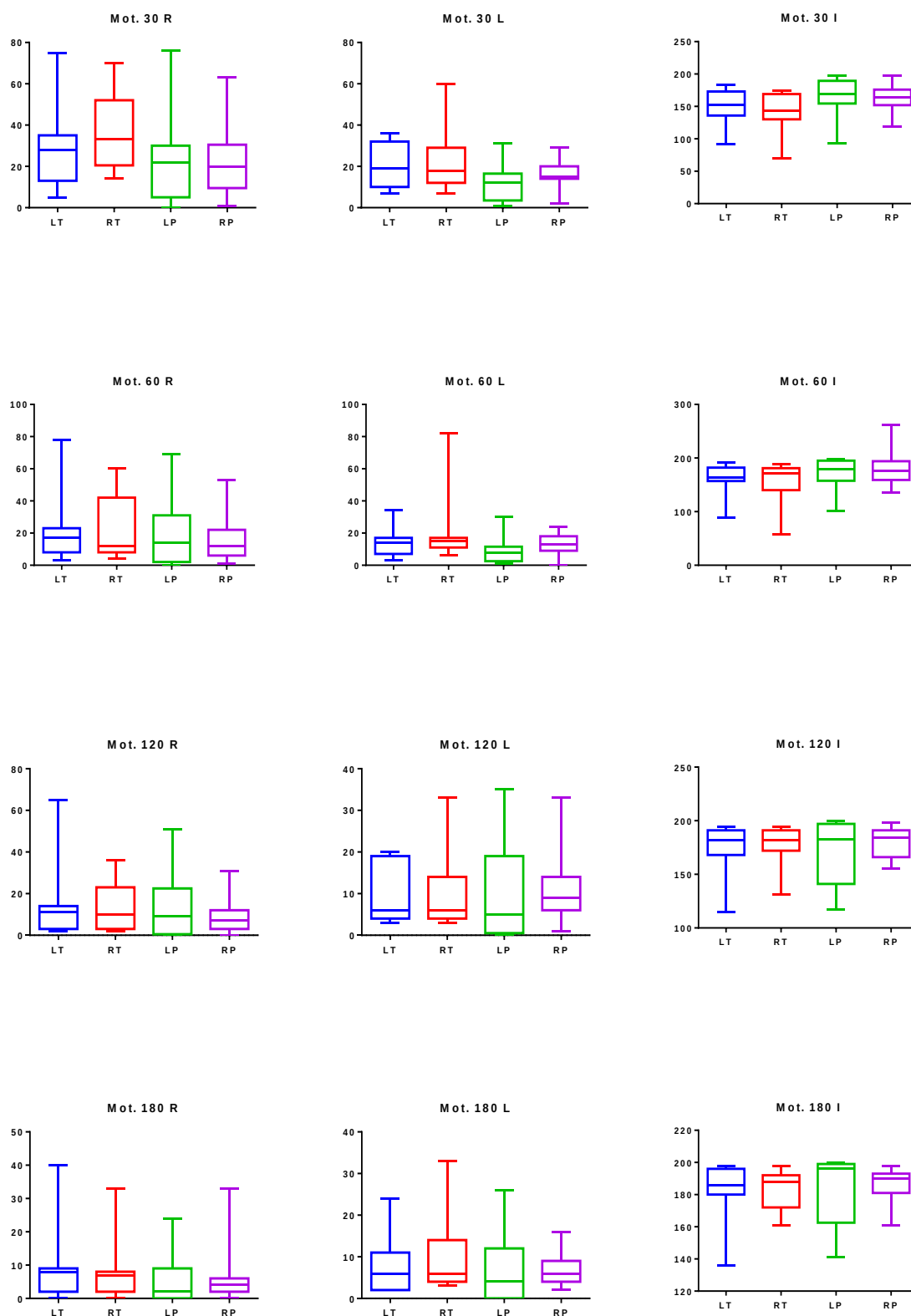
Motilidade (%)									
	P	64,59±							
	R	8,32	-			-	-	-	
<i>In natura</i>		17,50±							
	NP	7,04	-			-	-	-	
	IM	17,50± 6,11	-			-	-	-	
	P					16,91±9	11,14±	13,45±9	
	R	-	11,23±8,22 ^a			,48 ^a	5,41 ^a	,53 ^a	
Mot. 30 min						11,72±7	5,89±4,	10,05±5	
	NP	-	7,91±3,85 ^a			,34 ^b	69 ^b	,47 ^b	
	IM	-	80,95±10,22 ^a			71,77±1	82,89±	76,50±1	
						5,44 ^a	15,78 ^a	3,32 ^a	
	P					11,95±9	9,39±1	10,27±1	
	R	-	8,68±7,62 ^a			,64 ^a	1,20 ^a	0,34 ^a	
Mot. 60 min						9,64±10	4,56±4,	9,91±4,	
	NP	-	6,05±3,56 ^a			,58 ^b	38 ^a	15 ^a	
	IM	-	89,68±16,47 ^a			78,41±1	86,06±	81,45±1	
						8,60 ^a	15,43 ^a	5,08 ^a	
Mot. 120 min	PR	-	4,55±4,30 ^a			6,95±5,	6,78±8,	6,91±8,	
						87 ^a	40 ^a	94 ^a	
	NP	-	5,59±4,66 ^a			4,91±4,	4,94±6,	5,23±3,	
						54 ^a	24 ^b	58 ^a	
	IM	-	90,09±6,87 ^a			88,09±9	86,00±	87,82±1	
						,47 ^a	15,93 ^a	1,22 ^a	
Mot. 180 min	PR	-	3,14±4,57 ^a			4,18±4,	2,78±4,	4,45±5,	
						80 ^a	02 ^a	62 ^a	
	N	-	3,55±2,25 ^a			3,41±2,	3,33±4,	3,14±3,	
	P	-				54 ^a	67 ^a	54 ^a	
	IM	-	93,27±5,10 ^a			92,41±5	91,56±	91,41±8	
						,84 ^a	11,41 ^a	,72 ^a	
Vitalidade (%)		61,95±				44,41±1	39,17±	40,50±1	
Morfologia (%)		7,75	48,68±15,85 ^b			0,89 ^a	12,19 ^b	4,87 ^a	
		2,77±0				2,77±0,	2,56±0,	2,36±0,	
	Normais	,68	2,36±0,60			34	58	39	
Cabeça		54,73±				42,14±1	44,61±	47,55±1	
		13,55	43,45±13,70			2,81	12,03	1,22	
Cauda		26,32±				43,95±1	41,83±	36,14±1	
		12,23				3,24 ^a	14,83 ^b	3,09 ^b	
Peça intermediári		13,27±				11,14±5	10,89±	13,95±5	
a		5,49	10,50±14,31			,41	6,54	,66	

