

Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa

**Optimização de Técnicas de Processamento
de Sémén Criopreservado**

Aluno

Micaela Josefa Pedro Fernandes

Orientador

Doutora Carina Ladeira - Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa

Orientador

Doutor Miguel Gallardo Molina - Laboratório de Reprodução Assistida Ginemed Lisboa

Mestrado em Tecnologias Clínico-Laboratoriais

Lisboa, 2021

Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa

**Optimização de Técnicas de Processamento
de Sémén Criopreservado**

Aluno

Micaela Josefa Pedro Fernandes

Orientador

Doutora Carina Ladeira - Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa

Orientador

Doutor Miguel Gallardo Molina - Laboratório de Reprodução Assistida Ginemed Lisboa

Juri

Doutora Patrícia Rodrigues - Especialista em Embriologia e Reprodução Humana

Mestrado em Tecnologias Clínico-Laboratoriais

Lisboa, 2021

Sempre a minha mãe

~v~

Agradecimentos

A conclusão deste trabalho não seria possível sem o apoio e contributo de vários elementos aos quais presto o meu agradecimento:

A todos os colegas de mestrado e todas as equipas da Ginemed, sinto-me grata a todos pelo profissionalismo e dedicação e camaradagem, em especial aos meus colegas de laboratório.

Um agradecimento ao Doutor Miguel Gallardo, colega e co-orientador, pelas correções, análises, tempo despendido, paciência, notas de rodapé, reparos, retrocessos. No fundo, subtis avanços que compõem esta tese e que profundamente agradeço.

Um agradecimento à Professora Orientadora Doutora Carina Ladeira, pelo acompanhamento, dedicação, carinho e, muito em especial, por ter o dom de passar o conhecimento e ser o mestre do qual nunca se esquece um ensinamento.

À minha família, em particular aos meus sogros e cunhados.

Um obrigada, com todo o coração aos meus irmãos: Gonçalo, Estela, aos gémeos: "os meninos" João e Raquel e aos meus lindos sobrinhos: Rúben, Fábio, Noah, André, Guilherme e pequenas Ema e Carmo. A estes só posso agradecer por me fazerem sorrir todos, mas todos os dias e alimentarem o meu coração e a minha fé no futuro.

Minha Poquitas: Obrigada por tudo. Desde o tempo dos "olás" e até ao infinito, seremos sempre amigas e irmãs.

Ao amor de uma vida inteira, pelo qual seria impossível discorrer todo o agradecimento que mereces.

É difícil colocar um *obrigada* a quem vive em tudo o que faço. A vida ficou realmente melhor e mais bonita quando a passei a ver através dos teus olhos verdes.

O maior agradecimento à Anita, que é pai e é Mãe.

Obrigada, mãe, que, com o teu sangue, suor e lágrimas, transformaste o nada, que era certo, em tudo.

Resumo

Introdução: A preservação de espermatozóides tem sido efectuada nos laboratórios de procriação medicamente assistida (PMA) com recurso ao *Slow-Freezing*, técnica *gold standard* para a criopreservação de gâmetas masculinos. No entanto, esta técnica não está isenta de inconvenientes: a citotoxicidade dos crioprotectores, a morosidade de processamento e oneroso investimento dos aparelhos automatizados. Estudos científicos emergem e apontam para a técnica de vitrificação como uma alternativa à criopreservação de espermatozoides mediante *Slow-Freezing*, desviando-se das limitações desta técnica.

Objetivo: Com recurso à técnica de vitrificação, o objetivo desta investigação é o de delinear um protocolo de vitrificação de rápida execução e de obtenção de taxas de recuperação de espermatozoides moveis, viáveis na utilização de técnicas de PMA.

Metodologia: Este é um estudo experimental, de amostragem não probabilística e racional para análise das taxas de sobrevivência dos espermatozóides, após exposição de amostras a diferentes concentrações de soluções de sacarose, trealose e glicerol e após o processo de vitrificação ultrarrápida e aquecimento, avaliando diferentes suportes de vitrificação, tempos de exposição e temperaturas de aquecimento de modo a obter uma razão entre estas variáveis que permita desenhar um protocolo base para a vitrificação de espermatozóides.

Os resultados foram tratados com Microsoft Excel®, no domínio da estatística descritiva e, para inferência estatística, com One-Way Anova na análise do efeito crioprotetor das diferentes soluções.

Resultados: A solução de sacarose de 0,1M, apresenta entre as soluções a estudo e após exposição até 5 minutos, um melhor efeito crioprotetor até ao mergulho em azoto líquido em suporte de Cryotop®.

O aquecimento do produto de vitrificação é exequível em gota de 5 µL de solução tamponada, a 37°C ou à temperatura ambiente desde que o aquecimento seja realizado em caixa e com sobreposição de óleo mineral.

Conclusão: Este estudo revela que se é possível gradualmente transferir a abordagem de criopreservação no sentido da vitrificação de espermatozóides elaborando um protocolo de fácil execução, para utilização em tratamentos procedimentos de PMA.

Palavras-chave: Vitriificação, Cryotop®, Espermatozóides, Sacarose, Trealose
Tecnologias de Reprodução Assistida.

Abstract

Introduction: Sperm preservation has been carried out using the Slow-Freezing technique, defined by the World Health Organization, as the gold standard of sperm cryopreservation. Despite the definition and dissemination of Slow-Freezing protocols by assisted reproductive laboratories, the cytotoxicity of cryoprotectants used, the time-consuming processing and expensive investment. Increasingly, scientific studies point to the technique of vitrification as an alternative to the cryopreservation of sperm, which deviates from the limitations of Slow-Freezing and also exceeds some of the limitations of Slow-Freezing because It is effective for a broader specter of samples.

Objective: Using the vitrification technique, the objective of this research is to define protocol with high survival rate based on motility.

Methodology: This is an experimental, non-probabilistic and rational sampling study for evaluation of survival rates, based on motility, after exposure of samples to different solutions of sucrose, trehalose and glycerol for determination of cryoprotectant medium, vitrification support, exposure time and heating temperature suitable for an optimized protocol.

The data obtained were treated with Microsoft Excel for descriptive statistics and with One-Way Anova for statistical comparison of the cryoprotectant effect of the different solutions.

Results: The results of this experimental work suggest that, of all the solutions, the 0.1M sucrose solution is adequate to exert the cryoprotective effect and that, the balance between this protective and cytotoxic effect is maintained up to 5 minutes after exposure of the sample before the dip in liquid nitrogen. Cryotop support is suitable for vitrification and thaw of 1 µL of sample. The thawing of the vitrified product is feasible in a drop of 5 µL, at 37°C or at room temperature provided that the thawing is perform in a dish with mineral oil overlap.

Conclusion: This study revealed that it is possible to transfer the sperm vitrification approach to a new paradigm by elaborating an easy-to-execute protocol, less time consumption and practical recovery rates that can be use directly in ART treatments.

Tags: Vitrification, Cryotop®, Sperm, Sucrose, Assisted Reproduction Technologies.

Índice geral

1	Introdução	1
2	Objetivos	4
3	Enquadramento Teórico	5
3.1	Sistema Reprodutor Masculino	5
3.1.1	Espermatogénese	7
3.1.2	Estrutura do Espermatozóide	9
3.2	Preservação da Fertilidade Masculina	10
3.3	Criopreservação	12
3.3.1	Agentes Crioprotetores	12
3.3.1.1	Tipos de Agentes Crioprotetores	13
3.3.2	Temperaturas de Fusão e Transição Vítreas	14
3.4	Técnicas de criopreservação de espermatozoides	15
3.4.1	Slow-Freezing	15
3.4.2	Vitrificação	16
4	Materiais e Métodos.....	19
4.1	Local do estudo.....	19
4.2	Tipo de estudo	19
4.3	Variáveis	19
4.4	População-alvo e amostra	19
4.5	Seleção de amostras	19
4.6	Critérios de exclusão	20
4.7	Procedimentos laboratoriais	20
4.7.1	Pré Processamento	20
4.7.1.1	Avaliação de amostras	20
4.7.1.2	Obtenção da FEM.....	21
4.7.1.3	Estudo do modo arrefecimento e suportes	21

4.7.2 Avaliação dos parâmetros do protocolo	24
4.7.2.1 Soluções crioprotetoras	24
4.7.2.2 Tempo de exposição às soluções.....	26
4.7.2.3 Determinação de tempo mínimo de exposição.....	26
4.7.3 Aquecimento	26
4.8 Considerações éticas e legais	28
4.9 Análise estatística	28
5 Resultados	29
5.1 Tempo e exposição às soluções	29
5.2 Determinação de tempo mínimo de exposição	33
5.3 Aquecimento	34
6 Discussão	36
7 Considerações finais	41
8 Referências bibliográficas	43
Apêndices	49

Índice de tabelas

Tabela 1- Detalhe de composição das soluções de criopreservação	25
Tabela 2- Motilidade após exposição a crioprotetores e vitrificação.....	29
Tabela 3- Materiais, equipamento e meios	57

Índice de figuras

Figura- 3.1 Sistema Reprodutor Masculino	5
Figura- 3.2 Detalhe dos tubos seminífero	6
Figura 3.3 Ciclo de espermatogénese	8
Figura 3.4 Estrutura de Espermatozoide.	9
Figura 3.5- Diagrama de fase para diferentes concentrações de crioprotetor	14
Figura 3.6- Pontas de micropipetas da marca RI®	17
Figura 3.7- Cryotop® e respetiva tampa	18
Figura 4.1 A- Ponta de stripper carregada	22
Figura 4.2-Cryotop exposto a vapores de azoto	23
Figura 4.3- Processamento em Cryotop®	24
Figura 4.4- Modo de aquecimento após vitrificação	27
Figura 4.5- Esquema de Design do Protocolo.....	28
Figura 5.1 Gráfico comparativo da resposta à exposição ao glicerol	30
Figura 5.2 Gráfico comparativo da resposta à exposição a trealose	31
Figura 5.3 Gráfico comparativo da resposta à exposição a sacarose	32
Figura 5.4 Gráfico comparativo de meios de melhor motilidade	33
Figura 5.5- Gráfico de exposição a sacarose 0,1M ao minuto	34
Figura 5.6- espermatozoides suspensos em tampão	35

Lista de abreviaturas

Aqc	Aquecimento
ART	Tecnologias de Reprodução Assistida
ATP	Adenosina Tri-fosfato
CPA	Crioprotectores
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ESTESL	Escola Superior de Tecnologias da Saúde de Lisboa
FEM	Fração de Espermatozóides Móveis
FIV	Fertilização <i>In Vitro</i>
<i>FSH</i>	Hormona Folículo-Estimulante
HIV	Vírus de Imunodeficiência Humana
HPC	Hidroxipropil-celulose
ICSI	Injeção intracitoplasmática de espermatozóides
IUI	Inseminação intrauterina
LH	Hormona Luteinizante
Min	Minuto
npCPA	Crioprotectores não permeáveis
NPrGs	Não progressivos
OMS	Organização Mundial de Saúde
pCPA	Crioprotectores permeáveis
PEG	Polietilenoglicol
PMA	Procriação Medicamente Assistida
Prgs	Progressivos
PVP	Polivinilpirolidona
SAC	Sacarose
SpB	Solução Tampão Sperm Buffer
SPZ	Espermatozóides
SSC	Spermatogonial Stem Cells
Tg	Temperatura de transição vítrea
Th	Temperatura de nucleação heterogénea
Tm	Temperatura de fusão
TS	Trealose
TYB	Meio de congelação comercial
Vit	Vitrificação
ZP	Zona Pelúcida

1. Introdução

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 48 milhões de casais e 186 milhões de indivíduos em todo o mundo vivem com infertilidade (1); vista como um dos problemas sociais mais graves com que se defrontam os países desenvolvidos tendo, a curto ou médio prazo, implicações quer psicológicas – stress, trauma, relacionais - quer económicas (2).

A infertilidade é definida como uma doença do sistema reprodutivo masculino ou feminino da qual resulta a incapacidade de alcançar uma gravidez após 12 meses ou mais de relações sexuais regulares desprotegidas (3).

De todos os casos de infertilidade do casal, aproximadamente 50% são devido à existência da componente de fator masculino (2), isto é, quando um componente da causa de infertilidade é identificada no parceiro masculino (4). As causas da infertilidade masculina são múltiplas, alavancadas, tanto por fatores biológicos: doenças, mutações genéticas, alterações nos mecanismos de produção, alterações imunológicas, anomalias genéticas, hormonais, dificuldades erétil e de ejaculação; como de fatores sociais relacionados com estilos de vida e fatores ambientais como poluição, exposição ocupacional a desreguladores endócrinos, entre outros (5).

O exame laboratorial preditivo para aferir a presença do factor masculino é o espermograma, o qual, de acordo com as diretrizes da OMS, pode caracterizar o tipo de amostra como sendo de baixa concentração (oligozoospermia), baixa mobilidade (astenozoospermia), morfologia anormal do espermatozóide (teratozoospermia), uma combinação de pelo menos duas destas deficiências ou normozoospermia, na qual todos os parâmetros estão acima dos valores de referência definidos pela OMS (6,7).

Apesar de conhecidas as causas de uma grande percentagem dos casos de infertilidade masculina, persiste uma quantidade significativa cuja origem é idiopática isto é, nenhuma causa ou tratamento podem ser utilizados para explicar ou reverter a causa de infertilidade (8,9).

A abordagem clínica masculina pode ser realizada de duas formas: via da terapia farmacológica, estando esta opção condicionada pela duração da terapêutica, dada a necessidade de englobar pelo menos um ciclo de espermatogénese (média 74 dias), de forma a averiguar a melhoria da qualidade do sémen; quer pela

morosa e incerta tradução da terapêutica em sucesso concecional (10). Outra forma é uma abordagem mais incisiva e imediata, com recurso a técnicas de procriação medicamente assistida (PMA) como a inseminação intrauterina (IUI), a fertilização *in vitro* (FIV) e/ou injeção intracitoplasmática de espermatozóides (ICSI)(11,12).

Com o desenvolvimento das Tecnologias de Reprodução Assistida (ART) realizadas em centros de PMA, as técnicas de criopreservação passam a oferecer a possibilidade de conservação e acumulação de gâmetas de uma ou mais dâdivas autólogas e heterólogas e a sua aplicação nos tratamentos de infertilidade (13).

A criopreservação de sémen tem por objetivo a manutenção do potencial reprodutivo permitindo estabilizar as células a temperaturas criogénicas recorrendo geralmente à técnica de *Slow-Freezing* e Vitrificação (14).

A técnica de *Slow-Freezing*, técnica *standard* recomendada pela OMS, é de arrefecimento lento, com sucesso em amostras com concentração elevada de espermatozóides demonstrando, no produto final. No entanto a criopreservação mediante esta técnica revela uma diminuição da qualidade da amostra a nível de perda de integridade membranar, diminuição da motilidade e o aumento de espécies oxidativas de oxigénio, resultado do manuseamento e da formação de cristais de gelo advindos do processo de criopreservação-descongelação que, podem levar à redução da viabilidade espermática (15).

Se uma diminuição de viabilidade em amostras normospérmicas é expectável e exequível para processamento de técnicas de PMA, nos casos de amostras valiosas, nomeadamente amostras com baixas contagens de espermatozóides, quando submetidas a processamentos criogénicos, o dano é maior, o que, muitas vezes, não proporciona a recuperação de espermatozóides viáveis no resultado final (16).

A nível laboratorial, as contrapartidas de um insucesso da criopreservação resumem-se à duplicação todos os meios técnicos e humanos todavia, para os pacientes, para além dos recursos monetários implicados, o sentimento de angústia, falha e culpa confere uma acrescida ansiedade ao indivíduo, o que pode afetar negativamente o funcionamento hormonal, neurológico, endócrino e imunológico, sendo por vezes necessário abrir a hipótese de recurso a dadores ou até mesmo à desistência do plano de parentalidade (17).

A vitrificação é um processo termodinâmico de rápida variação de temperatura, que tem enorme sucesso na preservação de óvulos e embriões.

A vitrificação permite a solidificação das células e do meio extracelular num estado vítreo que, através da indução pelo arrefecimento de soluções aquosas eleva a viscosidade levando à transição do estado líquido para o estado vítreo (18).

É uma técnica que, face ao processo clássico de criopreservação, introduz um novo potencial de conservação para amostras tão diminutas quanto a criopreservação de um único espermatozóide, contribuindo assim para melhores taxas de recuperação (19) e uma vez que teoricamente que não permite a formação de cristais de gelo aquando do processamento da técnica, ultrapassa uma das maiores limitações do *Slow-Freezing*.

Apesar da eficácia deste método, a sua aplicação é restrita dado não existirem estudos científicos que corroborem a definição de um protocolo *standard* de vitrificação de espermatozoides muito embora pesquisas tenham vindo cada vez mais a revelar resultados favoráveis demonstrando a necessidade da continuação da exploração da técnica e das suas vertentes, existindo atualmente o relato de fecundações e gravidez de sucesso advindos de espermatozoides vitrificados (20).

2. Objetivos

Tendo por base as técnicas de processamento de esperma com especial incidência na vitrificação e a conjugação das suas variáveis de maior impacto, o objetivo geral desta investigação é delinear um protocolo base de vitrificação de rápida execução e de elevada taxa de recuperação de espermatozoides para amostras de sémen normozoospérmicas.

Com esta finalidade o estudo passará pelos seguintes objetivos gerais específicos:

a) Determinar qual a solução de vitrificação - soluções de sacarose 0,25M; 0,5M; 0,1M; solução comercial de glicerol solução comercial de trealose diluída de 1:2; 1:5 e 1:10 - que traduz as mais elevadas as taxas de sobrevivência, com base na motilidade, após exposição.

b) Determinar qual a solução de vitrificação - soluções de sacarose 0,25M; 0,5M; 0,1M; solução comercial de glicerol; solução comercial de trealose diluída de 1:2; 1:5 e 1:10 - que traduz as mais elevadas as taxas de sobrevivência, com base na motilidade após vitrificação e aquecimento.

c) Estabelecer o tempo ótimo de contacto da amostra com a solução crioprotetora antes do arrefecimento.

d) Aferir o modo e temperatura de aquecimento recorrendo à análise da sobrevivência espermática numa solução tamponada a diferentes temperaturas: temperatura ambiente e a 37 °C.

e) Delinear qual a combinação das variáveis estudadas que traduz taxas de recuperação mais eficientes nas amostras normozoospérmicas e elaboração dum protocolo normalizado de trabalho.

