

# Criopreservação de sêmen humano – comparação entre métodos de congelamento e tipos de envase

Cryopreservation of human semen – comparison between methods of freezing and types of storage

Marcelo Borges Cavalcante<sup>1</sup>, Ana Beatriz Graça Duarte<sup>2</sup>,  
Danielle Oliveira de Araújo<sup>2</sup>, Eugênio Pacelli de Barreto Teles<sup>3</sup>

## RESUMO

**Objetivos:** comparar duas diferentes técnicas de congelamento e dois tipos de envase do sêmen humano durante processo de criopreservação. **Métodos:** estudo experimental, no qual foi analisada a criopreservação de 18 amostras de sêmen de 18 voluntários. Após a adição de meio crioprotetor, “Test-yolk buffer”, as amostras de sêmen foram envasadas em palhetas com capacidade de 0,25 mL ou em criotubos de 2 mL e submetidas à criopreservação por dois métodos, um lento e outro rápido, totalizando quatro tratamentos distintos: RP (congelamento pelo método rápido e envasado em palheta), RT (rápido-criotubo), LP (lento-palheta) e LT (lento-criotubo). As amostras, após 24 horas, foram descongeladas em temperatura ambiente e mantidas a 37°C. Os dados coletados foram analisados através do teste *t* de Student, com  $p < 0,05$ , utilizando o programa de computador SPSS for Windows<sup>®</sup> versão 11.0.0. **Resultados:** houve redução da motilidade espermática após o processo de criopreservação. A taxa de motilidade inicial foi 58,1% e as motilidades após os diferentes métodos de criopreservação foram: 19,2% (RP), 27% (RT), 21,1% (LP) e 30,3% (LT). Houve redução significativa na morfologia normal. A taxa de morfologia normal inicial foi 14,2% e as morfologias após os diferentes métodos de criopreservação foram: 12,8% (RP), 12,6% (RT), 12,6% (LP) e 12,4% (LT). **Conclusões:** o método de criopreservação lento com envase em criotubo esteve associado à melhor motilidade espermática após o descongelamento. Não houve diferença entre os métodos quando avaliada a morfologia espermática.

**PALAVRAS-CHAVE:** Criopreservação/métodos; Semen; Bancos de esperma; Espermatozoides; Reprodução; Motilidade espermática

## ABSTRACT

**Purpose:** to compare two different methods of freezing and two types of human semen storage during cryopreservation process. **Methods:** experimental research in which the cryopreservation of 18 semen samples from 18 volunteers was studied. Following the addition of the cryoprotectant medium, Test-yolk buffer, the semen samples were packaged into 0.25 mL straws or into 2 mL cryotubes and submitted to cryopreservation by slow or rapid methods, in four different treatments: RS (cryopreservation by rapid method and packaged in straws), RT (rapid-cryotubes), SS (slow-straws), and ST (slow-cryotubes). Samples were thawed after 24 hours and then maintained at 37°C. Data collected were analyzed by the Student *t*-test, with  $p < 0.05$ , using the SPSS computer program for Windows<sup>®</sup>, version 11.0.0. **Results:** the motility of spermatozoa decreased after the cryopreservation process. The initial motility rate was 58.1% and motilities after the different methods of cryopreservation were 19.2% (RS), 27% (RT), 21.1% (SS) and 30.3% (ST). There was a significant decrease of the normal morphology. The initial normal morphology was 14.2% and morphologies after the different methods of cryopreservation were 12.8% (RS), 12.6% (RT), 12.6% (SS) and 12.4% (ST). **Conclusions:** the slow method of cryopreservation with storage in cryotubes showed the best recovery of motile cells after freezing and thawing. There was no difference among the methods when appraised the morphology.

**KEYWORDS:** Cryopreservation/methods; Semen; Sperm banks; Spermatozoa; Reproduction; Sperm motility

Departamento de Saúde Materno-Infantil da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza (CE), e Centro de Reprodução Assistida do Ceará (Conceptus) – Fortaleza (CE), Brasil.

1 Professor Substituto do Departamento de Saúde Materno-Infantil da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará – UFC – Fortaleza (CE), Brasil.

2 Bióloga do Centro de Reprodução Assistida do Ceará – Conceptus – Fortaleza (CE), Brasil.

3 Professor do Departamento de Saúde Materno-Infantil da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará – UFC – Fortaleza (CE), Brasil.