a. Diferença estatística valores altamente significativos comparados com a motilidade inicial do sêmen *in natura* (p<0,01)

b. Diferença estatística valores significativos comparados com a motilidade inicial do sêmen *in natura* (p<0,05)

Fonte: O autor, 2019.

Figura1-Gráficos comparativos da sobrevivência dos espermatozoides pós criopreservação em diferentes intervalos de tempos.



Fonte: O autor, 2019.

Após 30 minutos do descongelamento das amostras que passaram pelo processo rápido e envasadas em palheta (RP), foram obtidos os seguintes resultados: motilidade inicial progressiva de $11,23 \pm 8,22$, motilidade inicial não progressiva de $7,91 \pm 3,85$, e imotilidade de $10,05 \pm 5,47$. Após 60 minutos, motilidade inicial progressiva de $8,68 \pm 7,62$, motilidade inicial não progressiva de $6,05 \pm 3,56$, e imotilidade de $89,68 \pm 16,47$. Após 120 minutos: motilidade inicial progressiva de $4,55 \pm 4,30$, motilidade inicial não progressiva de $5,59 \pm 4,66$, e imotilidade de $90,09 \pm 6,87$. Após 180 minutos: motilidade inicial progressiva de $3,14 \pm 4,57$, motilidade inicial não progressiva de $3,55 \pm 2,25$, e imotilidade de $93,27 \pm 5,10$ (Tabela 1, figura 1). Tendo a vitalidade deste critério o valor de $48,68 \pm 15,85$ (Tabela 1, figura 2). A morfologia com os valores de espermatozoides normais de $2,36 \pm 0,60$ e espermatozoides com defeito na cabeça de $43,45 \pm 13,70$, defeitos na cauda de $43,68 \pm 14,51$, defeitos na peça intermediária $10,50 \pm 14,31$ (Tabela 1, figura 3).

