



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB
FACULDADE DE MEDICINA – FM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS - PPGCM

BRUNO SILVA SÁ

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE MOLÉCULAS ANTIOXIDANTES NA
CRIOPRESERVAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS.

BRASÍLIA, 2025

BRUNO SILVA SÁ

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE MOLÉCULAS ANTIOXIDANTES NA
CRIOPRESERVAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS.

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Orientador: Dr. José Roberto de Souza de Almeida Leite.

Co-orientadora: Dra. Andreanne Gomes Vasconcelos.

BRASÍLIA, 2025

S111p Sá, Bruno
Potencial biotecnológico de moléculas antioxidantes na
criopreservação de espermatozoides humanos. / Bruno Sá;
orientador José Roberto Leite; co-orientador Andreanne
Vasconcelos. -- Brasília, 2025.
64 p.

Dissertação(Mestrado em Ciências Médicas) -- Universidade
de Brasília, 2025.

1. Criopreservação. 2. Motilidade espermática. 3.
Fragmentação do DNA. 4. Espécies reativas de oxigênio. 5.
Antioxidantes. I. Leite, José Roberto, orient. II.
Vasconcelos, Andreanne, co-orient. III. Título.

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB
FACULDADE DE MEDICINA – FM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE MOLÉCULAS ANTIOXIDANTES NA
CRIOPRESERVAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS.**

BRUNO SILVA SÁ

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

BANCA EXAMINADORA

Dr. José Roberto de Souza de Almeida Leite

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas FM - UnB
(Presidente)

Dr. Amilcar Sabino Damazo

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas FM - UnB
(Membro interno)

Dra. Paula Marcela Duque Jaramillo

Airmid Healthgroup – Dublin/Irlanda
(Membro externo)

Dra. Selma Aparecida Souza Kuckelhaus

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas FM - UnB
(Membro suplente)

AGRADECIMENTOS

Aos professores Dr. José Roberto de Souza de Almeida Leite e Dra. Andreeane Gomes Vasconcelos, por me guiarem na jornada acadêmica, oferecendo condições e oportunidades para alcançar a excelência na pesquisa científica e no desenvolvimento pessoal e profissional.

À minha família, especialmente à minha mãe Rosimeire Aparecida, ao meu pai Nilson Brito, à minha irmã Letícia Sá, aos meus tios Rosilene Cristina e Nilton Cesar (*in memoriam*), aos meus primos Jessyca Correa e César Filho e aos meus avós Maria José e Ademar José pelo amor, discernimento, incentivo e encorajamento desmedido à minha pessoa.

Ao Núcleo de Pesquisa em Morfologia e Imunologia Aplicada (NuPMIA) da Universidade de Brasília e ao Laboratório de Síntese e Análise de Biomoléculas – LSAB do Instituto de Química, pelo acolhimento, orientações e suporte para execução do trabalho. Agradeço às pessoas que fizeram, diretamente e de maneira muito especial, contribuições incomensuráveis no meu trabalho diário, em especial o João Bueno Nunes, João Gabriel Teixeira Lara Resende, Fernanda Leonel Silva e Wanessa Felix Cabral. Meus agradecimentos transcendem a gratidão científico-acadêmica, sou grato pelas amizades e momentos compartilhados.

À Genesis – Centro de Assistência em Reprodução Humana, renomada clínica que possibilitou, diante da parceria no projeto, a estrutura e expertise necessária para a realização experimental do estudo. Agradeço especialmente à Dra. Hitomi Miura, ao Dr. Adelino Amaral, Dr. César Barbosa e Dr. Rubens Iglesias, sócios fundadores, e à Dra Natália Barbosa, médica assistente da clínica e colega de bancada, não apenas pelo suporte financeiro no projeto, mas também pela oportunidade profissional dentro da clínica para o meu aperfeiçoamento na área.

A todos os professores que compõem o Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas e professores de toda minha jornada acadêmica, que instigaram e fomentaram meu instinto de pesquisador e se tornaram exemplos profissionais. Por isso cheguei aqui, e com isso alcançarei novos caminhos.