Correspondência: Marcelo Borges Cavalcante

Rua Beni Carvalho, 1115 / 702 – Papicu – 60135-400 – Fortaleza – CE – Fone/Fax: (85) 32610011 – e-mail: cavalcantemb@cpvidas.com.br

Recebido em: 12/7/2006

Aceito com modificações em: 6/12/2006

## Introdução

Atualmente, 15 em cada 100 casais, em idade fértil que desejam um filho, apresentam dificuldade em alcançar uma gravidez. Em metade desses casais, a causa da infertilidade decorre de um fator masculino isolado ou associado a outros fatores femininos<sup>1</sup>. Com o avanço no tratamento da infertilidade conjugal e com o desenvolvimento da técnica de injeção intracitoplasmática de espermatozoides<sup>2</sup>, disponibilizou-se uma nova perspectiva terapêutica para os casais com fator masculino grave, por meio da utilização de espermatozoides oriundos de programas de doação de sêmen.

Desde a criação dos primeiros bancos de sêmen<sup>3</sup>, estudos comprovam a eficácia e a segurança da utilização de sêmen criopreservado por técnicas de reprodução assistida, obtendo taxas de gravidez, resultados gestacionais e perinatais semelhantes aos quando é utilizado sêmen não criopreservado<sup>3</sup>.

Atualmente, os bancos de sêmen se destacam por garantir uma fonte de espermatozoides saudáveis para uso em técnicas de reprodução assistida, com várias indicações: inseminação com sêmen do parceiro nos casos de ausência do mesmo; baixa frequência sexual; disfunção erétil; pacientes com alguma doença que induza a infertilidade ou iniba a espermatogênese; indivíduos em idade reprodutiva e com qualquer tipo de câncer, que serão submetidos à radioterapia e/ou quimioterapia ou a cirurgias que possam comprometer o potencial fértil; inseminação com sêmen de doadores anônimos e criopreservação de sêmen para indivíduos que desejam ser submetidos à vasectomia, objetivando preservar a fertilidade futura.

O espermograma, exame que avalia a qualidade do sêmen, estuda diferentes parâmetros que refletem a capacidade funcional dos espermatozoides. Dentre as variáveis analisadas, destacam-se a concentração, a motilidade e a morfologia dos espermatozoides. Concentrações elevadas de espermatozoides estão relacionadas com maiores taxas de gravidez em ciclos espontâneos e de inseminação artificial<sup>4</sup>. A morfologia espermática é um indicador do potencial de fertilização oocitária. Demonstrou-se maior taxa de fertilização durante ciclos de fertilização *in vitro* (FIV) naquelas pacientes com mais que 14% de formas normais<sup>5</sup>. Maiores taxas de gravidez, em ciclos espontâneos, de inseminação artificial e FIV, bem como maiores taxas de fertilização em ciclos de FIV são encontradas quando existe maior percentual de espermatozoides móveis e progressivos<sup>4,6</sup>.

Com o desenvolvimento das técnicas de reprodução assistida, a criobiologia passou a desper-

tar grande interesse, pois exerce papel essencial na manutenção da fertilidade<sup>7</sup>. A criopreservação tem como principal objetivo manter a integridade estrutural e a viabilidade celular após submeter essas células a baixas temperaturas por um determinado período. Esse processo produz danos celulares conhecidos como crioinjúrias, que afetam a qualidade estrutural e funcional dos espermatozoides<sup>8</sup>.

A velocidade de resfriamento das amostras de sêmen humano é um fator determinante na preservação da qualidade espermática. Em animais, além da velocidade de resfriamento das amostras de sêmen, as formas de envase dessas amostras exercem influência nos resultados de criopreservação<sup>9</sup>. Em humanos, esse é um fator ainda pouco estudado, merecendo, portanto, mais atenção.

No intuito de reduzir os danos causados na estrutura e na funcionalidade dos espermatozoides durante a criopreservação, tornam-se necessários estudos sobre o processo ideal de congelação e estocagem das amostras de sêmen. O objetivo deste estudo foi, portanto, determinar qual a melhor forma de resfriamento, bem como o melhor método de armazenamento das amostras.

## Métodos

O estudo foi desenvolvido no ano de 2004, no Centro de Reprodução Assistida do Ceará. Trata-se de um estudo experimental, de validação de técnica laboratorial. Foram avaliadas 18 amostras de sêmen de 18 voluntários. Foram incluídos homens com interesse em criopreservar sêmen, com idade entre 18 e 50 anos e com um período de abstinência sexual entre três e cinco dias. De cada voluntário, foi obtida uma amostra de sêmen. Foram excluídos do estudo os indivíduos com presença de doenças agudas ou crônicas, febre nos últimos 30 dias, uso de medicações, tabagistas e usuários de drogas. Os voluntários preencheram e assinaram um termo de consentimento informado, e foram esclarecidos que poderiam, em qualquer momento, solicitar sua exclusão do estudo. As amostras de sêmen foram colhidas em frasco coletor adequado e, em seguida, encaminhadas para análises, realizadas pelo mesmo examinador.