3. Enquadramento Teórico

3.1 Sistema Reprodutor Masculino

O sistema reprodutor masculino é responsável pela síntese e secreção de hormonas masculinas, pela ininterrupta produção, nutrição e armazenamento de gametas e pela condução dos gâmetas através do sistema reprodutor feminino para a fertilização (21).

É internamente constituído por ductos (uretra, *rede testis*, epidídimo, vas deferens), glândulas acessórias (vesículas seminais, a glândula prostática e bulborectal) e, externamente, pénis e testículos (figura 3.1).

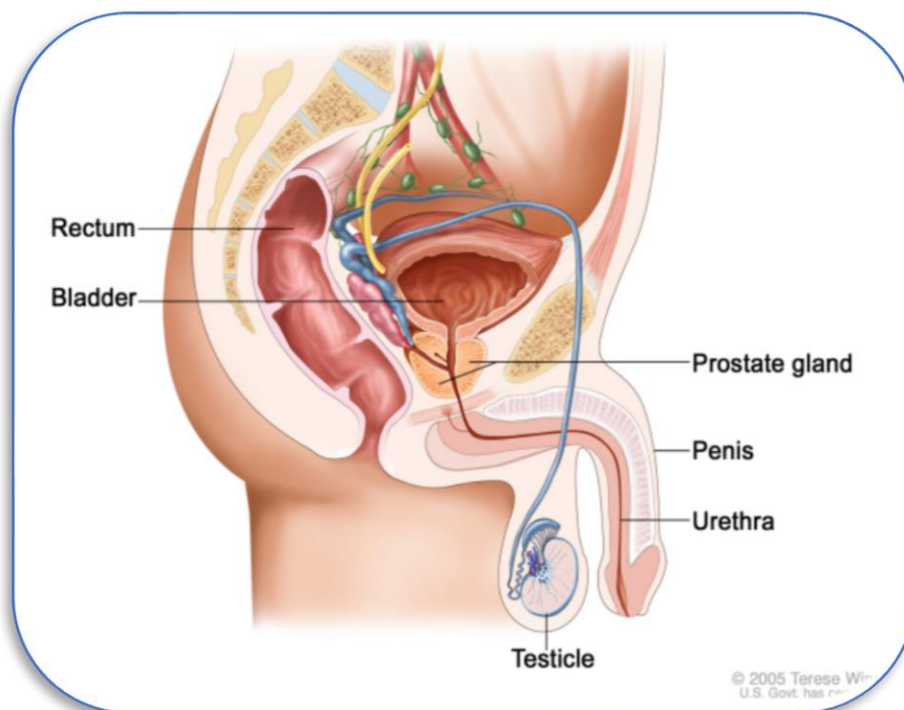


Figura- 3.1 Sistema Reprodutor Masculino. Imagem retirada e adaptada de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK82221/>

O pênis, o órgão genital masculino, tem duas funções: sexual e urinária. Está localizado acima do escroto, ligado à sínfise púbica e é constituído por três cilindros, integrado por dois corpos de tecido vascular - *corpora cavernosa* e o *corpus spongiosum* (22). A uretra percorre a maior parte do seu comprimento.

O testículo é um órgão par, responsável pela produção quer de esperma, controlado pela FSH, quer de testosterona, controlada pela LH da glândula pituitária anterior (23).

Encontra-se localizado no saco escrotal, fora da cavidade abdominal. Esta localização é importante pois permite a manutenção de uma temperatura média abaixo da temperatura do corpo, na ordem dos 2-4°C, temperatura essa, ideal à espermatogénese (24).

É envolto pela túnica albugínea, que espessa posteriormente dando origem ao mediastino testicular, do qual se projectam septos fibrosos para o parênquima, dividindo o testículo em lóbulos que contém túbulos seminíferos (25).

Os túbulos seminíferos (figura 3.2) são as unidades de produção de células espermáticas bem como a génese da estrutura tubular que, através dos ductos eferentes transportam as células espermáticas ao epidídimo, para que possam amadurecer e incorporar mitocôndrias que lhes conferem a maquinaria necessária para a produção de energia sob a forma de adenosina tri-fosfato (ATP) (26).

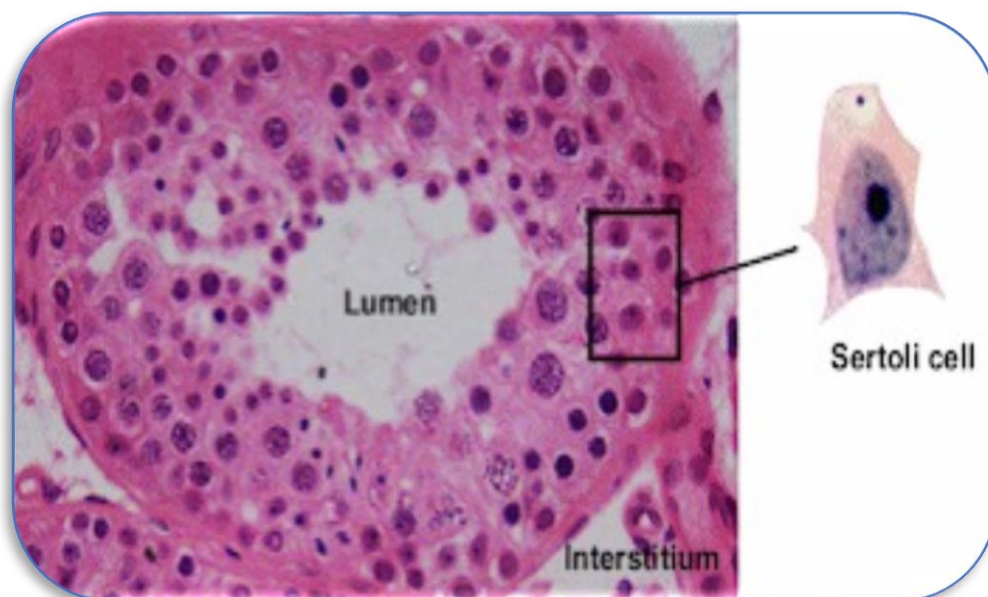


Figura- 3.2 Detalhe dos tubos seminíferos. Imagem retirada e adaptada de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279031/>

As células de Sertoli são alongadas, acompanhando radialmente o tubo seminífero desde a sua zona basal à zona do lúmen. São estas que sustentam e nutrem a linhagem germinativa, ao mesmo tempo que captam e produzem substâncias endócrinas e parácrinas que regulam a espermatogénese, segregando proteínas

essenciais à manutenção do epitélio ductal (27) captando e regulando a testosterona (21).

Em redor dos tubos seminíferos, no espaço intertubular, encontra-se um conjunto de células, desde fibroblastos, células nervosas, microvasos, tecido conectivo e as células de Leydig: produtoras de hormonas andrógenas, nomeadamente a androsterona e a testosterona (28).

É a testosterona que induz a diferenciação dos órgãos genitais masculinos, das características sexuais secundárias e é também esta que despoleta o sinal para a iniciação, processamento e manutenção da espermatogénese (29).

As glândulas acessórias: vesículas seminais, próstata e glândula de Cowper, originam as secreções que sustentam a sobrevivência dos gametas e providenciam o meio ideal através do qual os espermatozóides se deslocam fluidamente para o interior do sistema reprodutor feminino, após ejaculação (29,30) .

3.1.1 Espermatogénese

A gametogénese produz as células haploides fundamentais à fecundação: os gametas. A produção de gametas ocorre nos testículos e nos ovários durante os processos de espermatogénese e oogénese que, respetivamente, resultam em espermatozóides e óvulos (31).

A espermatogénese (figura 3.3) tem uma duração média de 74 dias, durante os quais ocorrem eventos moleculares que resultam na proliferação de células estaminais espermatogonais (SSCs) e na sua diferenciação em espermatozóides altamente especializados (32,33) concluída aquando da libertação das células espermáticas das células de Sertoli para o lúmen dos túbulos seminíferos (34).

Pode-se dividir o processo de espermatogénese em 3 etapas principais (35): Proliferação Mitótica, Meiose e Diferenciação ou espermiogénese.

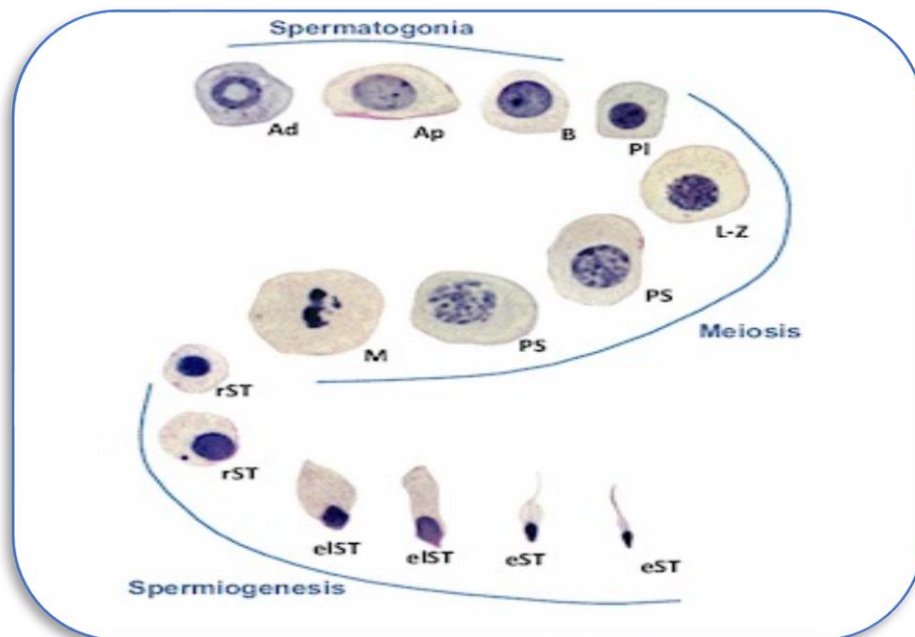


Figura 3.3 Ciclo de espermatogênese. Imagem retirada e adaptada de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279031/>

A mitose é um processo, em que o material genético é duplicado com a desagregação do envelope nuclear formando duas células filhas como resultado da divisão igual dos cromossomas e do citoplasma (36,37).

No homem, as SSC produzem, por mitose, uma população de células que têm aparência nuclear distinta, organizadas em 2 tipos: Espermatogónias do Tipo A e tipo B. Originalmente as células espermatogónias do tipo A *Dark* correspondem às células estaminais e as células Tipo A *Pale*, suas descendentes, são as precursoras das células do tipo B (38).

As espermatogónias do tipo B caracterizam-se por grandes aglomerados de cromatina condensada sob a membrana nuclear. São estas que, por mitose, produzem espermatócitos primários que se desenvolvem em diferentes estádios (preleptoteno, leptoteno, zigoteno e paquíteno) com base no número de núcleos e compactação da cromatina (39).

As células no estágio seguinte ao paquíteno- diploteno e diquinese- têm períodos de vida curtos e raramente são observadas (40).

A meiose é importante porque garante que todos os organismos que se reproduzem sexualmente contêm um número correto de cromossomas. Esta é a gênese da variação genética através do processo de recombinação que, mais

tarde, é amplificada aquando da fecundação, criando assim descendentes com combinações únicas de DNA (41).

Com o final da divisão celular, os espermatídios haploides redondos entram na fase de espermiogénese que é o processo que conduz à formação de espermatozóides fusiformes flagelados, capazes de motilidade (42).

Enquanto o núcleo dos espermatozóides se alonga e o acrossoma se constitui, o axonema começa a desenvolver-se quando um par de centríolos se movem opostamente ao acrossoma e, do centríolo distal se estende gradualmente para o citoplasma. O axonema é o componente central do flagelo e consiste num par central de microtúbulos rodeados por 9 microtúbulos duplos exteriores (43).

Antes do espermatozóide ser transportado para a epidídimo, toda a célula alongada é rodeada por citoplasma. O citoplasma excedente é extrusado e fagocitado através das células de Sertoli. A extrusão citoplasmática, juntamente com várias outras etapas de maturação, é essencial para permitir capacidade de ligação à zona pelúcida (ZP) e estabilizar o potencial de fertilização dos espermatozóides (44,45).

3.1.2 Estrutura do Espermatozóide

Estruturalmente, o espermatozóide humano é constituído por três peças principais: a cabeça, peça intermédia e cauda (figura 3.4) (46).

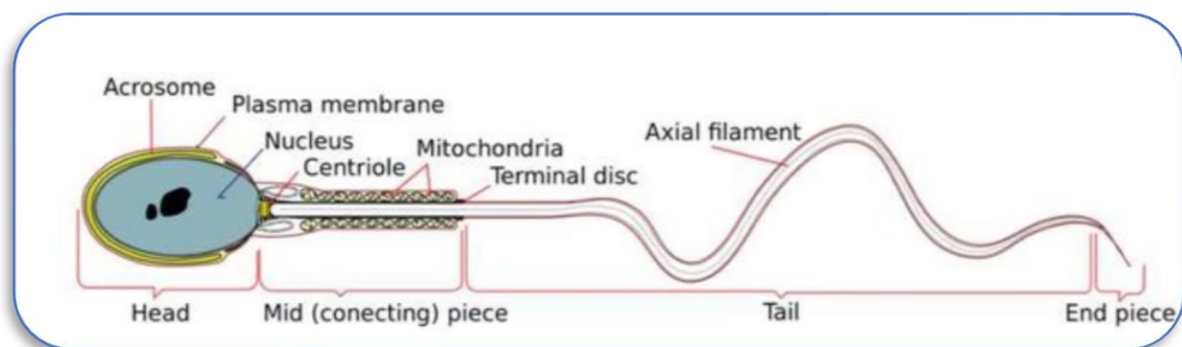


Figura 3.4 Estrutura de Espermatozóide. Imagem retirada e adaptada de "Physics of Microswimmers - Single Particle Motion and Collective Behavior. Reports on Progress in Physics". 78. 056601. 10.1088/0034-4885/78/5/056601.

A cabeça do espermatozóide tem como função a ligação e penetração no óvulo e é subdividida em duas zonas major envolvidas pela membrana plasmática: o acrossoma e o núcleo (47).

Aquando ligação da cabeça do espermatozóide aos receptores glicoproteicos da zona pelúcida, o acrossoma, a vesícula exocítica que se encontra na zona apical da cabeça do espermatozóide, liberta acrosinas proteolísantes que digerem a ZP, permitindo a fusão de membranas e conseqüente entrada de material genético masculino no óvulo (33,46,47).

A zona de ligação à peça intermédia, diretamente abaixo da cabeça, possui dois centríolos - proximal e distal- de maquinaria incompleta que, aquando da fecundação se reconstituem formando o centrosoma que participa na formação do fuso mitótico e na migração dos pronúcleos (48).

A peça intermédia é a zona de conexão desde a cabeça à cauda do espermatozóide e é constituída por uma bainha mitocondrial helicoidal posicionada em torno do axonema e por fibras densas externas que terminam anteriormente ao limite da cauda (49).

As mitocôndrias presentes na bainha, são a fonte de energia, sob a forma de ATP que produzem e transportam energia para o axonema.

A junção desta força motriz, do tamanho da cauda e das fibras densas é responsável pela velocidade de deslocação, flexibilidade da batida e tipo movimento flagelar do espermatozóide (50).

3.2 Preservação da Fertilidade Masculina

A infertilidade masculina pode dever-se a causas pré-testiculares e endócrinas, falências testiculares, alterações genéticas e causas obstrutivas e pós-testiculares. Mesmo com uma criteriosa avaliação, 30-40% dos homens inférteis permanecem sem uma causa específica para o seu problema (infertilidade idiopática). Nos últimos 40 anos, devido também à crescente utilização de telemóvel, consumo de opióides, tabaco e marijuana, elevadas taxas de obesidade e sedentarismo, poluição ambiental e aquecimento global temos assistido ao progressivo decréscimo da qualidade seminal (51).

Porém, a infertilidade masculina não é um problema dos dias de hoje e a busca pela preservação do potencial masculino através da criopreservação remonta ao século XVIII quando, em 1776, Spallanzani analisou os efeitos do frio e da congelação (52). No entanto, é com o trabalho de Parkes, em 1945, que é realizada a primeira congelação com sucesso de sémen humano. Este estudo concluiu também que existe maior eficiência na congelação de pequenos volumes de amostra, determinando indiretamente que a taxa de arrefecimento se correlaciona positivamente com taxa de sobrevivência (53).

Em 1949, Polge, acidentalmente descobre o efeito protetor do glicerol contudo, somente em 1953 é que foram relatadas pesquisas bem sucedidas com sémen humano em gelo seco, resultando no nascimento de um bebé, demonstrando que os espermatozóides humanos descongelados eram capazes de fertilização e indução do desenvolvimento embrionário normal (54).

Uma década mais tarde, foi introduzido o uso de azoto líquido para a crioconservação de esperma a longo prazo. Este novo método conduziu à normalização progressiva da congelação de esperma, como prática divulgada nos cuidados de saúde. Com a disponibilidade de armazenamento a longo prazo e a utilização generalizada do congelamento de espermatozóides, novos métodos e variantes desenvolveram-se ao longo do tempo (55).

A evolução da criobiologia do sémen humano gera soluções que não se restringem meramente ao tratamento da infertilidade, na unidade que é o casal, mas sim, abriu a possibilidade de programar, acumular, doar e preservar o potencial de fertilidade numa nova contextualização terapêutica, ética e social (14).

A criopreservação pode ter por base razões terapêuticas ou sociais - "Social Freezing" - estando os dadores de gâmetas incluídos neste último grupo, bem como homens que optam pela vasectomia como método anticoncepcional ou que, não possuindo um projecto de parentalidade a curto prazo, não descartam essa possibilidade no futuro. Outra perspetiva de *Social Freezing* inclui indivíduos, cujas profissões os exponham situações de risco pelas quais possam vir, no futuro, a interferir na produção e contagem espermática, nomeadamente: radiação, químicos, calor intenso, etc. (56).

A criopreservação terapêutica engloba a conservação do potencial reprodutivo anterior a terapêutica por quimio-radioterapia ou cirurgias que podem, colateralmente, tornar um indivíduo estéril, severamente infértil ou impotente. Em PMA, a criopreservação permite armazenar e posteriormente reunir ejaculações de

doentes oligozoospermicos para a sua utilização conjunta evitando assim cirurgias específicas e armazenar esperma epidídimo, testicular e tecido testicular (14,56–58).