EPÍGRAFE

“Um cientista no seu laboratório não é apenas um técnico: é, também, uma criança colocada à frente de fenômenos naturais que impressionam como se fossem um conto de fadas”

Marie Curie – Cientista (1867-1934)

RESUMO

A criopreservação é uma técnica da reprodução humana que permite preservar o material genético de indivíduos que desejam flexibilidade no planejamento reprodutivo, seja por razões sociais ou em casos médicos específicos de infertilidade. Entretanto, o processo de resfriamento da célula leva a alterações estruturais e funcionais nos espermatozoides, além dos níveis elevados de espécies reativas de oxigênio – ERO's. O presente trabalho teve por objetivo analisar a correlação entre o dano criogênico e o estresse oxidativo durante a criopreservação de espermatozoides, os impactos do dano criogênico nos parâmetros seminais e o potencial antioxidante de moléculas no equilíbrio redox, preservando os parâmetros seminais pós-descongelamento. Diante disso, foi realizada uma revisão da literatura científica para compreender a influência da via oxidativa em espermatozoides humanos durante a criopreservação. Além disso, conduziu-se um estudo experimental para avaliar o impacto de peptídeos antioxidantes (Antioxidin-I e PaT-2) na preservação da motilidade e fragmentação do DNA em espermatozoides humanos pós-descongelamento. A revisão da literatura demonstrou que o dano criogênico é inevitável no processo de criopreservação causado por ERO's, entretanto, o perfil seminal é um preditor importante na criotolerância das células. No estudo experimental, avaliou-se a atividade antioxidante dos peptídeos (Antioxidin-I e PaT-2) nos parâmetros de motilidade e fragmentação do DNA espermático. Comparando os resultados das análises da motilidade entre os grupos fresco e congelado, o impacto negativo do dano criogênico foi significativo na redução da qualidade seminal, corroborando com a literatura. Entretanto, o benefício da suplementação antioxidante no parâmetro da motilidade foi observado apenas nos grupos tratados com o Antioxidin-I, com uma resposta dose-dependente. Na avaliação da integridade do DNA, os peptídeos (Antioxidin-I e PaT-2) não demonstraram a capacidade de preservar o parâmetro seminal de forma significativa, mesmo com todos os grupos e suas respectivas concentrações apresentarem valores médios abaixo do controle congelado. Conclui-se diante dos resultados supracitados que a suplementação do Antioxidin-I demonstrou efeito promissor na preservação da motilidade com potencial aplicação clínica na rotina de centros de reprodução humana e bancos de sêmen, beneficiando a integridade deste parâmetro seminal pós-descongelamento.

Palavras-chave: criopreservação; motilidade espermática; fragmentação do DNA; espécies reativas de oxigênio; antioxidantes.

ABSTRACT

Cryopreservation is a technique of human reproduction that allows to preserve the genetic material of individuals who want flexibility in reproductive planning, either for social reasons or in specific medical cases of infertility. However, the cell cooling process leads to structural and functional changes in sperm, in addition to high levels of reactive oxygen species - ERO's. The present study aimed to analyze the correlation between cryogenic damage and oxidative stress during sperm cryopreservation, the impacts of cryogenic damage on seminal parameters and the antioxidant potential of molecules in the redox balance, preserving the post-thawing seminal parameters. Therefore, a review of the scientific literature was carried out to understand the influence of the oxidative pathway on human sperm during cryopreservation. In addition, an experimental study was conducted to evaluate the impact of antioxidant peptides (Antioxidin-I and PaT-2) on the preservation of motility and fragmentation of DNA in human sperm post-thawing. The literature review showed that cryogenic damage is inevitable in the cryopreservation process caused by ROS's, however, the seminal profile is an important predictor in the cryotolerance of cells. In the experimental study, the antioxidant activity of peptides (Antioxidin-I and PaT-2) was evaluated in the parameters of motility and fragmentation of sperm DNA. Comparing the results of motility analysis between the fresh and frozen groups, the negative impact of cryogenic damage was significant in reducing seminal quality, corroborating the literature. However, the benefit of antioxidant supplementation in the motility parameter was observed only in groups treated with Antioxidin-I, with a dose-dependent response. In the evaluation of DNA integrity, the peptides (Antioxidin-I and PaT-2) did not demonstrate the ability to preserve the seminal parameter significantly, even with all groups and their respective concentrations having average values below the frozen control. It is concluded from the results that the supplementation of Antioxidin-I demonstrated a promising effect in the preservation of motility with potential clinical application in the routine of human reproduction centers and semen banks, benefiting the integrity of this post-thawing seminal parameter.