Os seguintes parâmetros foram avaliados no sêmen *in natura*: concentração espermática (quantidade de espermatozoides por mililitro de sêmen), motilidade espermática, segundo os critérios da Organização Mundial de Saúde (OMS)<sup>10</sup>, e morfologia espermática, segundo os critérios de Kruger<sup>5</sup>. A motilidade foi determinada a cada hora, até a terceira hora, sendo determinada uma curva de motilidade espermática, definida como curva de sobrevivência.

A motilidade foi avaliada em microscopia, seguindo as recomendações da OMS, com um aumento de 400 vezes, sendo os espermatozoides classificados em: grau A (espermatozoides com progressão linear rápida), grau B (espermatozoides com progressão lenta linear ou não), Grau C (espermatozoides móveis sem progressão) e grau D (espermatozoides imóveis). São considerados com motilidade espermática normal os espermogramas com mais de 50% dos espermatozoides com motilidade graus A e B, somados<sup>10</sup>. Os valores descritos são referentes à soma dos espermatozoides graus A e B.

Os critérios de Kruger<sup>5</sup> para avaliação da morfologia espermática normal foram: a cabeça deve ser lisa e oval; o eixo longo da cabeça deve ter entre 5 e 6  $\mu$ , enquanto o eixo curto entre 2,5 e 3,5  $\mu$ ; o acrossoma deve cobrir 40 a 60% da cabeça do espermatozoide; não pode existir anomalia de peça intermediária ou cauda e a peça intermediária deve ter menos que 1  $\mu$  de largura e até uma vez e meia o comprimento da cabeça do espermatozoide. Considera-se morfologia espermática normal a presença de pelo menos 14% de espermatozoides com as características acima descritas. Foram avaliados de cada amostra pelo menos 200 espermatozoides escolhidos ao acaso com um aumento de 1.000 vezes.

O meio crioprotetor utilizado foi o Test-yolk buffer, com a seguinte constituição: 48% de solução de test (325 mOsm de Tes com 325 mOsm de Tris), 30% de citrato de sódio, 20% de gema de ovo, 2% de frutose, glicerol com concentração final de 6%, 100.000 unidades de penicilina por mililitro e 100.000  $\mu$ g de sulfato de estreptomicina por mililitro<sup>11</sup> (Irvine Scientific, Califórnia, EUA). O meio Test-yolk buffer permaneceu estocado, segundo orientação do fabricante, a -10°C e retirado do freezer antes de sua utilização, sendo mantido a 37°C durante o processo de criopreservação. Terminada a avaliação dos parâmetros do sêmen in natura e separada a amostra para determinação da curva de sobrevivência, o meio Test-yolk buffer foi adicionado delicadamente, com auxílio de uma seringa e agulha, até uma proporção de 1:1 com a amostra. Finalizada a adição do meio crioprotetor, o sêmen foi envasado em palhetas de 0,25 mL ou em criotubos de 2 mL, e encaminhado para criopreservação pelos métodos lento ou rápido, totalizando quatro tratamentos distintos: RP (rápido-palheta), RT (rápido-criotubo), LP (lento-palheta) e LT (lento-criotubo).

Para congelamento lento, as palhetas de 0,25 mL e os criotubos de 2 mL foram colocados em compartimento indicado do congelador automático Freezer Control Cryologic, modelo CL8000 (Austrália), e ajustado para o programa de número seis, específico para congelamento de sêmen, conforme indicação do fabricante. O programa de número

seis apresenta o seguinte padrão de resfriamento: temperatura inicial da amostra em torno de 25°C; resfriamento inicial de -2°C por minuto até 5°C; a amostra permanece a 5°C durante dez minutos; resfriamento de -1,5° por minuto de 5° até -5°C; a amostra permanece a -5°C durante cinco minutos; resfriamento de -6°C por minuto de -5°C até -30°C; resfriamento de -4°C por minuto de -30° até -40°C. Após o término do programa, as palhetas e os criotubos são mergulhados em nitrogênio líquido, a uma temperatura de -196°C.

Para congelamento rápido foi utilizada uma caixa de isopor quadrada, com um revestimento interno de aço inox, medindo 32 cm de largura e de profundidade e 37 cm de altura. As palhetas de 0,25 mL e os criotubos de 2 mL foram colocados, horizontalmente, 10 cm acima do nível do nitrogênio líquido (vapor de nitrogênio líquido). Após tampada a caixa, as amostras permaneceram durante dez minutos e, em seguida, foram colocadas no nitrogênio líquido a -196°C. A temperatura inicial da amostra estava em torno de 25°C (temperatura ambiente) e a temperatura final de -80°C, com taxa de resfriamento aproximadamente -10°C por minuto.