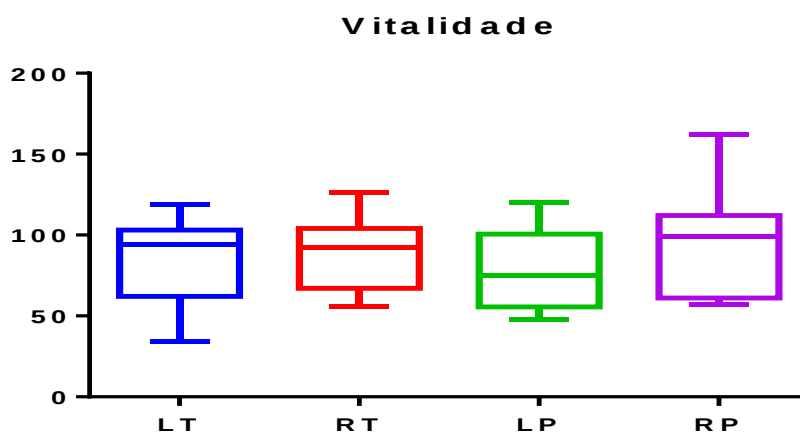
Após 30 minutos do descongelamento das amostras que passaram pelo processo rápido e envasadas em criotubo (RT), foram obtidos os seguintes resultados: motilidade inicial progressiva de $16,91 \pm 9,48$, motilidade inicial não progressiva de $11,72 \pm 7,34$, e imotilidade de $71,77 \pm 5,44$. Após 60 minutos, motilidade inicial progressiva de $11,95 \pm 9,64$, motilidade inicial não progressiva de $9,64 \pm 10,58$, e imotilidade de $78,41 \pm 18,60$. Após 120 minutos: motilidade inicial progressiva de $6,95 \pm 5,87$, motilidade inicial não progressiva de $4,91 \pm 4,54$, e imotilidade de $88,09 \pm 9,47$. Após 180 minutos: motilidade inicial progressiva de $4,18 \pm 40,80$, motilidade inicial não progressiva de $3,41 \pm 2,54$, e imotilidade de $92,41 \pm 5,84$ (Tabela 1, figura 1). Tendo a vitalidade deste critério o valor de $44,41 \pm 10,89$ (Tabela 1, figura 2). A morfologia com os valores de espermatozoides normais de $2,77 \pm 0,34$ e espermatozoides com defeito na cabeça de $42,14 \pm 12,81$, defeitos na cauda de $43,95 \pm 13,24$, defeitos na peça intermediária $11,14 \pm 5,41$ (Tabela 1, figura 3).

Após 30 minutos do descongelamento das amostras que passaram pelo processo lento e envasadas em palheta (LP), foram obtidos os seguintes resultados: motilidade inicial progressiva de $11,14 \pm 5,41$, motilidade inicial não progressiva de $5,89 \pm 4,69$, e imotilidade de $82,89 \pm 15,78$. Após 60 minutos, motilidade inicial progressiva de $9,39 \pm 11,20$, motilidade inicial não progressiva de $4,56 \pm 4,38$, e imotilidade de $86,06 \pm 15,43$. Após 120 minutos: motilidade inicial progressiva de $6,78 \pm 8,40$, motilidade inicial não progressiva de $4,94 \pm 6,24$, e imotilidade de $86,00 \pm 15,93$. Após 180 minutos: motilidade inicial progressiva de $2,78 \pm 4,02$, motilidade inicial não progressiva de $3,33 \pm 4,67$, e imotilidade de $91,56 \pm 11,41$ (Tabela 1, figura 1). Tendo a vitalidade deste critério o valor de $39,17 \pm 13,19$ (Tabela 1, figura 2). A morfologia com os valores de espermatozoides normais de $2,56 \pm 0,58$ e espermatozoides com defeito na cabeça de $44,61 \pm 12,03$, defeitos na cauda de $41,83 \pm 14,83$, defeitos na peça intermediária $10,89 \pm 6,54$ (Tabela 1, figura 3).