Keywords: cryopreservation; sperm motility; DNA fragmentation; reactive oxygen species, antioxidants.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Fluxograma PRISMA do processo de seleção dos estudos para a revisão 20

CAPÍTULO II

Figura 1. Esquema ilustrativo do processamento seminal 40

Figura 2. Esquema ilustrativo da análise de citotoxicidade por luminescência 44

Figura 3. Escala do grau de fragmentação do DNA espermático 46

Figura 4. Gráfico de RP-HPLC da purificação do PaT-2, com pico principal apresentando tempo de retenção de 25,642 minutos. 48

Figura 5. Gráfico de RP-HPLC da purificação do Antioxidin-I, com pico principal apresentando tempo de retenção de 26,229 minutos. 48

Figura 6. Espectro de massa do PaT-2 $[M+H]^{+2} = 658,3716$ Da e sua série isotópica. A partir da massa teórica exata é possível calcular o erro de massa, com valor de 0,152 ppm. 49

Figura 7. Espectro de massa do Antioxidin-I com dupla carga $[M+2H]^{+2} = 772,3957$ Da e sua série isotópica. A partir da massa teórica exata é possível calcular o erro de massa, com valor de 0,129 ppm. 50

Figura 8. Espectro de fragmentação (MS/MS) obtido em modo IDA do íon $[M+H]^{+1}$. Os fragmentos obtidos a partir das séries estão destacados em roxo (série a), azul (série b) e vermelho (série y). 51

Figura 9. Espectro de fragmentação (MS/MS) obtido em modo IDA do íon $[M+2H]^{+2}$. Os fragmentos obtidos a partir das séries estão destacados em roxo (série a), azul (série b) e vermelho (série y). 52

Figura 10. Citotoxicidade dos peptídeos Antioxidin-I (A) e PaT-2 (B) em espermatozoides frescos. Grupos: DMEM (espermatozoides em meio DMEM); Tx-100 (espermatozoides com Triton – X100 a 0,5%); AnT 200 - 12,5 (espermatozoides em meio DMEM suplementado com Antioxidin-I nas respectivas concentrações) e PaT 200 – 12,5 (espermatozoides em meio DMEM suplementado com PaT-2 nas respectivas concentrações). # Diferença estatística significativa comparado com DMEM ($p < 0000,1$). 53

Figura 11. Avaliação de peptídeos antioxidantes na motilidade espermática pós descongelamento. Grupos: fresco (amostra processada sem tratamento); congelado (amostra processada e congelada sem tratamento); AnT 200 – 100 (amostra processada e congelada 54

com tratamento com as respectivas concentrações de Antioxidin-I) e PaT 200 – 100 (amostra processada e congelada com tratamento com as respectivas concentrações de PaT-2). Diferença estatística significativa: **** (p<0000,1) e *** (p<000,1) entre grupos; # (p<0000,1) comparado ao grupo fresco.

Figura 12. (A) Avaliação de peptídeos antioxidantes na integridade do DNA pós-descongelamento. Grupos: fresco (amostra processada sem tratamento); congelado (amostra processada e congelada sem tratamento); AnT 200 – 100 (amostra processada e congelada com tratamento com as respectivas concentrações de Antioxidin-I) e PaT 200 – 100 (amostra processada e congelada com tratamento com as respectivas concentrações de PaT-2). (B) Espermatozoides analisados por microscopia de luz, evidenciando células com DNA fragmentado (sem halo ao redor da cabeça) e células íntegras (com halo ao redor da cabeça). Diferença estatística significativa: # (p<0000,1) comparado ao grupo fresco.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

- Tabela 1. Classificação dos estudos conforme valor do *InOrdinatio*. 21
- Tabela 2. Comparação dos parâmetros de viabilidade e motilidade progressiva relacionada ao dano criogênico. 23
- Tabela 3. Comparação dos parâmetros de viabilidade e motilidade progressiva entre os estudos após a criopreservação com tratamento antioxidante. 26