As amostras foram mantidas, por um período de 24 a 48 horas, em botijão de nitrogênio líquido a uma temperatura média de -196°C. As amostras foram descongeladas em temperatura ambiente, variando de 25° a 30°C, sobre uma bancada do laboratório, por um período de dez minutos, e depois mantidas em banho-maria a uma temperatura de 37°C por três horas, enquanto foram realizadas as análises, pelo mesmo examinador inicial, da motilidade, da curva de sobrevivência e da morfologia, obedecendo aos mesmos critérios do sêmen in natura.

A verificação das motilidades, em cada um dos quatro tratamentos, foi realizada com 30 minutos, uma hora, duas horas e três horas. A verificação da morfologia, em cada um dos quatro tratamentos, foi realizada 30 minutos depois da descongelação.

Os dados coletados foram digitados em programa de computador Microsoft Excel® versão 2000 e realizadas as análises, ao final dos experimentos, utilizando o programa de computador SPSS for Windows® versão 11.0.0. Os dados foram expressos como médias e desvios padrão. Foi calculado o coeficiente de correlação de Spearman para mensurar a existência de correlação de monotonicidade entre as variáveis. Foi calculado o coeficiente de correlação linear de Pearson, que mensura a existência de relação linear entre as variáveis, e realizado o teste *t* de Student de médias com dados pareados, que mensura a diferença entre medidas tomadas de uma mesma unidade amostral.

O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC), bem como pelo corpo clínico do Centro de Reprodução Assistida do Ceará. Foram resguardados os princípios enunciados na Declaração de Helsinque, de 1964, e suas versões posteriores. Foram seguidas as orientações da resolução de número 196 de 10 de outubro de 1996 do Conselho Nacional de Saúde.

## Resultados

Os voluntários apresentavam média de idade de  $33,9 \pm 5,2$  anos, variando de 26 a 44 anos. As análises das variáveis iniciais, volume, concentração, morfologia e motilidade espermática, por

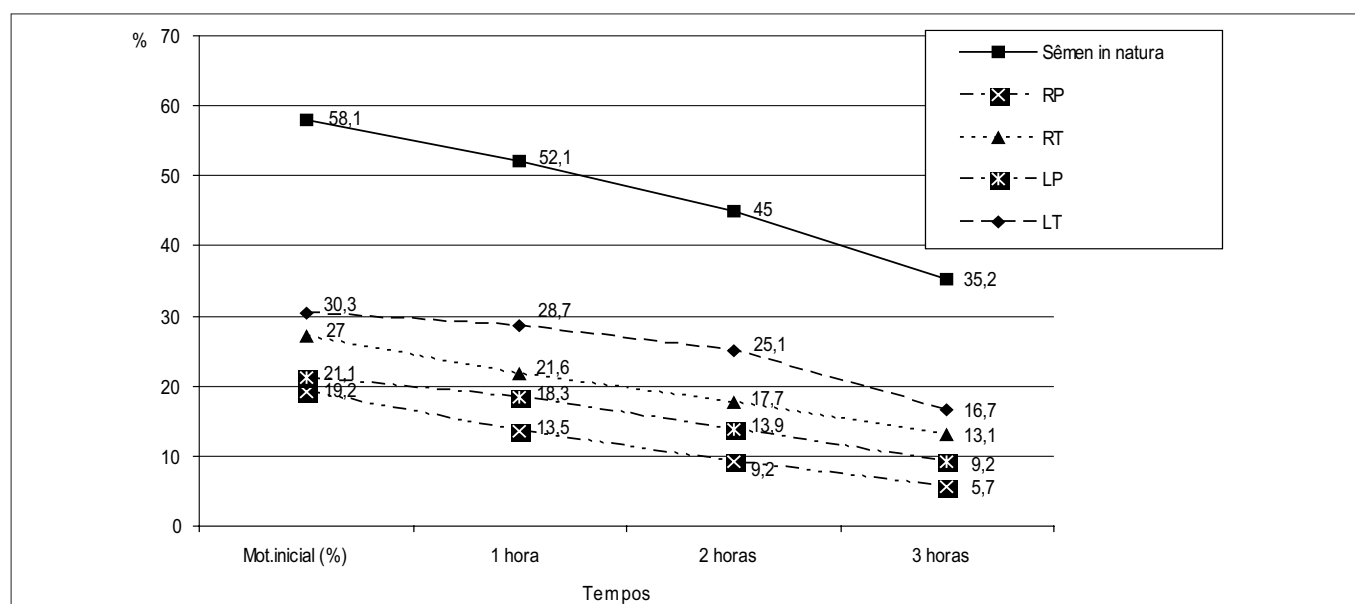
meio do coeficiente de correlação de Spearman, revelaram uma ausência de correlação, sugerindo uma independência entre tais variáveis.