Após 30 minutos do descongelamento das amostras que passaram pelo processo lento e envasadas em criotubo (LT), foram obtidos os seguintes resultados: motilidade inicial progressiva de $13,45 \pm 9,53$, motilidade inicial não progressiva de $80,25 \pm 10,22$, e imotilidade de $76,50 \pm 13,32$. Após 60 minutos, motilidade inicial progressiva de $10,27 \pm 10,34$, motilidade inicial não progressiva de $9,91 \pm 4,15$, e imotilidade de $81,45 \pm 15,08$. Após 120 minutos: motilidade inicial progressiva de $6,91 \pm 8,94$, motilidade inicial não progressiva de $5,23 \pm 3,58$, e imotilidade de $87,82 \pm 11,22$. Após 180 minutos: motilidade inicial progressiva de $4,45 \pm 5,62$, motilidade inicial não progressiva de $3,14 \pm 3,54$, e imotilidade de $9,41 \pm 8,72$ (Tabela 1, figura 1). Tendo a vitalidade deste critério o valor de $40,50 \pm 14,87$ (Tabela 1, figura 2). A morfologia com os valores de espermatozoides normais de $2,36 \pm 0,39$ e espermatozoides com defeito na cabeça de $47,55 \pm 11,22$, defeitos na cauda de $36,14 \pm 13,09$, defeitos na peça intermediária $13,95 \pm 5,66$ (Tabela 1, figura 3).

A vitalidade possui um valor mais expressivo pelo envase em palheta independentemente do método utilizado, sendo rápido ou lento (Tabela 1). E na comparação entre os métodos pós descongelamento não teve alterações estatisticamente diferentes (Figura 2).

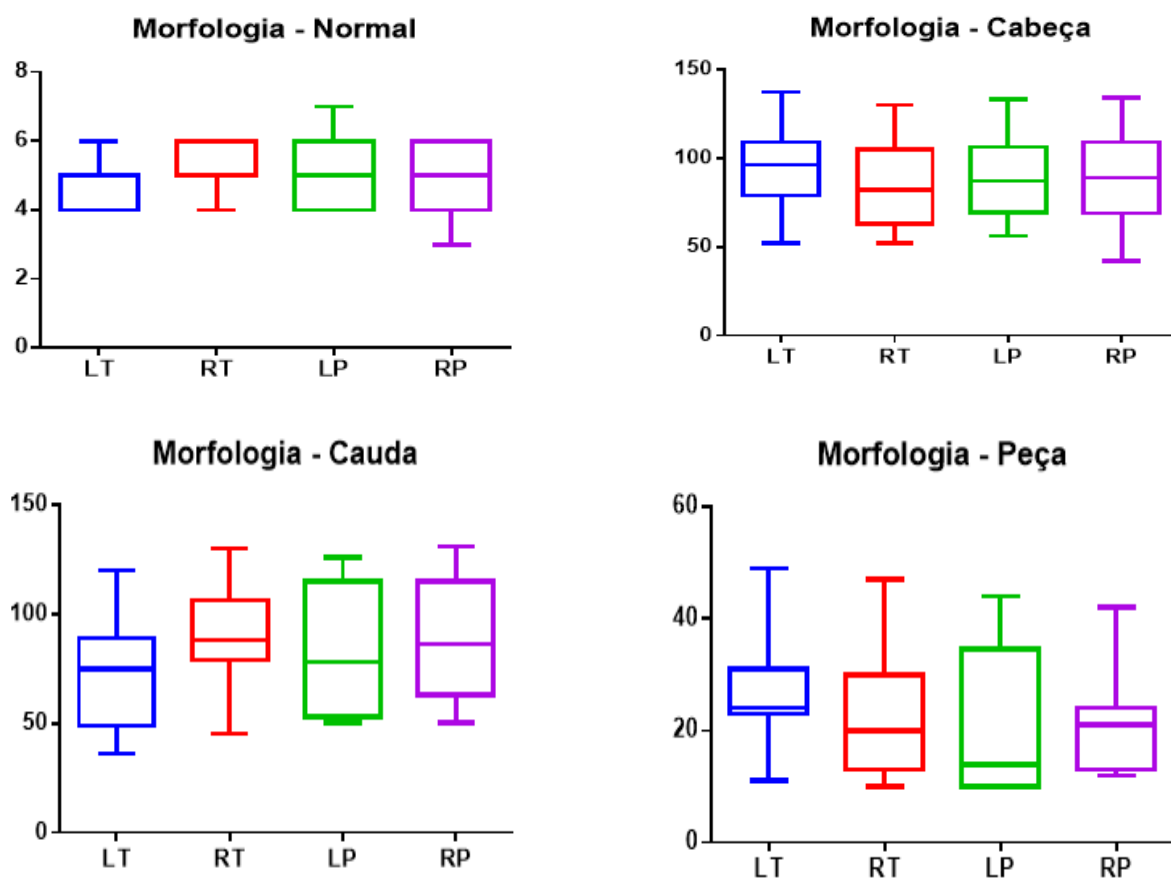
Figura 2 - Gráfico comparativo da vitalidade dos espermatozoides após a criopreservação em diferentes intervalos de tempo e envase.