A criopreservação terapêutica permite ainda o armazenamento para situações de diagnóstico e viabiliza a conveniência de usar as amostras quando não é possível colheita a fresco no momento da punção ovárica da parceira (58).

É possível ainda, com recurso à criopreservação de espermatozoides, diminuir a possibilidade de transmissão de doenças infecciosas, como é o caso da Hepatite B e HIV, dado ser possível lavar, criopreservar e armazenar espermatozoides, de pacientes seropositivos para o HIV e Hepatite B (59).

3.3 Criopreservação

A criopreservação, tem como principal objectivo a manutenção de sistemas biológicos a temperaturas às quais os processos metabólicos permaneçam suspensos (57), com o menor dano possível para o sistema. Apesar de existirem variadas técnicas de criopreservação, consoante o tipo celular e a complexidade dos sistemas biológicos (60), a criopreservação de espermatozoides é realizada principalmente através de duas técnicas: *Slow-Freezing* - a técnica clássica- e a vitrificação (19).

O sucesso de ambas as técnicas depende uma amplitude de fatores físico-químicos biológicos (61,62). em especial das taxas de arrefecimento e aquecimento, da quantidade e estado da água intra-extracelular, dos solutos em solução nomeadamente provenientes de crioprotectores (61,63–65).

3.3.1 Agentes Crioprotectores

Os agentes crioprotectores (CPA) são substâncias químicas, desde álcoois e açúcares até polímeros, alginatos, amidas, entre outros compostos que interferem nas propriedades coligativas das moléculas de água, diminuindo a temperatura de fusão. Por exemplo, certos CPAs de baixo peso molecular, devido à sua polaridade, possuem elevada afinidade para formarem pontes de hidrogénio com as moléculas de água (66).

O crioprotetor tem a função de proteger as células durante os processos de arrefecimento e aquecimento. Os crioprotetores podem ser permeáveis (pCPA) ou impermeáveis (npCPA), relativamente à membrana celular, sendo que, combinações destes pode atuar sinergicamente na sobrevivência celular (57,67).

3.3.1.1 Tipos de Agentes Crioprotetores

Os pCPA são moléculas com baixo peso molecular, como glicerol, etilenoglicol (EG) e dimetilsulfoxido (DMSO) que, atravessam a membrana celular, diminuem a temperatura de congelação do citoplasma e substituem água no interior das células (68).

Os npCPA são compostos como a sacarose, polietilenoglicol (PEG), polivinilpirrolidona (PVP) e trealose que entram lentamente na célula ou mantêm-se no ambiente extracelular. Estas moléculas reduzem a água da célula através da criação de um ambiente extracelular hiperosmótico, em relação ao ambiente intracelular controlando, quer o processo de desidratação na criopreservação quer o processo de reidratação aquando do aquecimento (58).

Açúcares tais com a sacarose e a trealose, interagem não só com a água (69) mas também com os fosfolípidios da membrana plasmática reorganizando-a e aumentando a sua fluidez o que induz a depressão na temperatura de transição de fase. Quando combinados os dois tipos de CPA, os npCPA - menos tóxicos - reduzem a quantidades de pCPA necessário mimetizando, fora da célula, os efeitos crioprotetores das proteínas intracelulares (59,70).

O mecanismo através do qual os CPA atuam tem por base aumento da viscosidade, resultado da conexão entre o CPA e a água do meio. Este aumento de viscosidade desencadeia uma série de reacções, com implicações a nível coligativo, benéficas ao processo de criopreservação promovendo a diminuição do ponto de congelação do sistema, o atraso no processo de nucleação e, conseqüente, redução do tamanho e taxa de crescimento de cristais de gelo (55).

Cada tipo de CPA apresenta mecanismos de citotoxicidade específicos e o efeito da toxicidade destes depende, em grande medida, das condições de exposição: a temperatura, a concentração e o tempo de exposição ao crioprotetor (71).

O efeito tóxico dos crioprotetores não é uniforme em todo o processo de criopreservação. Os CPA podem interagir com outros reagentes da mistura ou com

moléculas fundamentais ao metabolismo celular resultando em stress oxidativo, levando indiretamente a lesão celular e/ou outros danos (71).

Para além da toxicidade química do CPA, quer na sua adição, quer na remoção, da sua ação resulta a contração e expansão do volume celular que pode originar choque osmótico (72) e, conseqüentemente, dano mecânico-estrutural à célula (70,73).

Apesar da toxicidade dos crioprotetores não poder ser totalmente obliterada, esta pode ser minimizada recorrendo à combinação de vários CPA em solução, adicionando-os lentamente e, aumentando, quando possível, a quantidade de npCPA em detrimento dos pCPA (68).

3.3.2 Temperaturas de Fusão e Transição Vítre

A termodinâmica (figura 3.5) descreve, para além dos pontos de transição da matéria, a quantidade de gelo que se forma a uma dada temperatura, o fluxo de água e crioprotetores dentro e fora das células e ainda, a transferência de calor

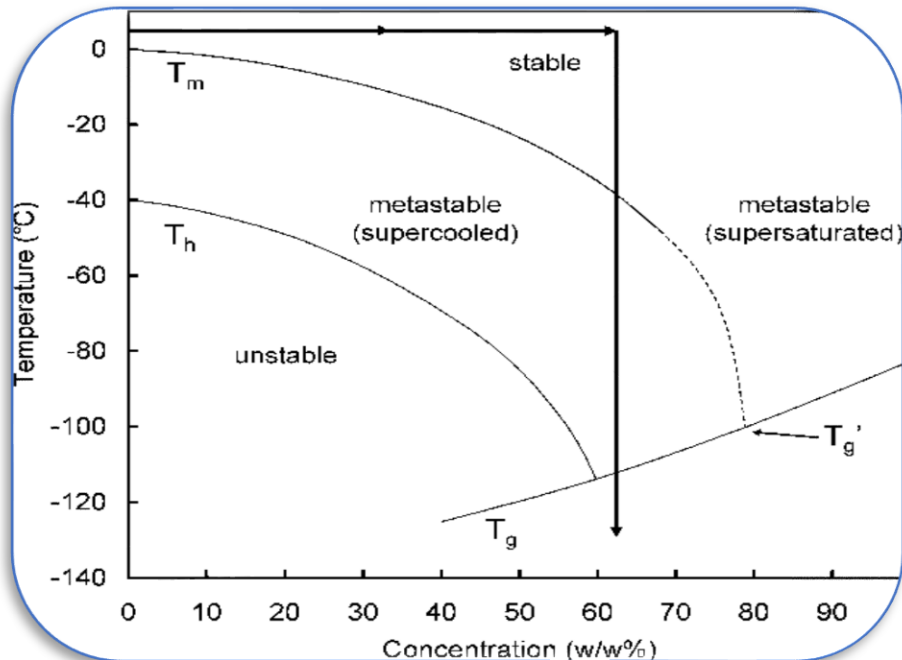


Figura 3.5- Diagrama de fase para diferentes concentrações de crioprotetor. Imagem retirada e adaptada de "Vitrification Enhancement by Synthetic Ice Blocking Agents. *Cryobiology*. 40. 228-36. 10.1006/cryo.2000.2243".

que ocorre durante os processos de arrefecimento e aquecimento, essenciais para a criopreservação de células (74).

Quando submetidas a temperaturas abaixo do seu ponto de fusão (T_m), dependente da concentração de solutos dissolvidos, as moléculas de água, tendencialmente, caminham para o estado sólido através da transição de fase líquido-sólido que, levam à nucleação e crescimento de cristais de gelo (55).

A nucleação é o processo que se dá, uma vez atingida a temperatura de nucleação heterogénea (T_h), em que as moléculas de água iniciam a sua aglomeração que definirá a estrutura sólida cristalina (75).

A técnica de *Slow-Freezing* faz uso dos eventos termodinâmicos que se dão durante o arrefecimento a temperaturas inferiores a T_m . A temperatura de transição vítrea (T_g), é inferior à T_m e é, por definição, a temperatura a partir da qual uma solução transita entre a fase líquida e a fase sólida vítrea. Nesta fase, as moléculas têm o mesmo nível organizacional que no estado líquido mas, o nível de liberdade de movimentação das moléculas diminui, devido ao aumento repentino de densidade que leva à estase molecular do líquido solidificado devido, não à cristalização, mas ao aumento da viscosidade do sistema (18).

É a partir da T_g que se encontram as características termodinâmicas favoráveis à técnica de vitrificação com a vantagem de não existir formação de gelo (67).

3.4 Técnicas de criopreservação de espermatozóides

3.4.1 Slow-Freezing

Na técnica de *Slow-Freezing*, uma pequena quantidade de crioprotetor, normalmente pCPA, é adicionada e misturada à amostra de esperma, a um ritmo lento (64).

Depois de homogeneizada, a amostra é colocada no suporte de refrigeração (palhetas ou tubos de criopreservação) e refrigerada até próximo dos 5 °C a uma taxa de 0,5 a 1 °C/min, cerca de 10 minutos. A solução é depois arrefecida de 5 °C a -80 °C à taxa de 1-10 °C/min em vapores de azoto, durante 15–20 minutos e, finalmente, mergulhada em azoto líquido onde arrefece até a temperatura de armazenamento de -196°C (76).

Aquando da necessidade de utilização, as amostras são aquecidas à temperatura ambiente, mantidas na incubadora a 37°C ou imersas em água por um período que varia entre 10 a 20 minutos e posteriormente lavadas com meio tampão, para remoção do CPA e reidratação das células (59,64,77).

Esta técnica requer controlo rigoroso da temperatura de modo que a diminuição da mesma seja gradual e controlada.

A técnica de *Slow-Freezing* possui tempos de execução prolongados, podendo chegar a processamentos manuais superiores a uma hora por amostra (57).

Apesar de existir a possibilidade de executar o protocolo de modo automatizado, os aparelhos para este efeito são dispendiosos e possuem um maior consumo de azoto líquido (78).

Em qualquer um dos modos, manual ou automatizado, a técnica é pouco eficiente, causando extenso dano físico e químico às células devido à produção e cristalização do gelo (79).

O *Slow-Freezing* não é adequado a todos os tipos de amostra uma vez que, para além da congelação e descongelação usam-se técnicas de centrifugação e diluição do amostra que muitas vezes leva à perda de espermatozóides vitais especialmente em amostras com fraca concentração (16,80).

3.4.2 Vitriificação

O processamento para vitriificação até ao armazenamento, envolve a adição gradual de CPA, após a qual, a solução é colocada nos suportes e mergulhada diretamente em azoto líquido a uma taxa de arrefecimento de cerca de 2000 °C/min a 10,000 °C/min (19,55,81).

Aquando da utilização da amostra armazenada, esta é aquecida, à temperatura ambiente, 37°C ou superior e o crioprotetor é removido através de lavagens com meio tampão hipotónico, previamente aquecido (19,82).

A taxa de aquecimento, seguida da taxa de arrefecimento é a variável de maior importância uma vez que é nas incursões de temperatura que há maior risco de formação e expansão das moléculas de gelo. Outros factores determinantes das taxas térmicas e conseqüentemente do sucesso da técnica são os volumes adequados de amostra e o tipo de material do suporte (83).

Devido ao uso de altas concentrações de CPA e elevadas taxas de arrefecimento e aquecimento, a vitrificação, face ao *Slow-Freezing*, tem como principal vantagem, a redução do dano causado pela formação de cristais de gelo que inviabilizam a estrutura celular. É uma técnica de rápida execução e fácil implementação em laboratórios uma vez que não requer equipamento complexo sendo por isso mais barato (78).

A concentração de crioprotetores empregues no processo pode resultar em dano celular por efeito da citotoxicidade destes agentes (68) contudo, as células espermáticas, resistem melhor ao processo de vitrificação devido à elevada fluidez da membrana e ao baixo teor de água não existindo assim necessidade de utilização de crioprotetores em concentrações elevadas (84).

A nível da clínica laboratorial reprodutiva, esta técnica não é aplicada rotineiramente como acontece com ovócitos e embriões. Uma das principais limitações para a implementação da vitrificação de esperma é a ausência de padronização de protocolos bem como de resultados reprodutivos aceitáveis quando usados grandes volumes de amostra (85).

Volumes de amostra reduzidos e suportes de criopreservação que facilitem transferência de calor, são necessários para o sucesso da técnica de vitrificação. Um volume baixo de amostra, permite não só atingir linearmente as taxas de transferência térmica necessárias aos processos de arrefecimento e aquecimento como também facilitam a distribuição uniforme da temperatura em toda a amostra (86).

Existem vários tipos de suportes de criopreservação de esperma desde sistemas comerciais como *cryosleep*, *cryovial*, tubos capilares, até adaptações de materiais da prática laboratorial como por exemplo pontas de micropipetas (figura 3.6).

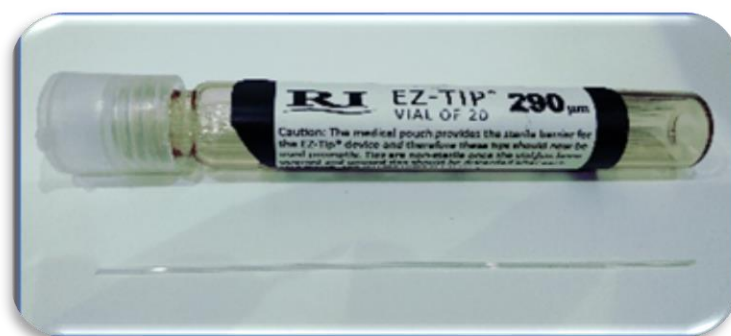


Figura 3.6- Pontas de micropipetas da marca RI® -Foto inédita

O suporte convencional é a palheta de resina ionomérica de 0,5 mL de capacidade, apresentando paredes moderadamente espessas que, durante a transferência térmica da criopreservação atua como um isolante dentro da palheta e que interfere na transferência de calor, tornando difícil atingir linearmente as taxas de arrefecimento necessárias (63).

O *Cryotop*[®] é um suporte aberto (figura 3.7), amplamente utilizado na vitrificação de óvulos e embriões constituído por uma pega de manuseamento rígida e uma fina tira de polipropileno onde é colocada a amostra (16).

Pelas suas características é um suporte apropriado para a vitrificação de um baixo número de espermatozoides (16,48).

O seu design, de acordo com o fabricante, permite o carregamento com volume mínimo de 0,1 μ L, proporcionando taxas de arrefecimento e aquecimento de 23.000°C/minuto e 42.000°C/minuto respetivamente (87).



Figura 3.7- Cryotop[®] (a vermelho) e respetiva tampa-Foto inédita

4. Materiais e Métodos

4.1 Local do estudo

Este estudo foi realizado no Centro de Procriação Medicamente Assistida Ginemed em Lisboa.

4.2 Tipo de estudo

Tendo em conta o objetivo definido, que é o de maximizar a sobrevivência de espermatozóides após processamento, de acordo com Fortin (88) , este estudo é experimental, manipulando a temperatura e concentração e tipo de soluções nos diferentes pontos chave de processamento de criopreservação.

4.3 Variáveis

Neste estudo, a variável dependente é a mobilidade progressiva dos espermatozóides e as variáveis independentes são: natureza do crioprotector, concentração do crioprotetor, tempos de exposição ao crioprotector, suportes de vitrificação e temperatura de aquecimento após vitrificação.

4.4 População-alvo e amostra

As amostras de sémen incorporam uma amostragem não probabilística e racional (88) obtidas de 12 utentes masculinos, provenientes de colheita para diagnóstico na clínica Ginemed Lisboa que, após a explicação do estudo (Apêndice I) assentiram ao mesmo por assinatura de termo de consentimento (Apêndice II).

4.5 Seleção de amostras

Foram selecionadas as amostras com diagnósticos de normozoospermia:

- Volume de fluido seminal: igual ou superior a 1,5 mL;
- Número total de espermatozóides no ejaculado: igual ou superior a 39 milhões;
- Concentração de espermatozóides: igual ou superior a 15 milhões por mL;
- Mobilidade total: igual ou superior a 39% e mobilidade progressiva: igual ou superior a 32%.

4.6 Critérios de exclusão

Foram excluídas as dádivas com as seguintes características:

- Amostras de pacientes que relataram perdas de amostra no momento da colheita;
- Amostras não normozoospérmicas;
- Amostras de pacientes que relataram abstinência sexual inferior a 2 e superior a 7 dias;
- Amostras que após capacitadas apresentavam mobilidade abaixo de 99%.

4.7 Procedimentos laboratoriais

Num protocolo de criopreservação, existem vários parâmetros que vão interagir entre eles para determinar o eventual sucesso da técnica: a solução de crioprotetores, o suporte de criopreservação, do qual dependerão o volume e a velocidade de arrefecimento, e finalmente, a técnica de reaquecimento.

O nosso trabalho dividiu-se em duas vertentes: pré processamento e avaliação dos parâmetros do protocolo, propriamente dito.

No pré processamento, efetuamos o tratamento da amostra para obtenção da fração de espermatozóides móveis (FEM) e análise qualitativa de suporte de vitrificação e modo de arrefecimento.

Na avaliação dos parâmetros do protocolo determinámos qual a natureza, concentração e tempo de exposição ao crioprotector bem como a temperatura de aquecimento.

Todos os materiais, equipamentos e meios utilizados neste estudo encontram-se descritos no Apêndice IV.

4.7.1 Pré Processamento

4.7.1.1 Avaliação de amostras

Tendo por base o processamento de amostras, de acordo com as diretrizes de análise e processamento de sémen humano da OMS (7) foram avaliados os parâmetros de volume seminal; viscosidade da amostra e, através de microscopia, foram avaliados os parâmetros de motilidade (espermatozóides progressivos, não

progressivos e imóveis) e concentração de espermatozoides (milhões de células de espermatozoides/mL) em câmara de Makler

4.7.1.2 Obtenção da FEM

Uma vez verificado que as amostras apresentavam parâmetros espermáticos dentro dos valores de referência, foi necessário obter alíquotas compostas exclusivamente de espermatozoides móveis, de modo a testar os efeitos dos diferentes aspectos da criopreservação.