As análises iniciais, prévias à criopreservação, das amostras de sêmen revelaram: um volume inicial médio de  $3,5 \pm 1$  mL (variando de 2 a 5,5 mL); concentração média de espermatozoides por mL de  $81,4 \pm 46,6$  milhões (20 a 187 milhões); morfologia normal (percentagem de espermatozoides normais segundo o critério de Krüger) média de  $14,2 \pm 4,6\%$  (8 a 24%); motilidade (percentagem de espermatozoides com motilidade progressiva graus A + B, segundo a OMS) inicial média de  $58,1 \pm 11,5\%$  (32 a 78%), com uma hora de  $52,1 \pm 11,1\%$ , com duas horas de  $45 \pm 11,2\%$  e com três horas de  $35,2 \pm 15,7\%$  (Tabela 1, Figura 1). Observou-se motilidade de 88,9% da motilidade inicial na primeira hora. Na

**Tabela 1** - Análise espermática das amostras de sêmen *in natura* e após a criopreservação nos diferentes métodos de congelamento e envase.

	Sêmen <i>in natura</i>	Após criopreservação			
		Método rápido		Método lento	
		Palheta (RP)	Criotubo (RT)	Palheta (LP)	Criotubo (LT)
Volume (mL)	$3,5 \pm 1,0$	-	-	-	-
Conc. ( $\times 10^6/\text{mL}$ )	$81,4 \pm 46,6$	-	-	-	-
Mot. Inicial (%)	$58,1 \pm 11,5$	$19,2 \pm 13,5^*$	$27,0 \pm 15,4^*$	$21,1 \pm 16,2^*$	$30,3 \pm 14,2^*$
1 hora	$52,1 \pm 11,0$	$13,5 \pm 12,0^*$	$21,6 \pm 10,1^*$	$18,3 \pm 15,7^*$	$28,7 \pm 11,2^*$
2 horas	$45,0 \pm 11,2$	$9,2 \pm 8,3^*$	$17,7 \pm 11,2^*$	$13,9 \pm 14,3^*$	$25,1 \pm 12,7^*$
3 horas	$35,2 \pm 15,7$	$5,7 \pm 5,5^*$	$13,1 \pm 8,0^*$	$9,2 \pm 9,0^*$	$16,7 \pm 9,0^*$
Morfologia (%)	$14,2 \pm 4,6$	$12,8 \pm 5,4^*$	$12,6 \pm 5,7$	$12,6 \pm 5,8^*$	$12,4 \pm 4,7^*$

Conc.: concentração de espermatozoides em milhões por mililitro; Mot.: percentual de espermatozoides móveis (grau A + B); Morfologia: percentual de espermatozoides com morfologia normal segundo os critérios de Krüger; \* $p < 0,05$ , comparando com valores do sêmen *in natura*.



**Figura 1** - Curva de sobrevivência espermática (motilidade durante três horas); Mot. Inicial: motilidade inicial do sêmen *in natura* e com 30 minutos após criopreservação nos quatro tratamentos distintos; RP ou RT = congelamento pelo método rápido e envasado em palheta ou em criotubo; LP ou LT = congelamento pelo método lento e envasado em palheta ou em criotubo, respectivamente.



segunda hora a motilidade foi de 86,2% da motilidade verificada na primeira hora e na terceira hora observamos motilidade de 79,0% da motilidade apresentada na segunda hora.

Após a descongelação das amostras submetidas ao processo rápido e envasadas em palheta (RP), foram encontrados os seguintes resultados: morfologia normal média de 12,8±5,4%, motilidade inicial média de 19,2±13,5%, com uma hora de 13,5±12,0%, com duas horas de 9,2±8,3% e com três horas de 5,7±5,5% (Tabela 1). No tratamento RP, o percentual de recuperação de espermatozoides móveis 30 minutos após a descongelação foi de 32,3% da motilidade inicial. Após uma hora foi de 73,5% da motilidade após 30 minutos, após duas horas foi de 63,9% da motilidade após uma hora e, após três horas, foi de 58,1% da motilidade após duas horas.