CAPÍTULO II

- Tabela 1. Valores de referência dos parâmetros seminais segundo o manual de exame e processamento seminal da OMS. 38
- Tabela 2. Distribuição dos resultados seminais de homens em casais que engravidaram de maneira natural dentro do período de um ano de tentativas sem métodos contraceptivos (OMS). 38
- Tabela 3. Parâmetros seminais das coletas do voluntário. 47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Adenosina trifosfato
Ci	Citações
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DAD	Detector de arranjo de diodo
DFI	Índice de fragmentação do DNA
DIC	N - diisopropilcarbodiimida
DIPEA	N, N – Diisopropiletilamina
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMF	Dimetilformamida
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FIV	Fertilização in vitro
FM/UnB	Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília
Fmoc	9-fluorenilmetiloxicarbonil
HHG	Eixo hormonal hipotálamo-hipófise-gonadal
ICSI	Injeção intracitoplasmática de espermatozoides
IF	Fator de impacto
IM	Espermatozoides imóveis
KCN	Cianeto de potássio
Keap1	Kelch ECH associado a proteína 1
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrofotometria de massas
MPL	Motilidade progressiva lenta
MPR	Motilidade progressiva rápida
NOX5	NADPH 5 oxidase
NP	Espermatozoides não progressivos
Nrf2	Fator de transcrição nuclear fator eritróide 2 – relacionado 2
OMS	Organização Mundial da Saúde

pH	Potencial hidrogeniônico
POP	Procedimento operacional padrão
Ppm	Partes por milhão
Prisma	Itens de relatório preferidos para revisões sistemáticas e meta-análises
ERO'S	Espécies reativas de oxigênio
SCD	Dispersão da cromatina espermática
SPPS	Síntese de peptídeo em fase sólida
t2	Tempo decorrido (horas) desde a inseminação até o estado de um embrião com dois blastômeros
t3	Tempo decorrido (horas) desde a inseminação até o estado de um embrião com três blastômeros
t4	Tempo decorrido (horas) desde a inseminação até o estado de um embrião com quatro blastômeros
t5	Tempo decorrido (horas) desde a inseminação até o estado de um embrião com cinco blastômeros
t6	Tempo decorrido (horas) desde a inseminação até o estado de um embrião com seis blastômeros
t8	Tempo decorrido (horas) desde a inseminação até o estado de um embrião com oito blastômeros
TBTU	2 - (1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminium tetrafluoroborate
TESE	Extração de espermatozoide testicular
TFA	Ácido trifluoracético
tPNf	Tempo (horas) desde a inseminação até o desaparecimento dos pronúcleos e fusão do material genético dos mesmos ou singamia
TYB	TEST Yolk Buffer

SUMÁRIO ESQUEMÁTICO**MANUSCRITO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO****CAPÍTULO I**

Artigo submetido no periódico
Reproductive Sciences - Springer Nature

CAPÍTULO II

Estudo experimental

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

1.	Introdução	18
2.	Seleção dos estudos	19
3.	Dano criogênico nos espermatozoides	22
4.	Atividade antioxidante na viabilidade e motilidade espermática	25
5.	Atividade antioxidante na integridade do DNA espermático	27
6.	Conclusão	29
	Referências	59

CAPÍTULO II

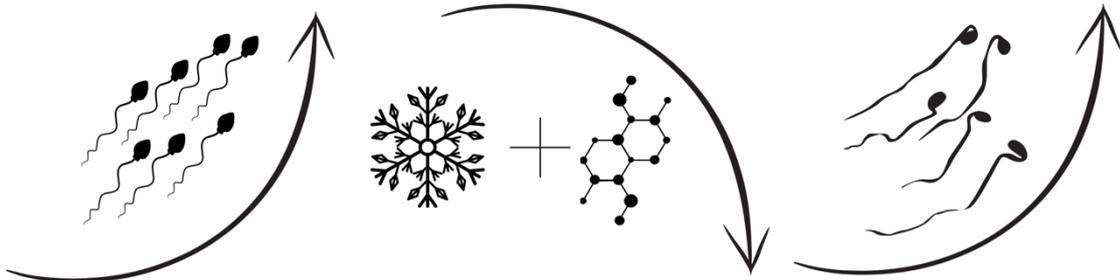
1.	Introdução	32
2.	Materiais e métodos	33
2.1.	Seleção dos voluntários	33
2.2.	Critérios de inclusão	33
2.3.	Critérios de exclusão	34
2.4.	Amostra seminal	34
2.4.1.	Coleta seminal	34
2.4.2.	Espermograma	35
2.4.3.	Processamento seminal	39
2.4.4.	Congelamento-descongelamento seminal	40
2.5.	Peptídeos antioxidantes	40
2.5.1.	Síntese dos peptídeos Antioxidin-I e PaT-2	40
2.5.2.	Secagem e purificação das sínteses em cromatografia líquida	41
2.5.3.	Identificação e confirmação das sínteses por espectrometria de massas	42
2.6.	Citotoxicidade em espermatozoides humanos	43
2.7.	Atividade antioxidante na motilidade espermática	44
2.8.	Atividade antioxidante na integridade do DNA espermático	45
2.9.	Análise estatística	46
3.	Resultados e discussões	46
3.1.	Espermograma	46
3.2.	Peptídeos antioxidantes	47
3.3.	Citotoxicidade em espermatozoides humanos	52
3.4.	Atividade antioxidante na motilidade espermática	53
3.5.	Atividade antioxidante na integridade do DNA espermático	55
4.	Conclusão	58
	Referências	59