Fonte: O autor, 2019.

A morfologia permaneceu constante em relação aos espermatozoides normais do sêmen *in natura* em todos os parâmetros analisados em diferentes períodos de tempo e de envase (Tabela 1). Apesar de após a criopreservação, ocorrer um aumento significativo de defeitos na cauda, apresentando o valor de $26,32 \pm 12,23$ no sêmen *in natura*, sendo o mais significativo o método lento por apresentar $p < 0,05$, e o menos significativo o método rápido apresentando $p < 0,01$ (Tabela 1, figura 3).

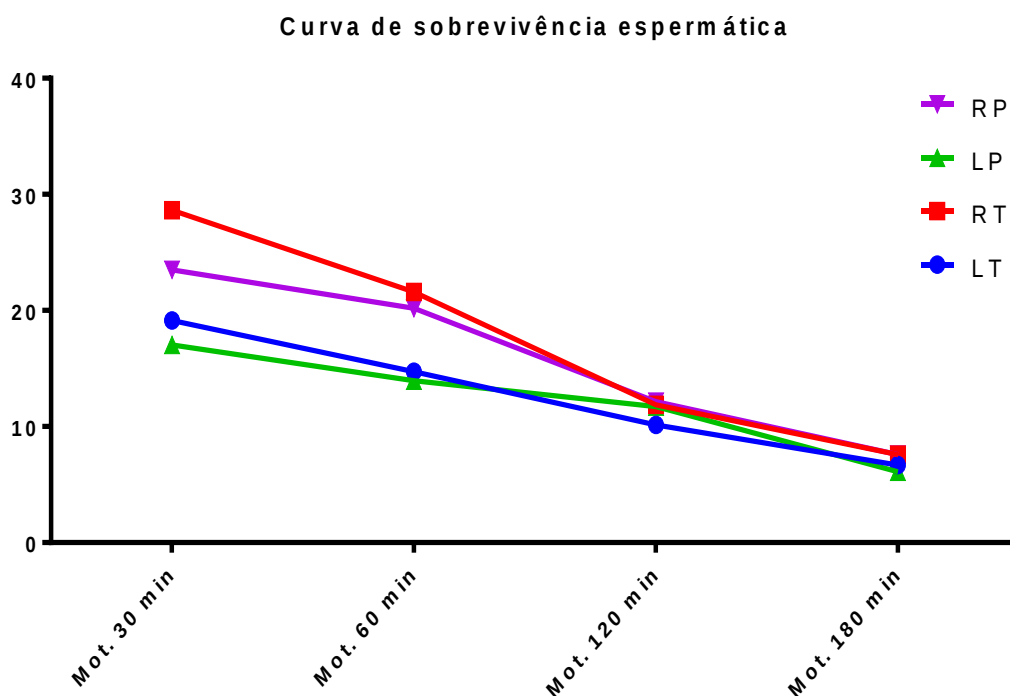
Figura 3-Gráficos comparativos das alterações morfológicas na qualidade seminal em diferentes tipos de envase e curva de resfriamento.



Fonte: O autor, 2019.