Após a descongelação das amostras submetidas ao processo rápido e envasadas em criotubo (RT), foram encontrados os seguintes resultados: morfologia normal média de 12,6±5,7%, motilidade inicial média de 27,0±15,4%, com uma hora de 21,6±10,1%, com duas horas de 17,7±11,2% e com três horas de 13,1±8,0% (Tabela 1). No tratamento RT, o percentual de recuperação de espermatozoides móveis 30 minutos após a descongelação foi de 46,7% da motilidade inicial, após uma hora foi de 74,1% da motilidade após 30 minutos, após duas horas foi de 81,5% da motilidade após uma hora e após três horas foi de 68,5% da motilidade após duas horas.

Após a descongelação das amostras submetidas ao processo lento e envasadas em palheta (LP), foram encontrados os seguintes resultados: morfologia normal média de 12,6±5,8%, motilidade inicial média de 21,1±16,2%, com uma hora de 18,3±15,7%, com duas horas de 13,9±14,3% e com três horas de 9,2±9,0% (Tabela 1). No tratamento LP, o percentual de recuperação de espermatozoides móveis 30 minutos após a descongelação foi de 38,2% da motilidade inicial, após uma hora foi de 87,6% da motilidade após 30 minutos, após duas horas foi de 81,3% da motilidade após uma hora e após três horas foi de 62,6% da motilidade após duas horas.

Após a descongelação das amostras submetidas ao processo lento e envasadas em criotubo (LT), foram encontrados os seguintes resultados: morfologia normal média de 12,4±4,7%, motilidade inicial média de 30,3±14,2%, com uma hora de 28,7±11,2%, com duas horas de 25,1±12,7% e com três horas de 16,7±9,0% (Tabela 1). No tratamento LT, o percentual de recuperação de espermatozoides móveis 30 minutos após a descongelação foi de 50,4% da motilidade inicial, após uma hora foi

de 87,8% da motilidade após 30 minutos, após duas horas foi de 89,4% da motilidade após uma hora e após três horas foi de 63,8% da motilidade após duas horas.

A taxa de recuperação de espermatozoides móveis após o processo de criopreservação é definida como o percentual de espermatozoides que se mantiveram móveis após a descongelação. A avaliação, realizada 30 minutos após a descongelação, revelou as seguintes taxas: 32,3% (RP), 46,7% (RT), 38,2% (LP) e 50,4% (LT).

Quanto à motilidade ao longo do tempo (curva de sobrevivência), na amostra de sêmen *in natura* observou-se uma redução gradual dos espermatozoides móveis, sendo de 11, 14 e 21% na primeira, segunda e terceira horas, respectivamente. Após a criopreservação, o método que mais se aproximou ao sêmen *in natura* foi o LT, principalmente nas duas primeiras horas, com taxas de queda da motilidade espermática de 12, 10 e 36% na primeira, segunda e terceira horas após a descongelação, respectivamente. Os métodos RP e RT apresentaram uma queda mais acentuada, com taxas de queda da motilidade de 26%, quando avaliada a primeira hora.

## Discussão

A avaliação da morfologia dos espermatozoides demonstrou uma redução significativa, depois da criopreservação, em três métodos, quando comparada com a morfologia inicial: método RP, método LP e método LT. Quando analisados os diferentes métodos, não se observou diferença quanto à morfologia. Demonstrou-se também que a morfologia, nos diversos métodos, apresentou forte correlação linear positiva. A redução da taxa de espermatozoides com morfologia normal inicial comparada com as morfologias após a criopreservação foi calculada em torno de 10%.

A literatura descreve resultados semelhantes, variando a diminuição da morfologia normal de 3% (método com programa lento) a 8% (vapor de nitrogênio), não havendo, porém, diferença significativa entre os métodos<sup>12</sup>. Dados similares também foram obtidos por um estudo brasileiro<sup>13</sup>, sugerindo que as variações na velocidade de redução de temperatura e na forma de envase das amostras não interferem com a morfologia normal, e sim o processo criopreservação, independente do método utilizado.

A análise da motilidade espermática do sêmen *in natura* com uma, duas e três horas (curva de sobrevivência espermática) revelou uma redução progressiva. Porém, essa redução

não foi homogênea, sendo menor nas primeiras duas horas e maior da segunda para a terceira hora. Após a criopreservação, foram observados níveis de espermatozóides móveis inferiores nos quatro tratamentos. Entre os métodos, a maior motilidade observada foi no método lento quando utilizado o criotubo como forma de envase, tanto nos 30 minutos depois de descongeladas as amostras, bem como na primeira, segunda e terceira horas.

Analisando os métodos de congelamento, rápido e lento, observou-se que, apesar de ter piores taxas de espermatozóides móveis depois da descongelamento, o método rápido obteve melhores resultados quando o sêmen foi envasado em criotubos, em todos os momentos. Demonstrou-se que a forma de envase influenciou os resultados quando foi utilizado o método rápido. Dessa forma, aqueles centros de reprodução assistida que não possuem recursos técnicos para a criopreservação automatizada teriam melhores resultados se utilizassem o criotubo como forma de envase.