CAPÍTULO I

Artigo submetido no periódico Reproductive Sciences - Springer Nature

ISSN: 1933 - 7191

Congelamento + ERO's



Ejaculado fresco

> vitalidade;
> motilidade progressiva;
< fragmentação de DNA.

Ejaculado descongelado

< vitalidade;
< motilidade progressiva;
> fragmentação de DNA.

CORRELAÇÃO ENTRE O EQUILÍBRIO REDOX E O DANO CRIOGÊNICO NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN HUMANO: UMA REVISÃO

Resumo

A criopreservação de espermatozoides é uma técnica da reprodução assistida que possibilita o planejamento reprodutivo e a utilização futura do material genético em ciclos de tratamento de reprodução humana. Entretanto, o dano criogênico, caracterizado pela diminuição da motilidade, vitalidade e aumento da fragmentação do DNA, é inevitável, independentemente da técnica de congelamento. A via principal do dano criogênico é o estresse oxidativo, oriundo do desequilíbrio redox celular causado pela supressão dos antioxidantes endógenos presentes no citoplasma do espermatozoide durante o resfriamento. Mas as alternativas focadas na via oxidativa, como a suplementação de antioxidantes exógenos, podem atuar na homeostase redox e, conseqüentemente, atenuar o dano criogênico. Diante disso, o objetivo desta revisão foi realizar uma análise da literatura nas bases PubMed/Medline, Scopus, Embase e ScienceDirect para verificar a relação dos danos oxidativos com as alterações seminais e o potencial crioprotetor de substâncias antioxidantes na criopreservação. Os resultados pós-descongelamento demonstraram que a suplementação antioxidante foi significativamente efetiva na atenuação do dano criogênico, independentemente do período de congelamento da amostra, preservando a motilidade, vitalidade e taxa de fragmentação do DNA dentro dos valores de referência clínica. Conclui-se que a suplementação antioxidante é uma alternativa eficaz no equilíbrio redox e, conseqüentemente, na atenuação do estresse oxidativo preservando melhores parâmetros seminais pós-descongelamento.

Palavras-chave: criopreservação; espermatozoide; espécies reativas de oxigênio; antioxidantes; fragmentação do DNA; motilidade espermática; viabilidade.

1. Introdução

A criopreservação de espermatozoides é uma técnica amplamente utilizada em centros de reprodução humana assistida para armazenamento do material genético (1). Como, por exemplo, em pacientes com oligozoospermia e/ou azoospermia que necessitam de procedimentos cirúrgicos, como o *percutaneous epididymal sperm aspiration* – PESA e *testicular sperm extraction* – TESE, para obtenção alternativa de espermatozoides e que desejam preservar o material excedente pós-uso no tratamento de fertilização in vitro - FIV (2). Além disto, a criopreservação permitiu um avanço dentro do planejamento reprodutivo da comunidade transgênero, preservando a fertilidade dos indivíduos previamente ao início da terapia hormonal para a transição de gênero (3). Entretanto, o dano criogênico gerado pelas alterações de pressão osmótica, toxicidade de crioprotetores, estresse oxidativo e formação de cristais de gelo intracelular levam a alterações funcionais e estruturais irreversíveis nas células espermáticas, podendo até inviabilizar a utilização do material seminal (4-7).