Quando realizado a curva de sobrevivência espermática é possível notar que ocorre a redução da motilidade com o passar do tempo em todos os tipos de envase e na análise estatística demonstra que não há diferença entre ambos os aspectos analisados pós criopreservação (Figura 4).

Figura 4 - Curva de sobrevivência dos espermatozoides após criopreservação em diferentes tipos de congelamento e envase; RP ou RT = congelamento pelo método rápido e envasado em palheta ou em criotubo; LP ou LT = congelamento pelo método lento e envasado em palheta ou em criotubo.



Fonte: O autor, 2019.

A quantidade de estudos existentes que investigam a influência de diferentes tipos de envase na qualidade dos espermatozoides após o processo de criopreservação de sêmen humano ainda é escassa. Cavalcante afirma em seu estudo que, o melhor tipo de envase seria o criotubo por meio do método de congelamento lento, contradizendo este estudo onde se pode observar por meio de dados estatísticos que não há diferença significativa entre a forma de envase, palheta ou criotubo e o método rápido ou lento, dados que corroboram com o estudo de Tchachil e Jewett (1981). Ainda existem relatos de estudos sobre uma maior motilidade quando utilizado o método lento (FLORENCIO, et al., 1955; TAYLOR et al., 1982; RAGNI et al., 1990), que é contraditório com o estudo que afirma a redução da motilidade em todos os parâmetros analisados.

O processo de criopreservação, além da alteração da viabilidade celular (BRISKO, VARNER, 1993) se não realizado corretamente pode acarretar danos fisiológicos nos espermatozoides, inviabilizando os mesmos. Por isso, é fundamental manter estabilizada a temperatura do Freezer Compacto assim contribuindo para condições ideais do processo, para que a curva de congelamento seja lenta evitando desidratação ligeira dos espermatozoides e rápida o suficiente para que o contato dos espermatozoides com o soluto

utilizado seja breve, impedindo a formação de grandes cristais de gelo (SNOECK, 2003), assim como também realizar o processo de descongelamento em temperatura ambiente (STANIC et al., 2000; FLORÊNCIO et al., 1995). Indo contra a ideia de Verheyen et al (1993) onde afirmou um melhor resultado utilizando a temperatura de 37°C para descongelamento.

Quando analisado a motilidade do sêmen *in natura* e relacionando o seu aspecto de anormalidade ocorre um aumento no defeito da cauda em todos os parâmetros onde o estudo de segundo o BARTH e OKO (1989) uma alta incidência de um único defeito podem vir a reduzir a fertilidade.

4. CONCLUSÃO

O estudo comparou as curvas de resfriamento e envase das amostras de sêmen humano por meio da criopreservação determinando que a motilidade e vitalidade espermática diminuem independentemente do tipo de envase e do método de congelamento. Mas quando analisado os parâmetros de anormalidade na morfologia após a criopreservação ocorre um aumento no número de espermatozoides com defeito na cauda. Mas isso não é determinante para relatar a melhor curva de resfriamento e o tipo de envase. De acordo com a análise estatística o tipo de envase criotubo ou palheta e o método de congelamento rápido e lento não se diferem, assim não sendo possível estabelecer qual método tem melhor eficácia no processo de criopreservação.