Com o método lento, obtivemos taxas mais elevadas de espermatozóides móveis em todos os momentos após a criopreservação, principalmente quando o sêmen foi envasado em criotubo. Demonstrou-se que a forma de envase interfere na motilidade dos espermatozóides quando se utiliza o método lento, tendo a combinação método lento com envase em criotubo apresentado o melhor resultado.

Existem poucos estudos investigando a influência dos tipos de envase na qualidade espermática no processo de criopreservação de sêmen humano. Há quem afirme que, utilizando um bom meio crioprotetor e uma curva de congelamento ideal, a forma de envase em palhetas de 0,1 mL, 0,5 mL ou 1 mL não interfere nos resultados<sup>14</sup>. Esse dado foi parcialmente confirmado pelo presente estudo, pois, utilizando-se a palheta com capacidade de 0,25 mL como forma de envase e variando os métodos de congelamento, rápido e lento, não houve diferença significativa, em nenhum momento analisado. Esses dados sugerem que, quando o sêmen é envasado em palheta de 0,25 mL, o tipo de congelamento (lento ou rápido) não interfere no resultado do processo de criopreservação. A literatura é contraditória e relata estudos em que os pesquisadores, ao utilizarem a palheta como forma de envase, observaram maior motilidade espermática quando se empregava o método lento<sup>13,15,16</sup>. Ainda há relatos de trabalhos que não observaram diferença estatística ao comparar os dois métodos utilizando palheta<sup>17</sup>, confirmando os dados apresentados. As menores taxas de recuperação de espermatozóides móveis, após a criopreservação, foram observadas com envase em palheta.

A utilização de criotubos de 2 mL influenciou os resultados. Essa forma de envase não foi testada no estudo citado anteriormente<sup>14</sup>. A motilidade dos espermatozóides apresentou níveis superiores, após a criopreservação, quando o sêmen foi envasado em criotubos. Utilizando-se o criotubo como forma de envase e variando os métodos de congelamento, rápido e lento, encontrou-se uma motilidade estatisticamente superior no método lento, principalmente após a primeira hora. Autores que também compararam os dois métodos de congelamento e utilizaram criotubos como forma de envase obtiveram resultados semelhantes, ou seja, melhores motilidades com a queda gradual da temperatura<sup>12,18</sup>.

Ao avaliar indivíduos portadores de tumores testiculares e linfoma de Hodgkin, observou-se que os espermatozóides sofrem de forma semelhante os fenômenos da crioinjúria e o método lento revelou melhores resultados<sup>16</sup>.

A forma de descongelamento da amostra também parece influenciar no processo de criopreservação<sup>19</sup>. O presente estudo descongelou as amostras de sêmen em temperatura ambiente, variando de 25° a 30°C, sobre uma bancada do laboratório, por um período de dez minutos; depois, as amostras foram mantidas em banho-maria a uma temperatura de 37°C por três horas, enquanto foram realizadas as análises restantes. Novamente, a literatura é dividida nesse questionamento. Estudos revelaram melhores resultados quando utilizada a temperatura ambiente<sup>12,13</sup>. Outros autores defendem que os melhores resultados ocorrem quando a descongelamento é feita a uma temperatura de 37°C<sup>20</sup>.

Um estudo croata, utilizando o mesmo meio crioprotetor (Test-yolk buffer), com envase em criotubo e comparando métodos de resfriamento parecidos, encontrou taxas de recuperação de espermatozóides móveis semelhantes, 49% (vapor de nitrogênio) e 52% (programa lento)<sup>12</sup>.

Atualmente, além da motilidade e morfologia espermática, está sendo utilizado o grau de fragmentação do DNA espermático como parâmetro para avaliação da qualidade dos espermatozóides. Estudo recente demonstrou que o processo de criopreservação no vapor do nitrogênio (método rápido) provocou mais lesão no DNA espermático que o método computadorizado (método lento)<sup>21</sup>.

A redução do percentual de espermatozóides móveis, observada nas curvas de motilidade ao longo de três horas, do sêmen *in natura* e nos quatro diferentes tratamentos não pode ser considerada como uma regressão linear em função do tempo, pois não é homogênea; a redução é mais acentuada com o passar das horas. Este fato também foi descrito na literatura<sup>22</sup>.

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

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

### Agradecimentos

Os autores agradecem a Dr. Marcelo Rocha, Dr. Oswaldo Dias e Dra. Marjorie Mota, pela colaboração na seleção dos pacientes, e à Sra. Maura Fernandes, pela assistência administrativa.