Para obtenção de amostras com elevado número de espermatozoides móveis, os ejaculados foram capacitados através de técnica de *swim up*.

Assim, das amostras a fresco, foram retirados entre 1 e 2 mL e submetidos a lavagem por gradientes de 45% e 90% de densidade num ciclo de centrifugação de 1100 rpm durante 20 minutos.

O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 1 mL de tampão espermático, submetido posteriormente a um ciclo de centrifugação de 1500 rpm durante 10 minutos.

Descartou-se o sobrenadante e, ao *pellet*, juntou-se, 500 µl de tampão espermático e passando a amostra processada num único microtubo de 1,5 mL.

Aferiu-se a motilidade em câmara de Mackler sendo somente usadas as FEM que possuíam no mínimo 10×10^6 spz/mL e motilidade igual a 99%.

4.7.1.3 Estudo do modo arrefecimento e suportes

Com recurso ao meio de congelação de glicerol testou-se dois suportes: pontas de micropipetas stripper e Cryotop®.

➤ Utilização de pontas stripper:

As pontas de stripper são cilíndricas, de material plástico flexível, com um diâmetro interno de 290 µm e externo de 0,9 mm.

As pontas micropipetas foram diretamente carregadas com 1 a 2 µL de suspensão através de pipeta stripper (figura 4.1A). Após carregadas, no interior de uma palheta CBS de resina de capacidade 0,5 mL, com 133 mm de comprimento e 2,5 mm de diâmetro interno. As palhetas foram termicamente seladas com recurso a

seladora manual de palhetas SYMS (figura 4.1B) e mergulhadas em azoto líquido (figura 4.1C) por, pelo menos, trinta minutos, até ao aquecimento.

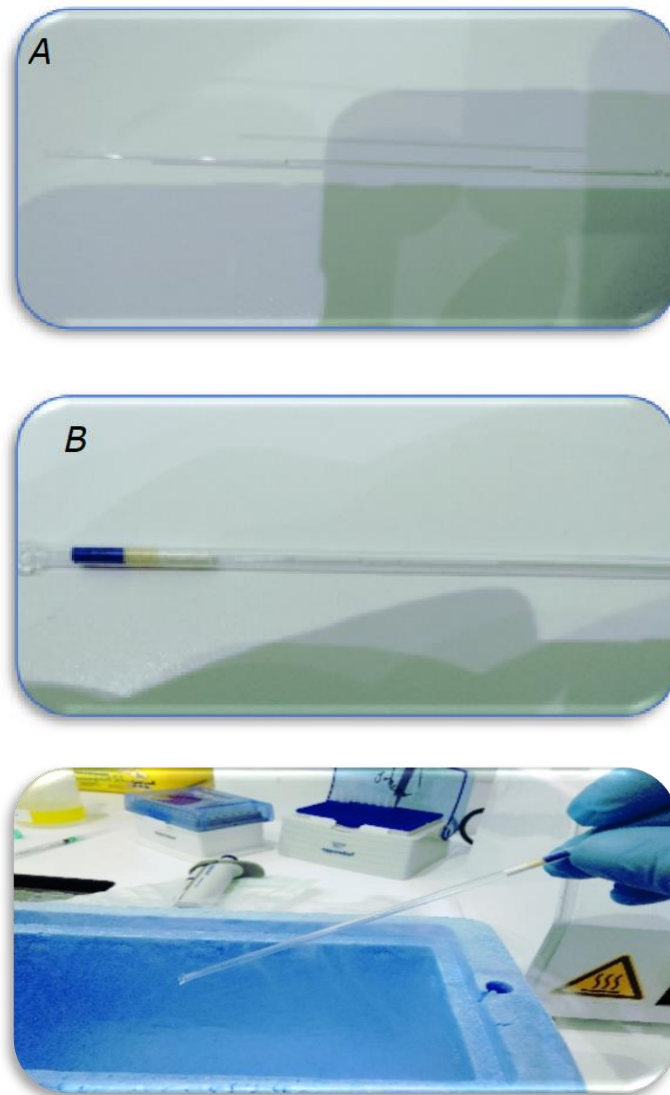


Figura 4.1 A- Ponta de stripper carregada; B- Ponta carregada encerrada em palheta C- Mergulho em azoto líquido. -Fotos inéditas

A leitura do resultado foi efectuada com aquecimento recorrendo a 5 μ L de solução tampão à temperatura ambiente, em lâmina de vidro coberta por lamela e efectuado o varrimento dos campos da área da lamela, em microscópio ótico.

O processamento em pontas de *stripper* foi abandonado dado a impossibilidade de reprodutibilidade de resultados dado o facto de que a retirada da ponta da palheta selada bem como o expurgar da FEM vitrificada interferia no processo de aquecimento.

➤ Utilização de Cryotop®:

Com o Cryotop® carregado com cerca de 1 a 2 μL de suspensão de espermatozoides em solução de crioprotetores, foram realizadas 3 abordagens de congelação:

- Exposição do Cryotop® carregado com a suspensão a vapores durante 10 minutos seguido mergulho em azoto por 30 minutos (figura 4.2).



Figura 4.2-Cryotop exposto a vapores de azoto: Foto inédita

- Mergulho direto do Cryotop® carregado com a suspensão, com e sem tampa e leitura após 30 minutos de exposição ao azoto.

Aquando do aquecimento, a tampa, é retirada ainda quando o Cryotop® se encontra mergulhado em azoto e, em ambos os casos, imersa de imediato em 5 μL de solução tampão à temperatura ambiente e em lâmina de vidro, coberta por lamela e efectuado o varrimento dos campos da área da lamela, em microscópio ótico.

Nestes dois testes preliminares os resultados apresentaram-se inconstantes tendo sido detetado que, no caso da utilização do mergulho com utilização da tampa, parte da amostra ficava presa dentro da tampa. Foi efectuada a adaptação do

Cryotop®, cortou-se 0,5 cm da ponta, repetido o processo e os resultados após aquecimento apresentam-se consistentes de ensaio para ensaio.

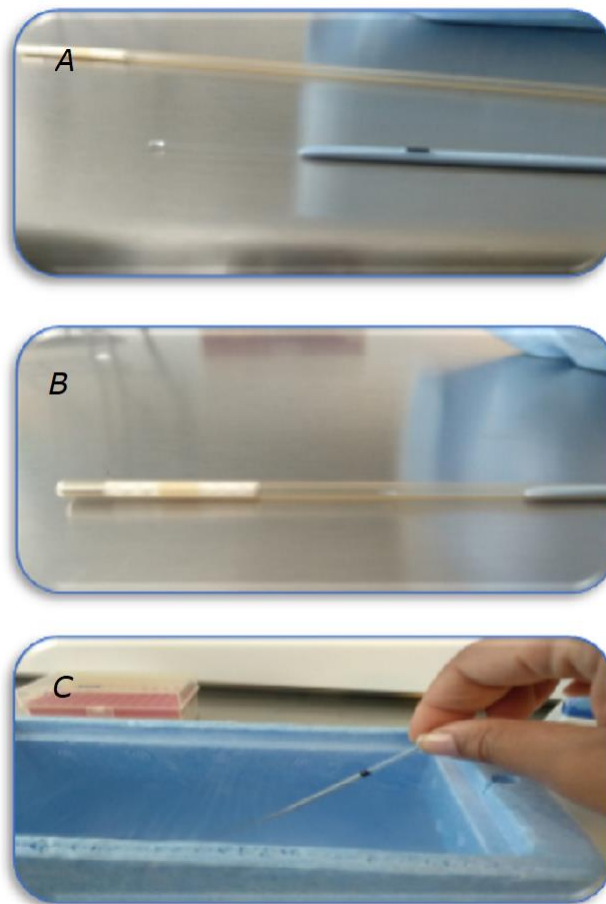


Figura 4.3- Processamento em Cryotop® com tampa. A- Cryotop® adaptado carregado com 1 μ L se suspensão B- Cryotop® carregado e fechado; C Mergulho em azoto. Foto inédita

4.7.2 Avaliação dos parâmetros do protocolo

4.7.2.1 Soluções crioprotetoras

Como foi referido na introdução, existem diversas soluções de crioprotetores que podem ser adicionadas à solução de espermatozoides com o objectivo de os proteger durante o arrefecimento necessário para a criopreservação.

Tendo por base a bibliografia existente bem como a disponibilidade de reagentes e da potencial aplicabilidade clínica futura, selecionaram-se, para além da solução comercial de glicerol, seis soluções para teste (tabela 1):

Tabela 1- Detalhe de composição das soluções de criopreservação

Soluções de vitrificação					
	TYB®	Solução de Sacarose		Solução de Trealose	
Fórmula Base	<ul style="list-style-type: none"> • Tampão TES e Tris • Gema de Ovo • Glicerol • Sulfato de gentamicina • Citrato de Sódio • Frutose 	<ul style="list-style-type: none"> • Tampão HEPES • 10 mg/ mL de albumina sérica • Solução salina • mg/mL de gentamicina 		<ul style="list-style-type: none"> • Tampão HEPES • Solução salina • Dimetilsulfóxido Etilenoglicol • Trealose 1M • Hydroxipropilcelulose (HPC) 	
Tipo de CPA	<i>Glicerol</i>	<i>Sacarose</i>		<i>Trealose</i>	
Concentração					
[] CPA	12% (V/V)	0	0,1M	0	0,1M
		'		'	
		5		5	
		M		M	
		M		M	

Três soluções de sacarose, correspondente às concentrações de 0,5M; 0,25 e 0,1M de sacarose (BioXtra, a 99.5% de pureza, Sigma-Aldrich), tendo como solvente a solução de tampão espermático Sperm Buffer® (SpB) da Genea-Merck.

Três soluções de diluições de 1:2 (TS 0,5M); 1:4 (TS 0,25M) e 1:10 (TS 0,1M) de meio TS com Trealose, do kit de desvitrificação da Kitazato®, tendo como solvente a solução de tampão Sperm Buffer (SpB®).

Todas as soluções foram elaboradas em tubos cónicos e mantidas no frigorífico, entre 2°C e 4°C, em alíquotas de 100 µL em microtubos de 0,5 mL até ao momento de uso.

4.7.2.2 Tempo de exposição às soluções

Em primeiro lugar, tratou-se de discernir o efeito da exposição a estas soluções sobre a motilidade espermática, procurando uma solução que mantivesse um efeito crioprotetor, sem ser nociva para os espermatozóides, provocando-lhes perda de motilidade.

Para determinação do meio favorável ao arrefecimento, foram efetuadas alíquotas de 50 µL de amostras da FEM e adicionado 50 µL meio de crioproteção, gota a gota, até à proporção de 1:1. A amostra de cada paciente foi estudada por duplicado para cada solução. Foi efectuada a contagem de 100 espermatozóides nos tempos de 5 minutos e 15 minutos após o término da adição de crioprotetor.

4.7.2.3 Determinação de tempo mínimo de exposição

Numa segunda abordagem, e para análise do tempo mínimo de exposição das amostras ao crioprotetor antes da congelação, foi analisado, após selecção do meio de criopreservação, o comportamento da FEM, minuto a minuto até 15 minutos.

4.7.3 Aquecimento

Na fase anterior, optou-se por uma técnica de aquecimento que consiste na exposição das amostras desde os -196°C do azoto à solução tampão a temperatura ambiente.

No entanto, esta forma não é adequada para a posterior utilização das amostras na prática clínica, pois o volume total recuperado está a ser utilizado para avaliação da sobrevivência ao microscópio.

Para adaptar o aquecimento para utilização no laboratório de PMA, o procedimento foi modificado. Desta forma, 30 minutos após a amostra se encontrar submersa em azoto, esta foi aquecida do seguinte modo:

- I) Numa caixa de 60mm de diâmetro aquecida, foi colocada uma gota de 5 μ L de tampão SPB® previamente aquecido à temperatura de 37°C.
- II) Ao Cryotop® com a suspensão foi retirada a tampa, ainda imerso em azoto, e imediatamente mergulhado na gota de tampão e suavemente agitado para que a suspensão se fosse libertando.
- III) A gota foi coberta com aproximadamente 9 mL de óleo mineral e observada ao microscópio invertido tentando-se contabilizar 200 espermatozóides: 100 no rebordo da gota e 100 espermatozóides no interior da gota (figura 4.4).

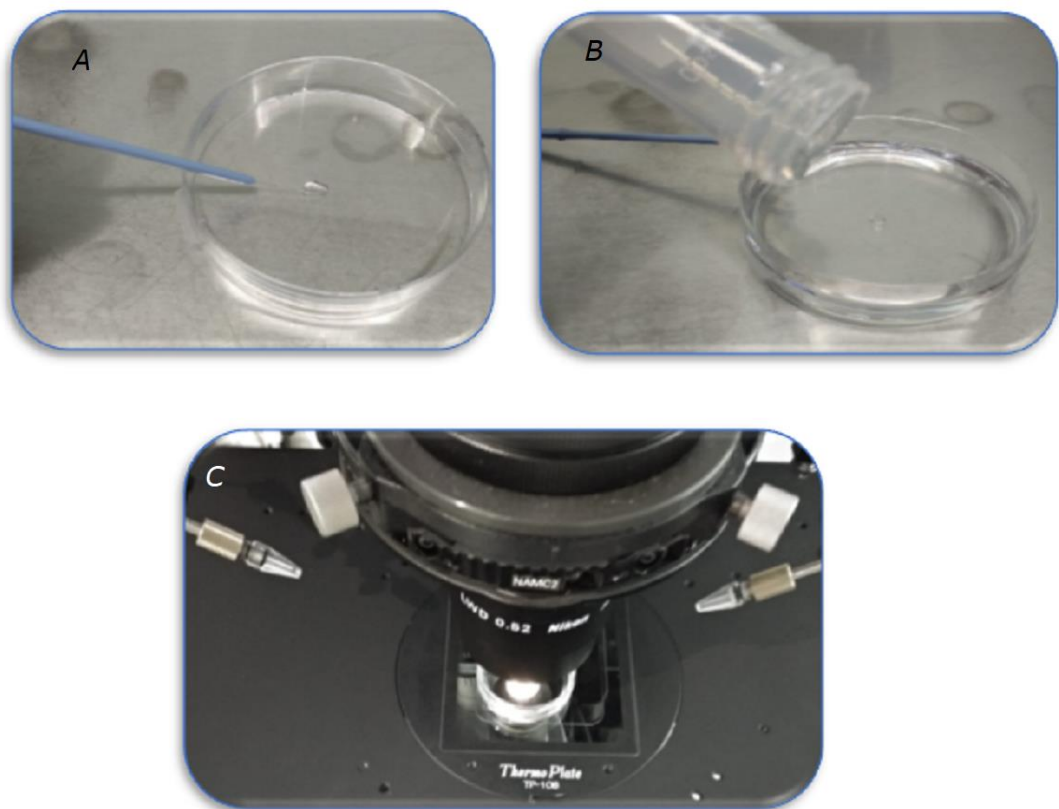


Figura 4.4- Modo de aquecimento após vitrificação. A- Introdução da ponta do cryotop em gota de tampão; B- Cobertura com óleo mineral; C- Montagem para observação microscópica. Fotos inéditas

O mesmo procedimento foi efectuado para testar as condições de aquecimento com à temperatura ambiente no qual quer a caixa de 60 mm quer a gota de tampão se encontravam à temperatura ambiente.

A avaliação da mobilidade espermática foi repetida a cada 15 durante uma hora. O resumo do gráfico do design experimental do protocolo de vitrificação de espermatozóides encontra-se projetado na figura 4.5.

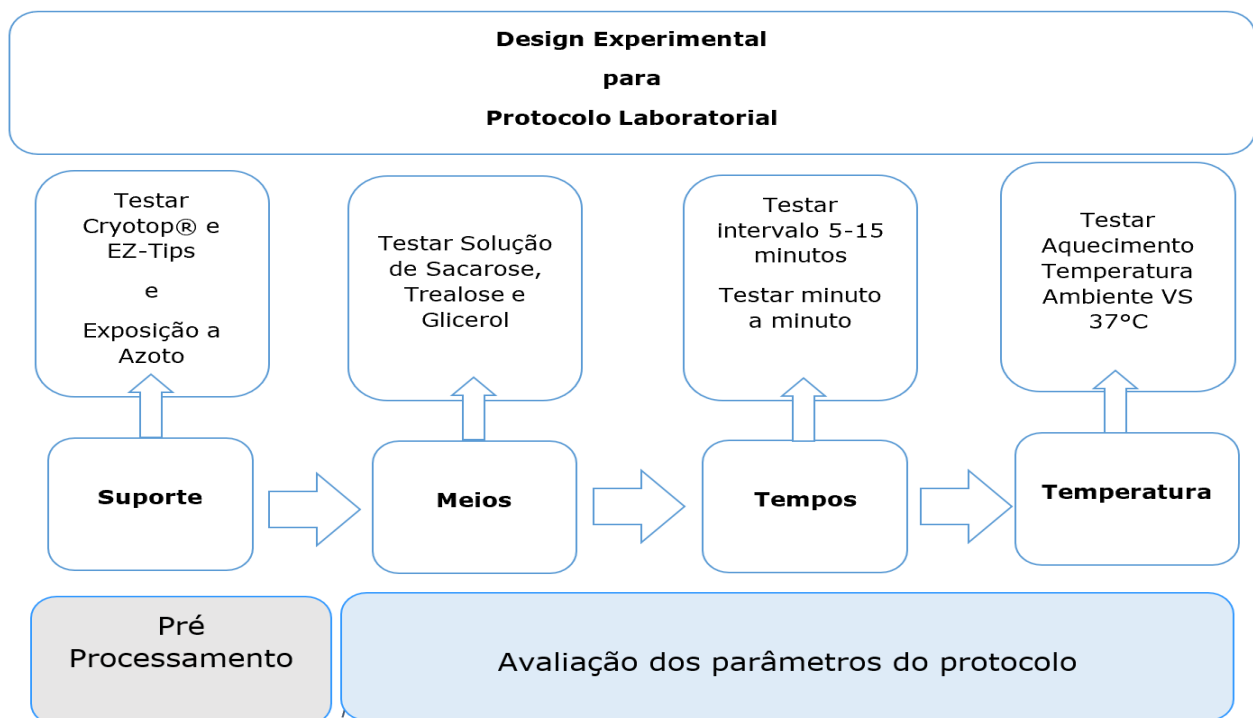


Figura 4.5- Esquema de Design do Protocolo de Vitrificação de Espermatozóides

4.8 Considerações éticas e legais

Os utentes foram informados do propósito do estudo através de documento escrito, assentando ao mesmo através de assinatura em consentimento informado para o efeito.