REFERÊNCIAS

- AUGER, J., Kunstmann, J. M., Czyglik, F., & Jouannet, P. (1995). Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *New England Journal of Medicine*, 332(5), 281-285.
- BARTH, A.D.; OKO, R.J. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Ed. Mas Iowa: State University Press, 1989. 285 p.
- BRINSKO, S.P.; VARNER, D.D. Artificial insemination. In: McKINNON, A.O.; VOSS, J.L. (Eds.) Equine reproduction. Philadelphia: Williams & Wilkins, 1993. p. 790-797.
- CAVALCANTE, M. B., Duarte, A. B. G., Araújo, D. O. D., & Teles, E. P. D. B. (2006). Criopreservação de sêmen humano: comparação entre métodos de congelamento e tipos de envase. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, 28(12), 708-714.
- CHATDARONG, K. Retained fertilizing capability in cryopreserved feline spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 52, n. 2, p. 261-264, 2017.
- CHEUQUEMÁN, C.; FAÚNDEZ, R.; SÁNCHEZ, R. et al. Changes in sperm function and structure after freezing in domestic cat spermatozoa. *Andrologia*, v. 50, n. 9, e13080, 2018.
- CLÍNICA GERA. Infertilidade: masculina, feminina e tratamentos, São Paulo, 22 maio 2018. Disponível em: . Acesso em: 05 out. 2019.
- FLORENCIO RS, Santos FC, Cunha GB, Costa IA, Rocha JP. Efeitos do congelamento de sêmen humano e temperatura de descongelamento sobre motilidade e morfologia. *Reprod Climat.* 1995;10(1):24-6.
- HOVATTA, O. (2003). Criobiologia do tecido ovariano e testicular. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynecology*, 17 (2), 331-342.
- INGÁ SPERM FREEZING: crioprotetor. Fernanda Kiyoko Ono. Local: Ingá Materiais Médico Hospitalares Ltda, [2019]. Bula de remédio.
- KRUGER, Thinus F. et al. Sperm morphologic features as a prognostic factor in vitro fertilization. *Fertility and sterility*, v. 46, n. 6, p. 1118-1123, 1986.
- LEWIS, Ricki, Genética Humana: conceitos e aplicações. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
- LOPES, J. T.; PINHEIRO, J. P. R.; NUNES, L. T. et al. Avaliação de diferentes crioprotetores e taxas de diluição na criopreservação seminal de *Prochilodus brevis*. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 38, n. 3, p. 170-175, 2015.
- MARTINS, Eduardo Felipe; FREIRE, Vanessa Cristina; SANTOS, Thalita Grazielly; PÁDUA, Karina Maciel; BERNARDES, Nicole Blanco; SILVA, Alessandra Bonacini Cheraim. Influência de Patologias na Fertilidade Feminina. *Id on Line Rev. Mult. Psic.*, Outubro/2019, vol.13, n.47, p. 1161-1181. ISSN: 1981-1179.
- NALLELLA, K. P., Sharma, R. K., Allamaneni, S. S., Aziz, N., & Agarwal, A. (2004). Cryopreservation of human spermatozoa: comparison of two cryopreservation methods and three cryoprotectants. *Fertility and sterility*, 82(4), 913-918.
- RAGNI G, Caccamo AM, Dalla Serra A, Guercilena S. Computerized slow-staged freezing of semen from men with testicular tumors or Hodgkin's disease preserves sperm better than standard vapor freezing. *Fertil Steril*. 1990;53(6):1072-5.

RÊGO, Iris P. Rodrigues, FERREIRA, Livia Pena; AZEVEDO, Fabiano Uba; FRANÇA, Rafaela Ferreira. Reprodução assistida: a evolução da reprodução no campo da reprodução humana. Revista Saúde em Foco, edição 11. p. 1-18, 2019.

SILVA, S. V.; GUERRA, M. M. P. Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. Revista Brasileira de Reprodução Animal, v. 35, n. 4, p. 370-384, 2011.

SILVA, H. V. R.; SILVA, A. R.; DA SILVA, L. D. M. et al. Semen cryopreservation and banking for the conservation of neotropical carnivores. Biopreservation and biobanking, v. 17, n. 2, p. 183-188, 2018.

SNOECK, P. P. N. Aspectos da criopreservação de sêmen equino: composição do meio diluidor, curvas de congelação e fertilidade. 2003. 116f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2003.

STANIC c P, Tandara M, Sonicki Z, Simunic V, Radakovic B, Suchanek E. Comparison of protective media and freezing techniques for cryopreservation of human semen. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2000;91(1):65-70.

TAYLOR PJ, Wilson J, Laycock R, Weger J. A comparison of freezing and thawing methods for the cryopreservation of human semen. Fertil Steril. 1982;37(1):100-3.

THACHIL, J. V; JEWETT, M. A. Preservation techniques for human semen. Fertil Steril. 1981;35(5):546-8

VERHEYEN, G; PLETINCX, I; VAN STEIRTEGHEM, A. Effect of freezing method, thawing temperature and post-thaw dilution/washing on motility (CASA) and morphology characteristics of high-quality human sperm. Hum Reprod. 1993;8(10):1678-84.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 2010.