### Referências

- Jadim CRF, Da Ros CT, Lorenzini F. Fatores de risco e prevenção da infertilidade no homem. In: Glina S, Damião R, editores. Infertilidade masculina. São Paulo: BG Cultural; 1999. p. 11-6.
- Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*. 1992;340(8810):17-8.
- Lansac J, Thepot F, Mayaux MJ, Czyglick F, Wack T, Selva J, et al. Pregnancy outcome after artificial insemination or IVF with frozen semen donor: a collaborative study of the French CECOS Federation on 21,597 pregnancies. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1997;74(2):223-8.
- Guzick DS, Carson SA, Coutifaris C, Overstreet JW, Factor-Litvak P, Steinkampf MP, et al. Efficacy of superovulation and intrauterine insemination in the treatment of infertility. National Cooperative Reproductive Medicine Network. *N Engl J Med*. 1999;340(3):177-83.
- Kruger TF, Menkveld R, Stander FS, Lombard CJ, Van der Merwe JP, van Zyl JA, et al. Sperm morphologic features as a prognostic factor in *in vitro* fertilization. *Fertil Steril*. 1986;46(6):1118-23.
- Donnelly ET, Lewis SE, McNally JA, Thompson W. *In vitro* fertilization and pregnancy rates: the influence of sperm motility and morphology on IVF outcome. *Fertil Steril*. 1998;70(2):305-14.
- Hovatta O. Cryopreservation of ovarian and testicular tissue. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2003;17(2):331-42.
- Oettle EE, Clarke UA, McLoughlin J, Levin MR, Wiswedel K, Kruger TF. Ultrastructural parameters of fertile cryopreserved human sperm. *Arch Androl*. 1992;29(2):151-6.
- Rev Bras Ginecol Obstet. 2006;28(12): 708-14.
- Eriksson BM, Rodriguez-Martinez H. Effect of freezing and thawing rates on the post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in FlatPacks and Maxi-straws. *Anim Reprod Sci*. 2000;63(3-4):205-20.
- World Health Organization. WHO Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Cambridge: Cambridge University Press; 1999.
- Prins GS, Weidel L. A comparative study of buffer system as cryoprotectants for human spermatozoa. *Fertil Steril*. 1986;46(1):147-9.
- Stanic P, Tandara M, Sonicki Z, Simunic V, Radakovic B, Suchanek E. Comparison of protective media and freezing techniques for cryopreservation of human semen. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2000;91(1):65-70.
- Florêncio RS, Santos FC, Cunha GB, Costa IA, Rocha JP. Efeitos do congelamento de sêmen humano e temperatura de descongelamento sobre motilidade e morfologia. *Reprod Climat*. 1995;10(1):24-6.
- Weidel L, Prins GS. Cryosurvival of human spermatozoa frozen in eight different buffer systems. *J Androl*. 1987;8(1):41-7.
- Taylor PJ, Wilson J, Laycock R, Weger J. A comparison of freezing and thawing methods for the cryopreservation of human semen. *Fertil Steril*. 1982;37(1):100-3.
- Ragni G, Caccamo AM, Dalla Serra A, Guercilena S. Computerized slow-staged freezing of semen from men with testicular tumors or Hodgkin's disease preserves sperm better than standard vapor freezing. *Fertil Steril*. 1990;53(6):1072-5.
- Thachil JV, Jewett MA. Preservation techniques for human semen. *Fertil Steril*. 1981;35(5):546-8.
- Serafini P, Marrs RP. Computerized staged-freezing technique improves sperm survival and preserves penetration of zona-free hamster ova. *Fertil Steril*. 1986;45(6):854-8.
- Henry MA, Noiles EE, Gao D, Mazur P, Crister JK. Cryopreservation of human spermatozoa. IV. The effects of cooling rate and warming rate on the maintenance of motility, plasma membrane integrity, and mitochondrial function. *Fertil Steril*. 1993;60(5):911-8.
- Verheyen G, Pletincx I, Van Steirteghem A. Effect of freezing method, thawing temperature and post-thaw dilution/washing on motility (CASA) and morphology characteristics of high-quality human sperm. *Hum Reprod*. 1993;8(10):1678-84.
- Petyim S, Choavaratana R. Cryodamage on sperm chromatin according to different freezing methods, assessed by AO test. *J Med Assoc Thai*. 2006;89(3):306-13.
- Nallella KP, Sharma RK, Allamaneni SS, Aziz N, Agarwal A. Cryopreservation of human spermatozoa: comparison of two cryopreservation methods and three cryoprotectants. *Fertil Steril*. 2004;82(4):913-8.