O protocolo de estudo foi aprovado pela direção da clínica da Ginemed (Apêndice III) Lisboa bem como pelo Conselho de Ética da Escola Superior de Tecnologia da Saúde, com a referência CE-ESTESL-Nº. 18-2020.

4.9 Análise estatística

O método de análise dos dados recolhidos implicou a utilização de suportes informáticos nomeadamente o Microsoft Excel® e o QuickCalc, Graphpad.

Os resultados de cada solução a que a amostra foi exposta, foram trabalhados em Microsoft Excel para cálculo da estatística descritiva e representação gráfica. O cálculo estatístico foi efetuado através de One-Way Anova para comparação da meia de espermatozoides móveis recuperados nas diferentes experiências.

O valor de $p < 0,05$ foi definido para demonstração da relevância estatística dos resultados.

5. Resultados

Encontrando-se escolhido, através de estudos preliminares, o suporte e o modo de exposição ao azoto: mergulho direto do Cryotop® fechado com tampa- passamos à determinação dos elementos basilares da criopreservação: soluções de crioproteção, tempos de exposição e modos de aquecimento.

5.1 Tempo e exposição às soluções

Em primeiro lugar, tratou-se de discernir o efeito da exposição das soluções crioprotetoras- glicerol, trealose e sacarose – em relação à motilidade espermática (tabela 2), procurando uma solução que mantivesse um efeito crioprotetor, sem ser nociva para os espermatozóides.

Tabela 2- Resumo de resultados médios, desvio padrão, valores mínimos e máximos de mobilidade

Meio	%SPZ	%SPZ	%SPZ	%SPZ	%SPZ	%SPZ	%SPZ
	Prgs	NPrgs	Imv	Prgs	NPrgs	Imv	Prgs
	5Min	5Min	5Min	15Min	15Min	15Min	VIT.
TYB®	74,1 ±20,61	3,6 ±3,15	23,0 ±20,16	74,2 ±13,81	4,5 ±4,03	18,5 ±10,08	20,1 ±22,11
Min	44	0	3	50	0	3	0
Max	95	12	55	93	18	39	86
TS	77,7 ±20,47	3,2 ±2,99	19,3 ±19,81	60,8 ±23,83	7,3 ±6,06	31,8 ±23,42	38,2 ±15,51

0,1M							
Min	30	0	0	19	1	4	12
Max	99	12	67	94	25	75	68
TS	60,3	19,4	20,2	21,1	13,9	65,1	19,9
0,25	±17,52	±17,76	±17,24	±24,26	±17,51	±29,58	±18,33
Min	33	1	1	0	0	10	0
Max	87	56	58	68	67	100	59
TS	3,9	13,1	83	1,0	3,35	96,1	0,8
0,5M	±5,83	±14,51	±17,75	±1,75	±7,67	±8,21	±0,99
Min	0	0	52	0	0	67	0
Max	24	43	100	7	32	100	3
SAC	93,0	2,2	4,7	82,8	5,6	11,4	43,1
0,1M	±5,44	±2,29	±4,55	±11,33	±5,41	±8,55	±16,13
Min	89	0	0	56	0	1	0
Max	99	10	17	98	19	25	65
SAC	83,6	4,0	11,8	75,7	7,3	16,9	42,6
0,25M	±15,66	±6,68	±13,26	±16,83	±8,86	±14,18	±10,58
Min	56	0	0	45	0	0	21
Max	99	31	40	100	33	51	60
SAC	35,5	12,0	51,9	20,6	12,2	67,0	9,4
0,5M	±26,66	±10,82	±30,37	±18,99	±10,90	±24,12	±12,35
Min	6	0	1	0	0	25	0
Max	89	25	86	56	40	100	57

5 minutos (5Min); 15 minutos (15Min); após vitrificação e aquecimento (VIT); Espermatozoides progressivos (%SPZ Prgs), Espermatozoides não progressivos (%SPZ NPrgs); Espermatozoides Imóveis (%SPZ Inv).

O meio de congelação de glicerol apresentou uma redução da mobilidade em cerca de 25% nos primeiros 5 minutos e, o possível efeito de toxicidade da solução sobre a mobilidade manteve-se estável, até aos 15 minutos, sem variação significativa (figura 5.1)

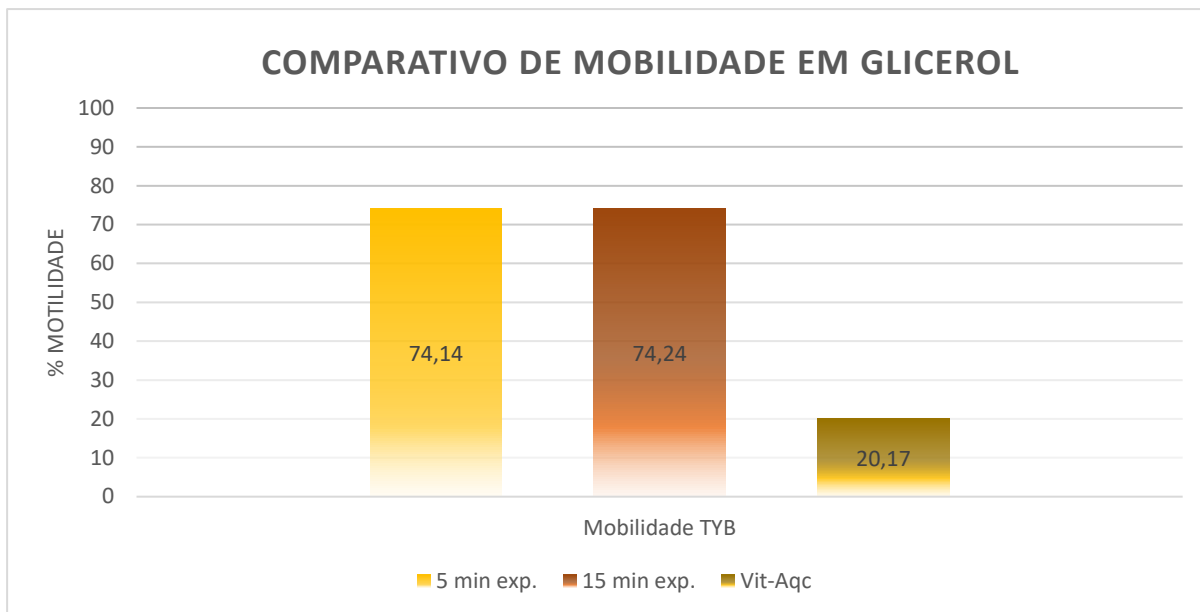


Figura 5.1- Gráfico da mobilidade espermática após exposição a glicerol: Mobilidade após 5 (5MIN EXP) e 15 minutos de exposição a Glicerol (15MIN EXP) e após vitrificação (Vit-Aqc)

As diluições de trealose, exibiram desde o início uma diminuta afinidade para a sobrevivência de células espermática (figura 5.2).

Os ensaios realizados com a TS de diluição 1:2, revelaram, uma maior taxa de imobilidade. Após os primeiros cinco minutos a solução apresentou um decaimento de mobilidade na ordem dos 97% e, aos 15 minutos, a tendência aproximava-se de 99% de imobilidade.

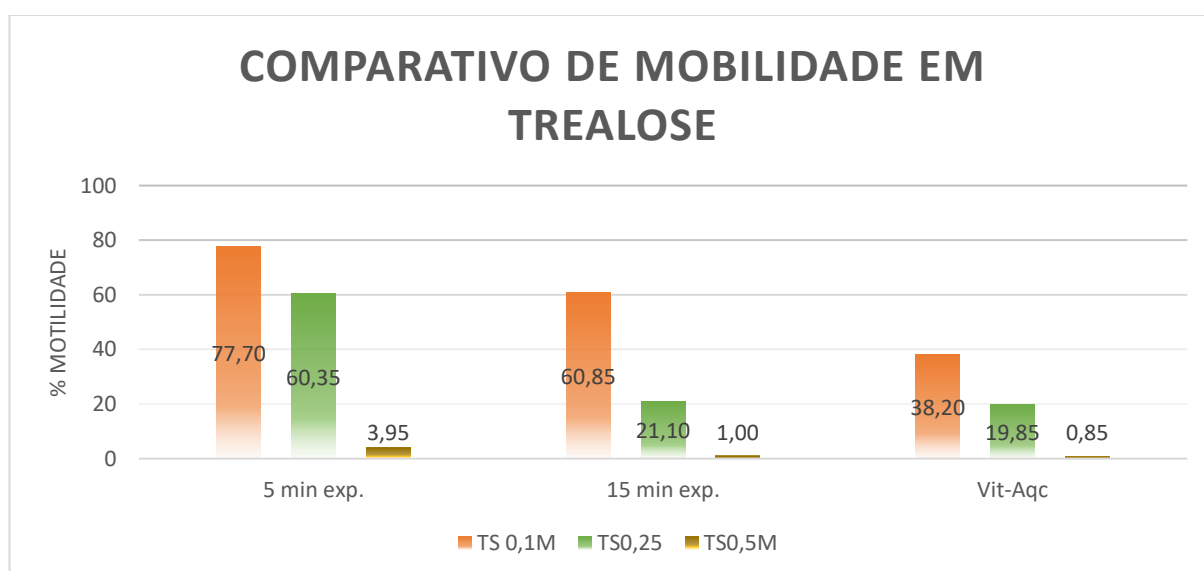


Figura 5.2 Gráfico comparativo da resposta à exposição a trealose após 5 minutos (5MIN EXP) e 15 minutos de exposição (15MIN EXP) e após o aquecimento (Vit-Aqc)

As soluções de menor concentração 0,25M e 0,1M, apresentaram, respectivamente aos 5 minutos, uma mobilidade na ordem dos 60% e 77%, e 21% e 60% aos 15 minutos a apresentando um melhor resultado face à solução de 0,5M que, após os 5 minutos de exposição apresentava um decaimento de mobilidade na ordem dos 96%. Após o aquecimento em lâmina, as taxas de mobilidade globais da trealose não ascendem os 38,20%, correspondente à solução de 0,1M.

O resultado apresenta significância estatística $p < 0,001$; reforçando que entre as três concentrações a solução com efeito menos tóxico é a solução de 0,1M de trealose. (Motilidade 38% TS0,1M vs. 19.85% TS0,25M; $p = 0,003$; Motilidade 38% TS0,1M vs Motilidade 19.85% TS0,5M; $p \leq 0,001$; Motilidade 19,85% TS 0,25 vs Motilidade 0,85% T0,5M; $p = 0,001$)

Após os 5 minutos, as soluções de sacarose de 0,1M e 0,25M apresentavam, respectivamente, 93,9% e 83,6% de mobilidade.

Depois do aquecimento os mesmos meios registavam cerca de 40% de motilidade (figura 5.3) enquanto o meio de concentração de 0,5M de sacarose apresentou uma motilidade de 9,5%. Este apresentou as mais reduzidas taxas de sobrevivência aos 5 minutos e, esta taxa caiu de 32,16% para 17,06% aos 15 minutos.

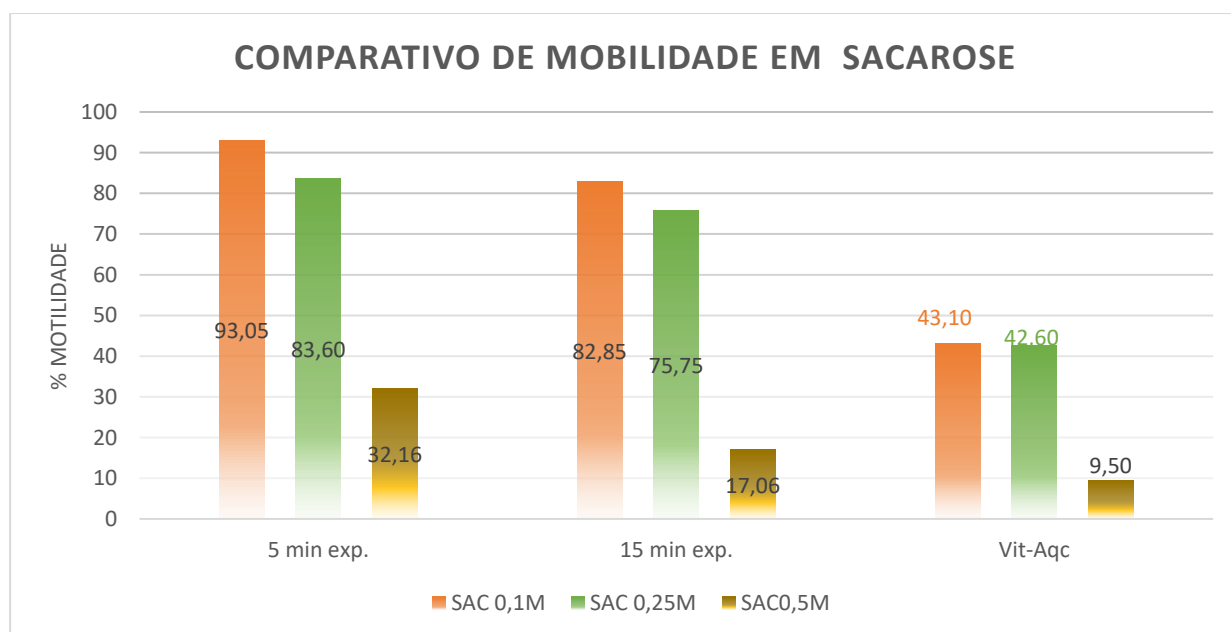


Figura 5.3- Gráfico comparativo da resposta à exposição a sacarose após 5 minutos (5MIN EXP) e 15 minutos de exposição (15MIN EXP) e após vitrificação e aquecimento (Vit-Aqc)

A concentração dos meios de sacarose impactou na motilidade espermática revelando significância estatística. A análise comparativa dos meios sugere que Motilidade 43,10% Sac 0,1M vs Motilidade 42,60% Sac 0,25M; $p=0,218$ não existindo entre os meios uma diferença estatística significativa; Motilidade 43,10% Sac 0,1M vs Motilidade 42,60% Sac 0,5M; $p\leq 0,001$; Motilidade 42,60% Sac 0,25M vs Motilidade 43,10% Sac 0,5M; $p\leq 0,001$).

Os crioprotetores a que se obtiveram melhor resposta relativamente à motilidade e após vitrificação e aquecimento são: Sacarose 0,1M; Sacarose 0,25M e Trealose 0,1M (figura 5.4).

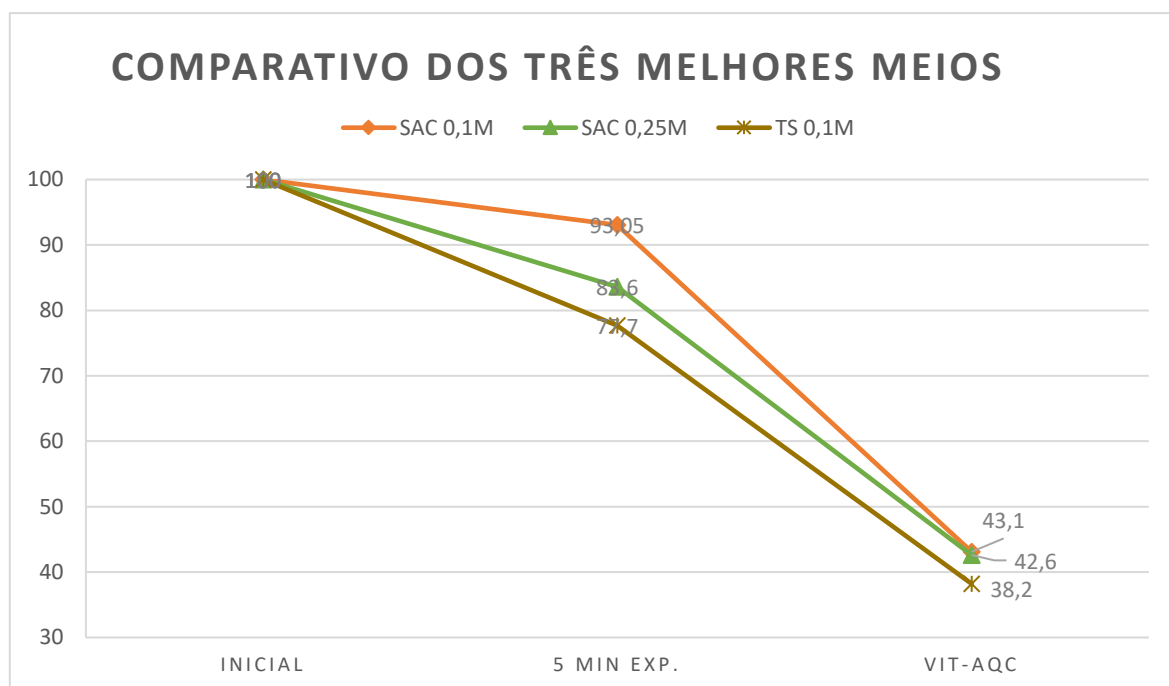


Figura 5.4- Gráfico comparativo dos três meios que apresentam melhor motilidade aos 5 minutos e após vitrificação e aquecimento: sacarose 0,1M; sacarose 0,25M e trealose

5.2 Determinação de tempo mínimo de exposição

Numa segunda abordagem, e para análise do tempo mínimo de exposição das amostras ao crioprotetor antes da congelação, foi analisado, após selecção do meio de criopreservação, sacarose 0,1M, o comportamento da FEM, minuto a minuto até 15 minutos.

Ao fazer esta análise temporal verificamos que o ponto de equilíbrio entre a permeabilização do crioprotector e o efeito tóxico se situa em torno dos 5 minutos (figura 5.5).

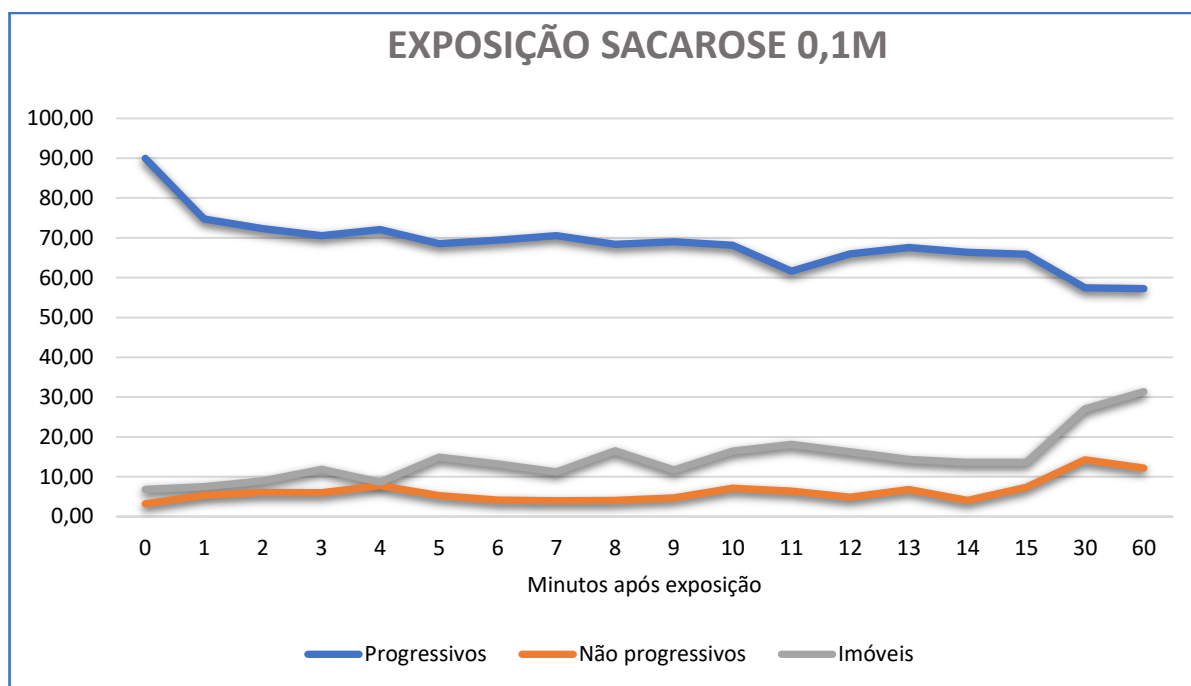


Figura 5.5- Gráfico de exposição dos espermatozoides a sacarose 0,1M ao minuto

5.3 Aquecimento

Quer o aquecimento à temperatura ambiente quer o aquecimento a 37°C resultou na sobrevivência de células espermáticas, baseada na motilidade.

Contrariamente a todo o processo, em que se contabilizaram 100 espermatozoides para cada determinação, nesta fase não foi possível contabilizar as células espermáticas em cada gota dado que zonas distintas da gota possuíam características também distintas (figura 5.6) ao mesmo tempo que, o movimento dos espermatozoides era demasiado rápido para se haver possibilidade de contabilizar em tempo real.

Por esta razão gravaram-se campos distintos ao microscópio a cada 15 minutos durante 60 minutos, contudo, após apresentação da gravação manteve-se a impossibilidade de efetuar uma análise quantitativa final.

De qualquer um dos modos de aquecimento após vitrificação, resultaram na presença de espermatozoides móveis em concentração mais do que suficiente para utilização em técnicas de microinjeção espermática.

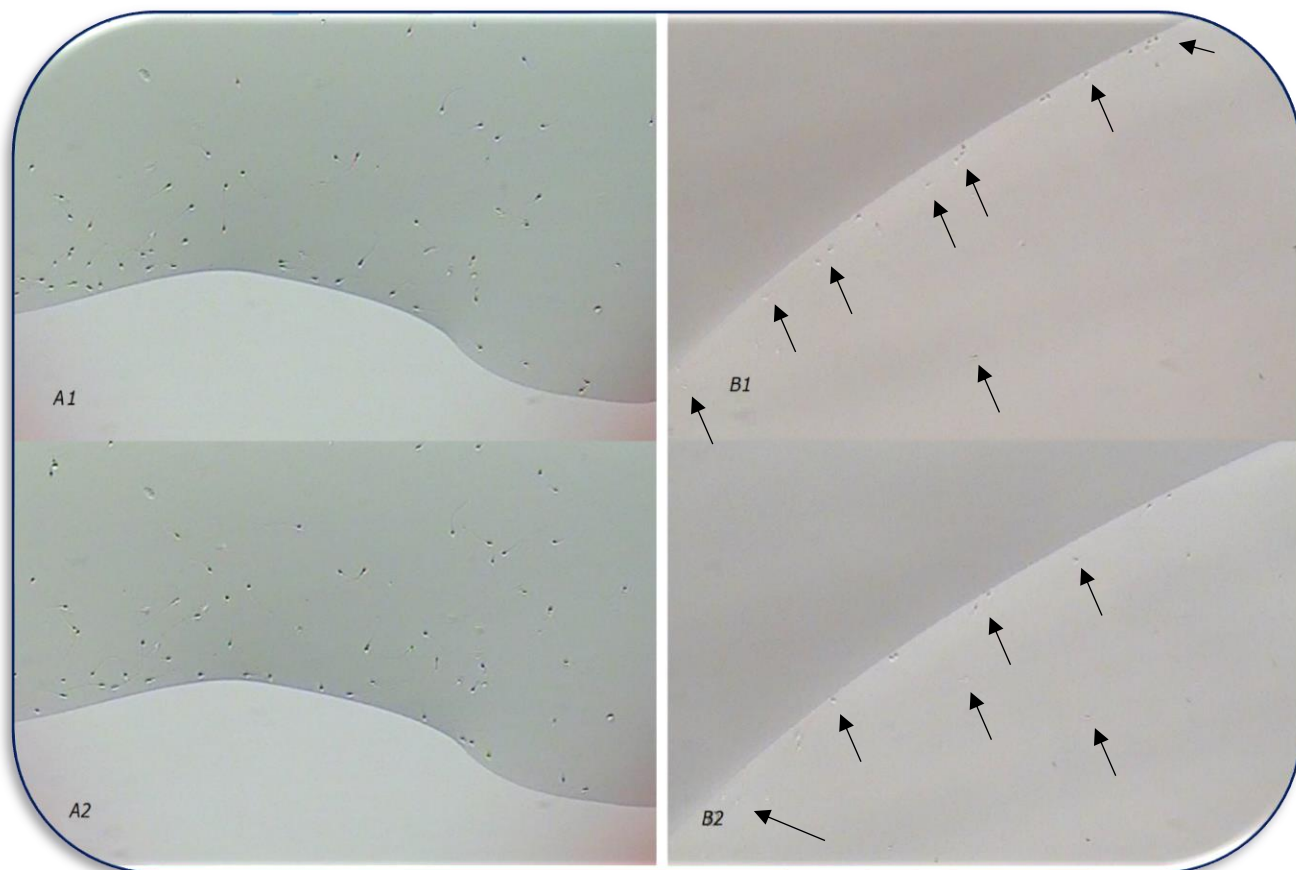


Figura 5.6- Na figura mostram-se espermatozoides suspensos numa gota de solução tampão coberta de óleo mineral- Aquecimento em gota a 37°C em dois campos (A e B) e tempos distintos (A1 /A2 e B1/B2) com Ampliação 400X. Foto inédita.

6. Discussão

Os resultados deste estudo demonstram que é possível a elaboração de um protocolo laboratorial (apêndice V), com recurso à técnica de vitrificação, com reduzidos tempos de processamento e utilização de soluções produzidas internamente ao laboratório que resulte em espermatozoides viáveis para a utilização direta nas técnicas de PMA em particular na técnica de ICSI.

A 50 μ L da amostra capacitada por gradientes, é adicionada parte igual da solução de sacarose 0,1M, gota a gota e com ligeira agitação.

Após 5 minutos de exposição ao crioprotetor, 1 μ L de amostra é colocado em Cryotop, fechado com a respetiva tampa e o sistema é submerso em azoto para vitrificação.

Após esta, trabalhando em câmara de fluxo laminar de superfície aquecida, o aquecimento é efectuado em caixa de ICSI, com 5 μ L de gota de tampão espermático a 37°C e de imediato coberta com 9 mL de óleo mineral pré aquecido. No design do protocolo optou-se por utilizar pequenos volumes de amostra por forma a atingir maiores taxas de aquecimento e arrefecimento (18,67,84) para, posteriormente, definir o suporte necessário para atingir tais taxas. O estudo de suportes foi efectuado com recurso a um volume de 1 μ L de amostra capacitada e utilizando o Cryotop®, específico para vitrificação de embriões, óvulos e pontas de micropipeta *stripper*.

O teste aos suportes foi feito como objectivo de trabalhar o que oferecesse maior eficiência ao processo quer a nível de manuseio que a nível de recuperação.

As pontas de *stripper* apresentam a possibilidade de uma vitrificação totalmente asséptica (53) uma vez seladas no interior de uma palheta de congelação de esperma contudo, no nosso trabalho revelaram-se contraproducentes no manuseio sendo este suporte abandonado para execução do protocolo.

A utilização de Cryotop® demonstrou ser um elemento adjuvante ao protocolo, apresentando, como num estudo anterior (16) boas taxa de recuperação após vitrificação e aquecimento.

Dos 3 métodos de arrefecimento testados, obtiveram-se melhores resultados utilizando o suporte Cryotop® com a tampa colocada antes de ser exposto ao azoto líquido.

A submersão do suporte Cryotop® sem tampa resulta em maiores taxas de transferência térmica, pelo qual era expectável um maior desempenho desta técnica de arrefecimento, no entanto isto não foi verificado.

Com base nas referências estudadas, é possível que exista um efeito de interação entre o arrefecimento e o aquecimento: as maiores taxas de arrefecimento requerem de taxas de aquecimento iguais ou superiores, como está a ser explorado nos trabalhos mais recentes da biofísica da criopreservação (89,90). O sistema de reaquecimento projetado não produz taxas tão elevadas, pois o volume de solução onde é feito é muito limitado (5 uL). Poder-se-ia maximizar as taxas utilizando volumes mais elevados de solução tampão que, adversamente resultaria numa diluição dos espermatozoides recuperados obrigando a posterior tratamento, por concentração da amostra. Nos resultados do presente estudo, o arrefecimento por exposição aos vapores de azoto revelou um efeito deletério com uma taxa de recuperação, após vitrificação e aquecimento, próxima de zero. A explicação destes resultados divergentes a estudos anteriores (82,91) podendo ter origem na dificuldade em otimizar a distancia entre azoto e suporte de vitrificação que resulte nas taxas de transferência térmica desejadas, um processo manual e muito dependente do operador.

Por este motivos e pelos resultados obtidos, recorreu-se ao mergulho de Cryotop® com tampa em azoto, o qual tem a vantagem do material biológico se encontrar num sistema parcialmente fechado o que, aquando do arrefecimento, configura uma maior zona de contenção, reduzindo o possível risco de contaminação(92-94). Relativamente as soluções de criopreservação, o nosso estudo indica que a sacarose 0,1M apresenta uma maior percentagem de mobilidade de espermatozoides (43,10%) após vitrificação e aquecimento estando assim em linha com estudos desenvolvidos no que diz respeito a testes de criopreservação com recurso a sacarose (16,65,95,96).

Em geral, a exposição das amostras às soluções de CPAs resulta na diminuição progressiva da motilidade espermática ao longo do tempo.

O meio comercial TYB[®], meio de glicerol, é o que demonstra uma maior estabilidade no que confere a motilidade entre 5 e 15 minutos apresentando, após vitrificação e aquecimento resultados pobres, que podem ser explicados pelo facto de que este meio comercial é designado para o protocolo específico de *Slow-Freezing*, com uma coordenação específica de tempos e temperaturas de exposição e aquecimento (97,98), algo a que o nosso design experimental não obedecia.

Encontra-se documentada a superioridade da trealose em relação à sacarose, no processo criopreservação, nomeadamente na criopreservação de gâmetas masculinos (99) contudo no nosso estudo tais benefícios não são detetados. A redução da motilidade a fresco e conseqüentemente a redução da motilidade após vitrificação é elevada, evidenciado o efeito da citotoxicidade da solução de trealose e não o seu efeito crioprotector.

Este dado é suportado pelo facto de, após exposição à solução crioprotectora, quer aos 5 minutos quer aos 15, a taxa de motilidade decair abruptamente e essa queda é tanto maior quanto mais concentrada é a solução crioprotetora, atingindo-se melhores resultados na concentração de 0,1M tal como no estudo de Shultz (99) que, aquando do aquecimento obteve 68.9% dos espermatozóides móveis progressivos enquanto que no nosso estudo o máximo atingido foi de 38,20% de mobilidade.

O método de aquecimento necessário ao protocolo desenhado, é um que permite a posterior utilização da amostra para ICSI. Para tal, a amostra é aquecida utilizado um pequeno volume tampão, não sendo possível discernir variações concretas de motilidade espermática entre o aquecimento a 37°C e a temperatura ambiente.

A temperatura ideal de trabalho em laboratório de PMA da cultura e manuseio de gâmetas e embriões não se encontra estabelecida de forma inequívoca, sendo fundamental que exista uma gama de temperaturas aceitável estreita seja estritamente respeitada, a fim de reduzir a variabilidade (100).

Por uma questão de reprodutibilidade protocolar define este trabalho que a temperatura de aquecimento a 37 °C sendo possível com esta conjugação de factores efetuar a utilização direta da amostra na técnica de ICSI uma vez que a amostra final está apenas exposta a sacarose, e não a agentes a que as células

são permeáveis, não sendo por isso necessário procedimentos de lavagem extra no processamento.

Limitações do estudo

A motilidade espermática viu-se reduzida, após exposição às soluções de trealose nas suas diferentes concentrações, acima do expectável com base aos resultados de outros grupos que utilizaram este crioprotetor(99).No nosso estudo foi utilizada uma solução base de trealose 1M comercial (Thawing Solution, Kitazato), diluída com meio tamponado até as concentrações testadas. Para futuros estudos, pode ser preferível a adição de trealose, à solução base, e a testagem de diferentes concentrações do crioprotetor.

Este estudo apresentou a adaptação de um suporte comumente existente para a criopreservação de óvulos e embriões o qual é mais caro que as habituais palhetas. Apesar da possibilidade de adaptação do cryotop ao protocolo, é importante referir que o mesmo é sistema semifechado - a amostra não se encontra selada como no caso das palhetas mas sim somente fechada e em contacto com o azoto circundante- não sendo por isso um protocolo asséptico, a utilização do mesmo traz um risco, ainda que mínimo (92,94), de contaminação cruzada quer do azoto, no qual o submergimos e mantemos a amostra preservada, da própria amostra e das amostras inseridas nos contentores de armazenamento.

Os volumes reduzidos a 1 μ L de amostra, dificilmente se obtém, através deste protocolo, a concentração para utilização na técnica de IUI e FIV as quais requerem um mínimo de 10×10^6 /mL de espermatozoides móveis (101).

Perspetivas futuras

À conclusão deste estudo e após análise da bibliografia existente, salienta-se a necessidade de investigação contínua e multidisciplinar. Não são somente necessários mais e melhores meios técnicos, como suportes de vitrificação de maior eficiência termodinâmica, económicos e com maior segurança como também que estes sejam cada vez mais sustentáveis quer a nível ambiental quer a nível de espaço de armazenamento.

O estudo mais dedicado da termodinâmica do processo de vitrificação é essencial. Por já ter sido reportado a possibilidade de criopreservar espermatozoides sem recurso a crioprotectores (102), abre-se assim a possibilidade de retirar do processamento o passo da adição de crioprotetor e consequentemente os seus

efeitos nocivos, contudo, até aos dias de hoje, a utilização de crioprotectores é indispensável e detém duas faces. Se por um lado são essenciais à manutenção e preservação da integridade celular quer no processo de arrefecimento quer no processo de aquecimento, por outro, são fonte de toxicidade pelo que, estudos futuros devem incidir sobre melhor compreensão dos elementos que compõem os CPA e da sua interação com as amostras espermáticas com vista a formulações de menor citotoxicidade.

O aproveitamento de tecnologias de sequenciação, da informática e as ciências “ómicas” são uma oportunidade para procurar respostas do foro molecular: não só para desenvolver biomarcadores para avaliação da qualidade espermática como também para caracterizar as interações das dinâmicas celulares e para aprofundar o conhecimento não só dos mecanismos que levam ao dano celular e citotoxicidade nos diferentes cenários de criopreservação como também a compreender como manter a integridade do ADN do espermatozoide e a sua funcionalidade.

Este conhecimento beneficiará transversalmente a criopreservação do potencial masculino dentro de outras linhagens como sendo a preservação de amostras de tecido testicular e células estaminais espermáticas.

7. Considerações finais

A criopreservação de sémen humano é utilizada por todo o mundo de forma a manter o potencial de fertilidade masculino para utilização em técnicas de reprodução medicamente assistida.

Os protocolos de criopreservação envolvem a adição de crioprotector aos espermatozoides, arrefecimento e manutenção a temperaturas abaixo de zero.

Apesar da técnica de *Slow-Freezing* ser o *gold standard* da criopreservação de esperma, nos últimos anos a atenção virou-se para a vitrificação, a qual tem sido utilizada amplamente na criopreservação de óvulos e embriões, tendo apresentado não só resultados promissores como amplas vantagens face à técnica clássica.

Apesar de atualmente já se encontrar descrito pelo menos um resultado clínico positivo no que toca a fecundação e gravidez com recurso a espermatozoides humanos vitrificados reportados a vitrificação de espermatozoides mantém-se uma técnica experimental.

Apesar do Cryotop® ser um suporte mais dispendioso que as habituais palhetas de criopreservação de sémen, a sua aplicação para amostras, por exemplo, oligozoospermicas severas, é justificado dado que as palhetas e técnicas convencionais de preservação do esperma podem resultar na perda do material biológico devido à adesão ao esperma do recipiente, à centrifugação e procedimentos de lavagem.

Com este trabalho foram atingidos os marcos base para a aplicação da técnica de vitrificação no campo da manutenção do potencial masculino, resultando em taxas de recuperação significativas e com a vantagem de não necessitar de lavagens adicionais, para utilização direta na técnica de ICSI e, apesar de não ser objeto deste estudo a variância sub-ótima de amostras espermáticas, ao atingir o seu objectivo, que era o de desenvolver um protocolo de criopreservação de amostras

normozoospermicas, torna-se a base para a aplicação em amostras que correspondentes ao factor masculino nomeadamente para pacientes oligozoospermicos e azoospermicos obstrutivos até porque os volumes a estudo e o suporte testado permitem utilizar o protocolo efetuando o ajuste a essas mesmas amostras.

Desenhar um protocolo de vitrificação que abrace amplamente o espectro de variabilidade dos grupos, respeitantes também ao factor masculino e variabilidade individual, traz uma miríade de opções de design experimental que tornam o nosso estudo numa base sobre a qual poderão ser exploradas novas adaptações, contribuindo assim o aperfeiçoamento das tecnologias de criopreservação e conseqüentemente a manutenção do potencial de fertilidade masculino visando aumentar a qualidade dos espermatozoides recuperados após aquecimento e obter melhores taxas de fecundação e gravidez.

8. Referências bibliográficas

1. Mascarenhas MN, Flaxman SR, Boerma T, Vanderpoel S, Stevens GA. National, Regional, and Global Trends in Infertility Prevalence Since 1990: A Systematic Analysis of 277 Health Surveys. *PLoS Med.* 2012;9(12):1–12.
2. Kumar N, Singh A. Trends of male factor infertility, an important cause of infertility: A review of literature. *J Hum Reprod Sci.* 2015;8(4):191–6.
3. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, et al. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009*. *Fertil Steril [Internet].* 2009;92(5):1520–4
4. Ferlin A. Infertility: Practical Clinical Issues for Routine Investigation of the Male Partner. 2020.
5. Reid IR. Recent advances in understanding and managing paget’s disease [version 1; peer review: 3 approved]. *F1000Research.* 2019;8(May).
6. Cooper TG, Noonan E, Eckardstein S Von, Auger J, Baker HWG, Behre HM, et al. World Health Organization reference values for human semen. 2010;16(3):231–45.
7. Edition F. Examination and processing of human semen.
8. Kamischke A, Nieschlag E. Analysis of medical treatment of male infertility. 1999;14:1–23.
9. March MR, Isidori A. New frontiers in the treatment of male sterility. 2002;65:279–81.
10. Ivf S, Street M. The essential partnership between diagnostic andrology and modern assisted reproductive technologies. 2000;9(7):1209–13.
11. Bosch E, Vos M De, Humaidan P. The Future of Cryopreservation in Assisted Reproductive Technologies. 2020;11(February):1–15.
12. Oseguera-lópez I, Ruiz-díaz S, Ramos-ibeas P. Novel Techniques of Sperm Selection for Improving IVF and ICSI Outcomes. 2019;7(November).
13. Huleihel M, Lunenfeld E. Approaches and technologies in male fertility preservation. *Int J Mol Sci.* 2020;21(15):1–19.

14. Process and Pitfalls of Sperm Cryopreservation. *J Clin Med.* 2017;6(9):89.
15. Kalthur G, Adiga SK, Upadhya D, Rao S, Kumar P. Effect of cryopreservation on sperm DNA integrity in patients with teratospermia. *Fertil Steril.* 2008;89(6):1723–7.
16. Endo Y, Fujii Y, Shintani K, Seo M, Motoyama H, Funahashi H. Single spermatozoon freezing using cryotop. *J Mamm Ova Res.* 2011;28(1):47–52.
17. de Klerk C, Macklon NS, Heijnen EMEW, Eijkemans MJC, Fauser BCJM, Passchier J, et al. The psychological impact of IVF failure after two or more cycles of IVF with a mild versus standard treatment strategy. *Hum Reprod.* 2007;22(9):2554–8.
18. Fahy GM, Wowk B. Chapter 2 Principles of Cryopreservation by Vitrification. 2015.
19. Tao Y, Sanger E, Saewu A, Leveille M. Human sperm vitrification : the state of the art. 2020;5:1–10.
20. Endo Y, Fujii Y, Kurotsuchi S, Motoyama H, Funahashi H. Successful delivery derived from vitrified-warmed spermatozoa from a patient with nonobstructive azoospermia. *Fertil Steril [Internet].* 2012;98(6):1423–7.
21. Mawhinney M, Mariotti A. Physiology, pathology and pharmacology of the male reproductive system. *Periodontol 2000.* 2013 Feb;61(1):232–51.
22. Of CS, Penis THE. Chapter 2: Anatomy and Physiology of erection: Pathophysiology of erectile dysfunction. *Int J Impot Res.* 2003;15:S5–8.
23. Gurung P, Yetiskul E, Jialal I. Physiology, Male Reproductive System. In *Treasure Island (FL);* 2020.
24. Durairajanayagam D, Agarwal A, Ong C. Causes , effects and molecular mechanisms of testicular heat stress. *Reprod Biomed Online [Internet].* 2015;30(1):14–27.
25. Puppo V, Puppo G. Comprehensive review of the anatomy and physiology of male ejaculation: Premature ejaculation is not a disease. *Clin Anat.* 2016;29(1):111–9.
26. Park YJ, Pang MG. Mitochondrial functionality in male fertility: From spermatogenesis to fertilization. *Antioxidants.* 2021;10(1):1–27.
27. Griswold MD. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. 1998;9.
28. Words K. Ontogenesis of Testis Development and. 2010;199–212.
29. Nishimura H, L'Hernault SW. Spermatogenesis. *Curr Biol.* 2017;27(18):R988–94.
30. Bromfield JJ. Seminal fluid and reproduction: Much more than previously thought. *J Assist Reprod Genet.* 2014;31(6):627–36.
31. O'Donnell L, Nicholls PK, O'Bryan MK, McLachlan RI, Stanton PG. Spermiation. *Spermatogenesis.* 2011;1(1):14–35.
32. Holstein A, Schulze W, Davidoff M. Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. 2003;16:1–16.
33. Muciaccia B, Boitani C, Berloco BP, Nudo F, Spadetta G, Rooij DG De, et al. Novel Stage Classification of Human Spermatogenesis Based on Acrosome. 2013;89:1–10.

34. Griswold MD. Spermatogenesis: The commitment to Meiosis. *Physiol Rev.* 2016;96(1):1–17.
35. Sharma R, Agarwal A. *Spermatogenesis: An Overview.* 2011;
36. McIntosh, J. R., & Koonce, M. P. (1989). Mitosis. *Science*, 246(4930), 622–62
37. Wang J, Li Y, Deng S, Liu Y, Lian Z. Recent Research Advances in Mitosis during. (di):1–15.
38. Bender I. The Developmental Pro- cess of Spermatogen- esis. 2019;7(1):16–8.
39. Hecht NB. Molecular mechanisms of male germ cell differentiation. *BioEssays.* 1998;20(7):555–61.
40. Tanaka A, Nagayoshi M, Awata S. Completion of meiosis in human primary spermatocytes through in vitro coculture with Vero cells. 2003;79(March).
41. Babakhanzadeh E, Nazari M, Ghasemifar S, Khodadadian A. Some of the Factors Involved in Male Infertility : A Prospective Review. 2020;29–41.
42. Fernandes Boaro Martins MR, Carvalho Pinto e Silva JR de. Ultrastructural Aspects of Spermatids in Isogenic Black Mouse C57BL6J. *Int J Morphol.* 2005;23(4):323–8.
43. Teves ME, Nagarkatti-Gude DR, Zhang Z, Strauss JF. Mammalian axoneme central pair complex proteins: Broader roles revealed by gene knockout phenotypes. *Cytoskeleton.* 2016;73(1):3–22.
44. Rengan AK, Agarwal A, van der Linde M, du Plessis SS. An investigation of excess residual cytoplasm in human spermatozoa and its distinction from the cytoplasmic droplet. *Reprod Biol Endocrinol [Internet].* 2012;10(1):1.
45. O'Donnell L. Mechanisms of spermiogenesis and spermiation and how they are disturbed. *Spermatogenesis.* 2014;4(2):e979623.
46. Georgadaki K, Khoury N, Spandidos DA, Zoumpourlis V. The molecular basis of fertilization (Review). *Int J Mol Med.* 2016;38(4):979–86.
47. Schill WB, Töpfer-petersen E, Heissler E. The sperm acrosome: Functional and clinical aspects. *Hum Reprod.* 1988;3(2):139–45.
48. Pimenta-Marques A, Bento I, Lopes CAM, Duarte P, Jana SC, Bettencourt-Dias M. A mechanism for the elimination of the female gamete centrosome in *Drosophila melanogaster*. *Science (80-).* 2016;353(6294):1–16.
49. Chemes E, Sedo CA. Tales of the Tail and Sperm Head Aches Changing concepts on the prognostic significance of sperm pathologies affecting the head , neck and tail. 2012;(November 2011):14–23.
50. Eddy EM, Toshimori K, O'Brien DA. Fibrous sheath of mammalian spermatozoa. *Microsc Res Tech.* 2003;61(1):103–15.
51. Barros, F., and R. Figueiredo. "Manual de medicina sexual: Visão multidisciplinar." HSJ Consul. Portugal (2014).
52. Suárez JP, Sc M, Plessis SS, Ph D, Maya WDC, Ph D. Spermatozoa : A Historical Perspective. 2018;12(3):182–90.

53. Schulz M, Risopatrón J, Uribe P, Isachenko E, Isachenko V, Sánchez R. Human sperm vitrification : A scientific report. 2020;(June):1642–50.
54. Sherman JK. Synopsis of the use of frozen human semen since 1964: state of the art of human semen banking. *Fertil Steril* [Internet]. 1973;24(5):397–412.
55. Vanderzwalmen P, Ectors F, Panagiotidis Y, Schu M, Murtinger M, Wirleitner B. The Evolution of the Cryopreservation Techniques in Reproductive Medicine. :142–57.
56. Pennings G, Couture V, Ombelet W. Social sperm freezing. *Hum Reprod*. 2021;36(4):833–9.
57. Bozkurt Y. Cryopreservation Biotechnology in Biomedical and Biological Sciences. *Cryopreservation Biotechnology in Biomedical and Biological Sciences*. 2018.
58. Mortimer D. Current and future concepts and practices in human sperm cryobanking. *Reprod Biomed Online* [Internet]. 2004;9(2):134–51.
59. Santo M Di, Tarozzi N, Nadalini M, Borini A. Human Sperm Cryopreservation : Update on Techniques , Effect on DNA Integrity , and Implications for ART. 2012;2012.
60. Giwa SE. New Approaches to Cryopreservation of Cells , Tissues , and Organs. 2019;29406:197–215.
61. Arav A, Yavin S, Zeron Y, Natan D, Dekel I, Gacitua H. New trends in gamete's cryopreservation. *Mol Cell Endocrinol*. 2002;187(1–2):77–81.
62. Agarwa A, Tvrda E. Slow freezing of human sperm. *Methods Mol Biol*. 2017;1568:67–78.
63. Huebinger J, Han HM, Hofnagel O, Vetter IR, Bastiaens PIH, Grabenbauer M. Direct Measurement of Water States in Cryopreserved Cells Reveals Tolerance toward Ice Crystallization. *Biophys J* [Internet]. 2016;110(4):840–9.
64. Slabbert M, du Plessis SS, Huyser C. Large volume cryoprotectant-free vitrification: An alternative to conventional cryopreservation for human spermatozoa. *Andrologia*. 2015;47(5):594–9.
65. Mazur P. Freezing of living cells: Mechanisms and implications. *Am J Physiol - Cell Physiol*. 1984;16(2):0–4.
66. Woodruff TK. Chapter 7 The Science of Cryobiology. 2007;
67. Bank HL, Ph D, Brockbank KGM, Ph D, Carolina S, HI B, et al. Basic Principles of Cryobiology. 1987;137–43.
68. Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation.pdf.
69. Fahy GM. Cryoprotectant toxicity neutralization. *Cryobiology* [Internet]. 2010;60(3 SUPPL.):S45–53.
70. Hezavehei, Maryam. "Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches." *Reproductive biomedicine online* 37.3 (2018): 327-33
71. Best BP. Cryoprotectant Toxicity: Facts, Issues, and Questions. *Rejuvenation Res*. 2015;18(5):422–36.

72. Shu Z, Hughes SM, Fang C, Huang J, Fu B, Zhao G, et al. A study of the osmotic characteristics, water permeability, and cryoprotectant permeability of human vaginal immune cells. *Cryobiology* [Internet]. 2016;72(2):93–9.
73. McCarthy MJ, Baumber J, Kass PH, Meyers SA. Osmotic stress induces oxidative cell damage to rhesus macaque spermatozoa. *Biol Reprod*. 2010;82(3):644–51.
74. Wowk, Brian. "Thermodynamic aspects of vitrification." *Cryobiology* 60.1 (2010): 11-22.
75. Zobrist B, Marcolli C, Peter T, Koop T. Heterogeneous Ice Nucleation in Aqueous Solutions : the Role of Water Activity. 2008;3965–75.
76. Aizpurua J, Medrano L, Enciso M, Sarasa J, Romero A, Fernández MA. New permeable cryoprotectant-free vitrification method for native human sperm. 2017;32(10):2007–15.
77. Li Y xin, Zhou L, Lv M qi, Ge P, Liu Y chen, Zhou D xia. Vitrification and conventional freezing methods in sperm cryopreservation: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2019;233:84–92.
78. Sharma R, Kattoor AJ, Ghulmiyyah J, Agarwal A. Effect of sperm storage and selection techniques on sperm parameters. *Syst Biol Reprod Med*. 2015;61(1):1–12.
79. Nijs M, Ombelet W. Cryopreservation of human sperm. 2001;158–63.
80. Liu S, Li F. Cryopreservation of single-sperm: Where are we today? *Reprod Biol Endocrinol*. 2020;18(1):1–12.
81. Hoon T, Choel S, Hyun J, Yoon J, Hong J, Seo U, et al. Cryopreservation and its clinical applications. *Integr Med Res* [Internet]. 2017;6(1):12–8.
82. Li Y xin, Zhou L, Lv M qi, Ge P, Liu Y chen, Zhou D xia. Vitrification and conventional freezing methods in sperm cryopreservation: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2019 Feb 1;233:84–92.
83. Seki, Shinsuke, and P. Mazur. "The dominance of warming rate over cooling rate in the survival of mouse oocytes subjected to a vitrification procedure." *Cryobiology* 59.1 (2009): 75-8
84. Heo YS, Nagrath S, Moore AL, Zeinali M, Irimia D, Stott SL, et al. "Universal" vitrification of cells by ultra-fast cooling. *Technology*. 2015;03(01):64–71.
85. Palomar Rios A, Molina Botella I. Description and Outcomes of Current Clinical Techniques for Sperm Cryopreservation. *Eur Med J*. 2019;5(August):79–92.
86. Rios GL, Mucci NC, Kaiser GG, Alberio RH. Effect of container, vitrification volume and warming solution on cryosurvival of in vitro-produced bovine embryos. *Anim Reprod Sci*. 2010;118(1):19–24.

87. Kitazato®. Vitrification Cryotop®. Kitazato Corp. 2020;1.
88. Fortin, Marie-Fabienne; Côté, José; Fillion F. Fundamentos e etapas do processo de investigação. 2006;1-581.
89. Jin B, Mazur P. High survival of mouse oocytes/embryos after vitrification without permeating cryoprotectants followed by ultra-rapid warming with an IR laser pulse. *Sci Rep*. 2015;5:1-6.
90. Mazur P. 2. Roles of intracellular ice formation, vitrification of cell water, and recrystallization of intracellular ice on the survival of mouse embryos and oocytes. *Cryobiology*. 2012;65(3):339.
91. Isachenko V, Isachenko E, Katkov II, Montag M, Dessolet S, Nawroth F, et al. Cryoprotectant-Free Cryopreservation of Human Spermatozoa by Vitrification and Freezing in Vapor: Effect on Motility, DNA Integrity, and Fertilization Ability. 2004;1173(June):1167-73.
92. Bielanski A. A review of the risk of contamination of semen and embryos during cryopreservation and measures to limit cross-contamination during banking to prevent disease transmission in ET practices. *Theriogenology* [Internet]. 2012;77(3):467-82.
93. Bielanski A. Experimental microbial contamination and disinfection of dry (vapour) shipper dewars designed for short-term storage and transportation of cryopreserved germplasm and other biological specimens. *Theriogenology*. 2005;63(7):1946-57.
94. Molina I, Mari M, Martínez JV, Novella-Maestre E, Pellicer N, Pemán J. Bacterial and fungal contamination risks in human oocyte and embryo cryopreservation: open versus closed vitrification systems. *Fertil Steril*. 2016;106(1):127-32.
95. O'Neill HC, Nikoloska M, Ho HT, Doshi A, Maalouf W. Improved cryopreservation of spermatozoa using vitrification: comparison of cryoprotectants and a novel device for long-term storage. *J Assist Reprod Genet*. 2019;36(8):1713-20.
96. Hossain AM, Osuamkpe CO. Sole use of sucrose in human sperm cryopreservation. *Arch Androl*. 2007;53(2):99-103.
97. Semen R, Sperm P. Sperm Thawing. :19713.
98. Medium SM. Semen and Sperm Freezing Protocol. :0-1.
99. Schulz M, Risopatrón J, Matus G, Pineda E, Rojas C, Isachenko V, et al. Trehalose sustains a higher post-thaw sperm motility than sucrose in vitrified human sperm. *Andrologia*. 2017;49(9):2-4.
100. Consensus Group C. 'There is only one thing that is truly important in an IVF laboratory: everything' Cairo Consensus Guidelines on IVF Culture Conditions. *Reprod Biomed Online* [Internet]. 2020;40(1):33-60.

101. Allahbadia GN. Intrauterine Insemination: Fundamentals Revisited. J Obstet Gynecol India. 2017;67(6):385-92.

102. Isachenko, E., Isachenko, V., Katkov, I. I., & Nawroth, F. (2003). Vitrification of human spermatozoa without cryoprotectants: review of problem and practical success. *Reprod Biomed Online*, 6(2), 191-20

APÊNDICES

APÊNDICE
I



CONSENTIMENTO INFORMADO E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO EM INVESTIGAÇÃO

∞ Informação ao Utente ∞

Autora:

Micaela Josefa Pedro Fernandes

Técnica Superior de Diagnóstico e Terapêutica

Ramo: Análises Clínicas e Saúde Pública

O atual trabalho de investigação, intitulado “Otimização de Técnicas de Processamento de Sémén Criopreservado”, insere-se num estudo que decorre no âmbito do Mestrado em Tecnologias Clínico-Laboratoriais e tem como principal objetivo aperfeiçoar as técnicas laboratoriais de modo a melhorar as taxas de recuperação de sémén congelado.

O resultado da investigação, aprovada pelo conselho de Ética da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, orientada pelo Professora Doutora Carina Ladeira e pelo Diretor do Laboratório Ginemed, Dr. Miguel Gallardo, será apresentado na **Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa** em 2021 podendo, se desejar, contactar a autora para se inteirar dos resultados obtidos.

Este estudo não lhe trará nenhuma despesa ou risco. A sua participação é voluntária e, ainda que consinta a participação, poderá retirar-se do mesmo em qualquer altura sendo que, asseguro que serão mantidos o anonimato e a confidencialidade dos seus dados, pois consagro como obrigação e dever o sigilo profissional.

Assim, por tomar conhecimento geral deste estudo e por compreender que os dados recolhidos durante o estudo possam ser do conhecimento dos membros da equipa de investigação, sempre que necessário para o estudo. Autorizo que os membros da equipa tenham acesso a esses dados.

Compreendo que, caso esta investigação venha a ser publicada, todos os dados serão mantidos anónimos e nenhuma informação será identificável como sendo minha.

Foi-me dada a oportunidade de ler e considerar a informação apresentada e fazer perguntas, as quais foram respondidas de forma satisfatória.

Tomei conhecimento da informação acima referida, declaro que aceito participar nesta investigação.

Assinatura: _____ Data: _____

Apêndice II

Complemento da informação oral providenciada ao paciente



ESCOLA SUPERIOR DE
TECNOLOGIA DA SAÚDE
DE LISBOA
INSTITUTO PARA O FUTURO DA SAÚDE

CONSENTIMENTO INFORMADO E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO EM INVESTIGAÇÃO

∞ Informação ao Utente ∞

OBJETIVO DO ESTUDO:

O objetivo do estudo é o de otimizar as técnicas de criopreservação de espermatozoides.

BENEFÍCIOS POTENCIAIS PARA A SOCIEDADE

Melhorar as técnicas de preservação de espermatozoides pode simplificar o processo, reduzir os custos associados e aumentar as taxas de sobrevivência dos espermatozoides congelados.

PROCEDIMENTOS

O sémen sobejante de procedimentos de congelação que, de outro modo não teria destino que não o descarte, será utilizado para proceder à preservação dos espermatozoides sob variação de alguns parâmetros sendo estes:

- Tempo de exposição ao azoto.
- Congelação com vários tipos ou várias concentrações de crioprotectores.
- Congelação efetuada em vários suportes: Palhetas, *vials*, esferas.
- Descongelação a várias temperaturas com recurso ou não a reagentes estabilizadores.

RISCOS POTENCIAIS

O estudo não envolve qualquer risco potencial, quer sejam físicos, sociais, legais ou financeiros. As amostras recolhidas para o estudo serão destruídas no prazo de duração do projecto.

DURAÇÃO DO ESTUDO

O estudo será desenvolvido de setembro de 2020 a 30 de Junho de 2021.

TRATAMENTO DE DADOS e CONFIDENCIALIDADE

Os resultados serão trabalhados somente estatisticamente.

O tratamento dos dados obtidos garante o anonimato, nunca sendo feito qualquer alusão que possa revelar a identidade dos participantes uma vez que a todos será atribuído um código, assegurando que qualquer publicação, incluindo a publicação na Internet, direta ou indiretamente, levará a uma violação do anonimato e da confidencialidade acordada.

O prazo de conservação de dados pessoais, encontra-se de acordo com os pontos 2 e 4 do artigo 21º da lei de protecção de dados pessoais n.º 58/2019, de 08 de agosto.

2/3



ESCOLA SUPERIOR DE
TECNOLOGIA DA SAÚDE
DE LISBOA
INSTITUTO PARA O FUTURO DA SAÚDE

CONSENTIMENTO INFORMADO E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO EM INVESTIGAÇÃO

∞ Informação ao Utente ∞

Podendo contactar as instituições caso deseje usufruir do direito de:

- Solicitar ao responsável pelo tratamento acesso aos dados pessoais que lhe digam respeito, bem como a sua retificação ou eliminação, e a limitação do tratamento no que diga respeito ao titular dos dados, ou do direito de se opor ao tratamento, bem como do direito à portabilidade dos dados;
- Retirar o consentimento em qualquer altura, sem comprometer a licitude do tratamento efetuado com base no consentimento previamente dado;
- Apresentar reclamação junto da Comissão Nacional de Protecção de Dados;
- A existência de decisões automatizadas, incluindo a definição de perfis, e informações úteis relativas à lógica subjacente, bem como a importância e as consequências previstas de tal tratamento para o titular dos dados.

Para tal, o serviço dedicado à protecção de dados das instituições são:

EsteSL	Ginemed
Nuno Pires: Encarregado Protecção Dados Telf. +351210464700 +351210464708 Email. npires@net.ipl.pt	Serviço de protecção de dados Ginemed Calle Farmaceutico Murriilo Herrera 3, 41010 Sevilla Email_lopd@ginemed.es

Eu, Micaela Pedro, comprometo-me formalmente como autora do projecto, assumindo o conhecimento dos princípios fundamentais da ética na investigação científica sendo que este estudo será norteado por esses mesmos princípios, durante todo o período em que o mesmo decorrer.
Contacto: 961151276

Agradeço a sua participação.

A Autora

3/3

APÊNDICE
III

Aprovação da direção da clínica da Ginemed para execução do estudo experimental



Pedido de autorização à Ginemed

Investigação no âmbito do Mestrado em Tecnologias Clínico-Laboratoriais da
Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa

Autora:
Micaela Josefa Pedro Fernandes
Técnica Superior de Diagnóstico e Terapêutica
Ramo: Análises Clínicas e Saúde Pública

O trabalho de investigação, intitulado "Optimização de Técnicas de Processamento de Sêmen Criopreservado", insere-se num estudo que decorre no âmbito do Mestrado em Tecnologias Clínico-Laboratoriais e tem como principal objetivo aperfeiçoar as técnicas laboratoriais por modo a que essa melhora se reflita na melhoria das taxas de recuperação de sêmen para posteriormente ser utilizado em tratamentos de PMA.

As características gerais do estudo são as seguintes:

1. OBJETIVO

O objetivo do estudo é o de melhorar as técnicas de criopreservação de sêmen quer para as preservações de fertilidade quer para congelações para ciclo.

2. BENEFÍCIOS POTENCIAIS PARA A SOCIEDADE

Ao melhorar as técnicas de preservação de sêmen poderemos atingir melhores e maiores taxas de recuperação de sêmen criopreservado para utilização em procedimentos de PMA.

3. ACESSO AOS UTENTES

Os utentes terão que consentir o acesso à sua amostra, mediante assinatura do consentimento informado.

4. PROCEDIMENTOS

O sêmen sobejante de procedimentos de congelação que, de outro modo não teria outro destino que não o descarte, será utilizado para proceder à sua preservação sob variação de alguns parâmetros sendo estes:

- Tempo de exposição ao azoto.
- Congelação com vários tipos ou várias concentrações de crioprotectores.
- A congelação poderá ser efetuada em vários suportes: Palhetas, vials, esferas.
- Descongelação a várias temperaturas com recurso ou não a reagentes estabilizadores.



Pedido de autorização à Ginemed

Investigação no âmbito do Mestrado em Tecnologias Clínico-Laboratoriais da
Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa

Autora:
Micaela Josefa Pedro Fernandes
Técnica Superior de Diagnóstico e Terapêutica
Ramo: Análises Clínicas e Saúde Pública

O trabalho de investigação, intitulado "Optimização de Técnicas de Processamento de Sêmen Criopreservado", insere-se num estudo que decorre no âmbito do Mestrado em Tecnologias Clínico-Laboratoriais e tem como principal objetivo aperfeiçoar as técnicas laboratoriais por modo a que essa melhora se reflita na melhoria das taxas de recuperação de sêmen para posteriormente ser utilizado em tratamentos de PMA.

As características gerais do estudo são as seguintes:

1. OBJETIVO

O objetivo do estudo é o de melhorar as técnicas de criopreservação de sêmen quer para as preservações de fertilidade quer para congelações para ciclo.

2. BENEFÍCIOS POTENCIAIS PARA A SOCIEDADE

Ao melhorar as técnicas de preservação de sêmen poderemos atingir melhores e maiores taxas de recuperação de sêmen criopreservado para utilização em procedimentos de PMA.

3. ACESSO AOS UTENTES

Os utentes terão que consentir o acesso à sua amostra, mediante assinatura do consentimento informado.

4. PROCEDIMENTOS

O sêmen sobejante de procedimentos de congelação que, de outro modo não teria outro destino que não o descarte, será utilizado para proceder à sua preservação sob variação de alguns parâmetros sendo estes:

- Tempo de exposição ao azoto.
- Congelação com vários tipos ou várias concentrações de crioprotectores.
- A congelação poderá ser efetuada em vários suportes: Palhetas, vials, esferas.
- Descongelação a várias temperaturas com recurso ou não a reagentes estabilizadores.



5. TRATAMENTO DE DADOS e CONFIDENCIALIDADE

Os resultados serão trabalhados somente estatisticamente.

O tratamento dos dados obtidos garante o anonimato dos participantes, nunca sendo feito qualquer tipo de uso que possa revelar a identidade dos participantes uma vez que a todos os participantes será dado um código, assegurando que qualquer publicação, incluindo a publicação na Internet, direta ou indiretamente, levará a uma violação do anonimato e da confidencialidade acordada.

6. RISCOS POTENCIAIS

O estudo não envolve qualquer risco potencial, quer sejam físicos, sociais, legais ou financeiros

7. DURAÇÃO DO ESTUDO

O estudo será desenvolvido de Setembro de 2020 a 30 de Junho de 2021.

O resultado da investigação, orientada pelo Professora Doutora Carina Ladeira e pelo Diretor do Laboratório Ginemed, Dr. Miguel Gallardo e será apresentado na Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa em 2021.

Assim, eu, Micaela Pedro, comprometendo-me formalmente como autora do estudo e assumindo o conhecimento dos princípios fundamentais da ética na investigação científica durante todo o período em que o mesmo decorrer, solicito autorização para a recolha de dados necessária ao estudo supramencionado.

Formalização da Autorização de Recolha de Dados

Eu Ace Paulo Fernandes Soares, Diretora Clínica da Clínica Ginemed, autorizo a recolha de dados e o processamento de amostras no âmbito do estudo de investigação "Optimização de Técnicas de Processamento de Sêmen reservado".

A Responsável: Ace Paulo Fernandes Soares
Em Lisboa, a 30 de 6 de 2020



5. TRATAMENTO DE DADOS e CONFIDENCIALIDADE

Os resultados serão trabalhados somente estatisticamente.

O tratamento dos dados obtidos garante o anonimato dos participantes, nunca sendo feito qualquer tipo de uso que possa revelar a identidade dos participantes uma vez que a todos os participantes será dado um código, assegurando que qualquer publicação, incluindo a publicação na Internet, direta ou indiretamente, levará a uma violação do anonimato e da confidencialidade acordada.

6. RISCOS POTENCIAIS

O estudo não envolve qualquer risco potencial, quer sejam físicos, sociais, legais ou financeiros

7. DURAÇÃO DO ESTUDO

O estudo será desenvolvido de Setembro de 2020 a 30 de Junho de 2021.

O resultado da investigação, orientada pelo Professora Doutora Carina Ladeira e pelo Diretor do Laboratório Ginemed, Dr. Miguel Gallardo e será apresentado na Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa em 2021.

Assim, eu, Micaela Pedro, comprometendo-me formalmente como autora do estudo e assumindo o conhecimento dos princípios fundamentais da ética na investigação científica durante todo o período em que o mesmo decorrer, solicito autorização para a recolha de dados necessária ao estudo supramencionado.

Formalização da Autorização de Recolha de Dados

Eu Miguel Gallardo Ladeira, Director do Laboratório da Clínica Ginemed, autorizo a recolha de dados e o processamento de amostras no âmbito do estudo de investigação "Optimização de Técnicas de Processamento de Sêmen Criopreservado".

O Responsável: Miguel Gallardo Ladeira
Em Lisboa, a 06 de Julho de 2020

APÊNDICE

IV

Tabela 3- Materiais, equipamento e meios

Equipamentos	Marca	Modelo/Produto
Camara de biossegurança	KSystems	L124 IVF Workstation
Microscópio	Olympus	CX43
Microscópio Invertido	Olympus	IX
Placa de aquecimento	Labotect	Hot Plate 062
Estufa	Selecta	Prebatem-TFT
Centrifuga	Eppendorf	Centrifuge- 5702
Seladora	SYMS	016399-SYMS sealer
Balança	AND	EJ-12 Precision
Materiais	Marca	Modelo/Produto
Pontas de micropipeta	Eppendorf	Ep T.I.P.S.
Microtubos(1,5 mL/0,5mL)	Eppendorf	Tubes® 3810X
Micropipeta	Eppendorf	Research® plus
Pipetas de Pasteur Estéreis	Deltalab	3mL graduada
Tubos de Centrifuga	Oosafe	15 mL Centrifuge Tube
Suporte de congelação	Kitazato	Cryotop® ®
Laminas	Deltalab	Laminas de bordos esmerilados
Lamelas	Deltalab	Lamelas 24X24 mm
Cuba de Vitrificação	Kitazato	
Pontas Stripper	EZ-Tips	7-72-2135/1
Caixas de 60mm	Oosafe	OOPW-ST03
Micropipeta Stripper	Cooper	MXL3-STR
Reagentes	Marca	Modelo/Produto
Trealose	Kitazato	Thawing Solution (TS) 4.0mL
Sacarose	Sigma Aldrich	Sucrose 250 gr.BioXtra,99.5% (GC)
Tampão espermático	Merck	Gems Sperm Buffer
Azoto	Airliquid	Azoto Líquido
Óleo Mineral	Sage	ART-4008
Meio de Congelação	Irvine	TYB® with Glicerol e Gentamicina

APÊNDICE

V

PRINCÍPIO

A vitrificação é um procedimento técnico de preservação do potencial reprodutivo masculino para utilização direta na técnica de ICSI.

Contextualização

De um modo geral a vitrificação envolve a adição gradual de crioprotetores numa suspensão de espermatozoides, posteriormente carregada num suporte de vitrificação, mergulhada diretamente em azoto líquido e armazenada. Aquando da utilização da amostra armazenada, esta é aquecida a 37°C em solução tampão.

A taxa de aquecimento, seguida da taxa de arrefecimento é a variável de maior importância uma vez que é nas incursões de temperatura que há maior risco de formação e expansão das moléculas de gelo. Outros factores determinantes das taxas térmicas e consequentemente do sucesso da técnica são os volumes adequados de amostra e o tipo de material do suporte.

Volumes de amostra reduzidos e suportes de criopreservação que facilitem transferência de calor, são necessários para o sucesso da técnica de vitrificação. Um volume baixo de amostra, permite não só atingir linearmente as taxas de transferência térmica necessárias aos processos de arrefecimento e aquecimento como também facilitam a distribuição uniforme da temperatura em toda a amostra.

AMOSTRA

Este procedimento é direccionado **apenas** para amostras normozoospérmicas.

Após a colheita, aguardar durante 10 a 30 minutos até a liquefação do ejaculado.

MATERIAL

Reagentes

- Sacarose - Sigma Aldrich (Sucrose 250 gr.BioXtra,99.5% (GC))
- Solução tampão - Genea Biomedx (Sperm Buffer)

PROCEDIMENTO

A- Preparação de solução crioprotetora

1. Numa balança de precisão e com recurso a copo graduado de 25mL, pesar 1,7115g de sacarose;
2. Adicionar 20 mL de *Sperm Buffer* agitando bem até à completa dissolução da sacarose;
3. Transferir a solução para um balão volumétrico de 50mL;
4. Aferir com tampão até à marca dos 50 mL.
5. Rotular o balão e armazenar

B- Identificação dos suportes de criopreservação

Preparar, imprimir e colar no cryotop as etiquetas identificativas com os seguintes dados:

1. Iniciais do paciente;
2. Número de processo;
3. Número de laboratório;
4. Data de vitrificação.

C- Separação da fracção de espermatozoides móveis

1. Homogeneizar a amostra com pipeta Pasteur;
2. Colocar 1 ml da amostra num tubo cónico estéril de 15 ml e, sobre esta, colocar delicadamente 1,2 mL de tampão;
3. Inclinar o tubo em um ângulo de cerca de 45 °, para aumentar a área de superfície de interface de tampão espermático e incubar por 1 hora a 37°C.
4. Retornar suavemente o tubo para a posição vertical e remover 1,0 ml superior de meio. Esta fracção conterá células de esperma altamente móveis;
5. Diluir com 1,5–2,0 ml de meio tampão;
6. Centrifugar a 300–500g por 5 minutos e descartar o sobrenadante;
7. Ressuspender o pellet de esperma em 0,5 ml de meio tampão e proceder à avaliação de: concentração, motilidade total e motilidade progressiva dos espermatozoides.

D- Vitrificação

1. Adicionar à suspensão, gota a gota, 0,5mL da solução de sacarose com ligeira agitação;
2. Com uma micropipeta carregar os cryotop com 0,1 µL, cobrir com a tampa, e mergulhar em azoto líquido.

Nota: Ter em atenção para que o tempo decorrido entre o início da adição do crioprotetor e o mergulho em azoto não ascenda os 5 minutos. Armazenar a amostra e registar a localização na folha de laboratório e no sistema informático.

E- Aquecimento

1. Numa caixa de 60mm de diâmetro aquecida colocar uma gota de 5 µL de tampão previamente aquecido à temperatura de 37°C.
2. Ainda em azoto, retirar a tampa do Cryotop;
3. Rapidamente, retirar o Cryotop do azoto e mergulhar a zona onde se encontra a amostra na gota tampão e suavemente agitar para que a suspensão seja liberta do suporte;
4. Cobrir a gota com aproximadamente 9 mL de óleo mineral;
5. Observar ao microscópio invertido;
6. Os espermatozoides móveis recuperados podem ser utilizados para ICSI.

REFERÊNCIAS

World Health Organization (1999) WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction, 5th edition.

Fahy GM, Wowk B. Chapter 2 Principles of Cryopreservation by Vitrification. 2015