Dentre as alterações estruturais, a peroxidação lipídica, a integridade da membrana plasmática, a integridade do acrossoma e do DNA espermático são negativamente impactadas, bem como a motilidade e vitalidade, além da desregulação da produção de espécies reativas de oxigênio – ERO'S, resultando em alterações funcionais (8). Essas alterações observadas in vitro instigaram estudos para avaliar o impacto do sêmen congelado em tratamentos de FIV, entretanto os estudos demonstraram sucesso variável nas taxas clínicas entre uso de sêmen fresco versus congelado (9, 10). Isso pode ser devido à ausência de randomização e controle dos gametas, seja dos óvulos ou espermatozoides (doadores/cônjuges), e na capacidade de criotolerância de cada ejaculado, impactando no viés da variabilidade interindividual como fator de confusão na análise dos resultados (9, 11).

Apesar do dano criogênico ser de causa multifatorial, o estresse oxidativo é o principal impulsionador das alterações celulares durante a criopreservação (12), porque os espermatozoides são células que dependem do equilíbrio redox. Estudos demonstraram que a criopreservação causa o rápido esgotamento dos antioxidantes endógenos presentes no sêmen, devido as espécies reativas de oxigênio, subprodutos do metabolismo aeróbico das mitocôndrias, estarem em superprodução, acúmulo ou eliminação ineficaz que,

combinado com a baixa quantidade de antioxidantes enzimáticos presentes no citoplasma reduzido, gera o estresse oxidativo (13).

No trato urogenital masculino, apesar das espécies reativas de oxigênio terem um papel importante na maturação espermática, capacitação e hiperativação flagelar em níveis adequados, elas também têm uma relação direta com a infertilidade masculina e alterações dos parâmetros seminais quando elevadas (14). Diante disso, acredita-se que esses radicais livres levam à fragmentação do DNA espermático, redução da motilidade e vitalidade (15). O objetivo desta revisão é avaliar dentro da literatura científica os danos oxidativos relatados nas análises seminais e a atividade antioxidante de moléculas bioativas na criopreservação de espermatozoides humanos.

2. Seleção dos estudos

Uma pesquisa abrangente nas bases de dados científicas do PubMed/Medline, Scopus, Embase e ScienceDirect foi realizada para identificar publicações que relataram as avaliações dos parâmetros seminais de espermatozoides humanos (motilidade, vitalidade, fragmentação do DNA espermático e/ou espécies reativas de oxigênio - ROS) e sua relação com o dano criogênico no período de 2020 a 2024. Para aumentar a especificidade dos artigos resultantes da pesquisa, foram utilizados os seguintes descritores e operadores booleanos: *'human sperm OR human spermatozoa' AND (reactive oxygen species AND cryopreservation)*.

Todos os títulos e resumos resultantes da pesquisa foram analisados, incluindo na pré-seleção os artigos científicos de pesquisa original e/ou experimental em inglês que se adequavam ao tema proposto sobre o dano criogênico em espermatozoides humanos. Foram excluídos os artigos que não se adequavam ao tema proposto, além de artigos de revisão, capítulos de livros, enciclopédias e relatos de casos. Após a pré-seleção, os estudos elegíveis foram submetidos à equação do *Methodi Ordinatio* para seleção final da literatura científica a ser revisada (16). O *Methodi Ordinatio*, através de sua equação, permite qualificar os artigos individualmente com o fator de impacto (IF), o número de citações (Ci) e ano de publicação, possibilitando a seleção de artigos de maior qualidade científica a partir de um valor *InOrdinatio* mínimo (equação 1). Nesta revisão, foram classificados para a seleção final os trabalhos que obtiveram um *InOrdinatio* acima de 60.

$$InOrdinatio = \left(\frac{IF}{1000} \right) + (\alpha (10 - Research\ year - Publish\ year)) + (Ci). \quad (1)$$

Equação 1 – InOrdinatio. IF: fator de impacto; α : constante que varia de 0 a 10, valor sendo atribuído por escolha do pesquisador; Ci: número de citações.

Foram identificadas na literatura científica 183 publicações resultantes da busca para triagem dos títulos e resumos. Destas, foram excluídas 20 publicações duplicadas, 100 publicações que não se adequaram ao tipo de estudo delimitado (original/experimental) e 26 publicações que não se adequaram ao tema proposto. As 37 publicações restantes foram submetidas a seleção final através do *Methodi Ordinatio* resultando em 17 artigos incluídos no acervo a ser revisado (figura 1).

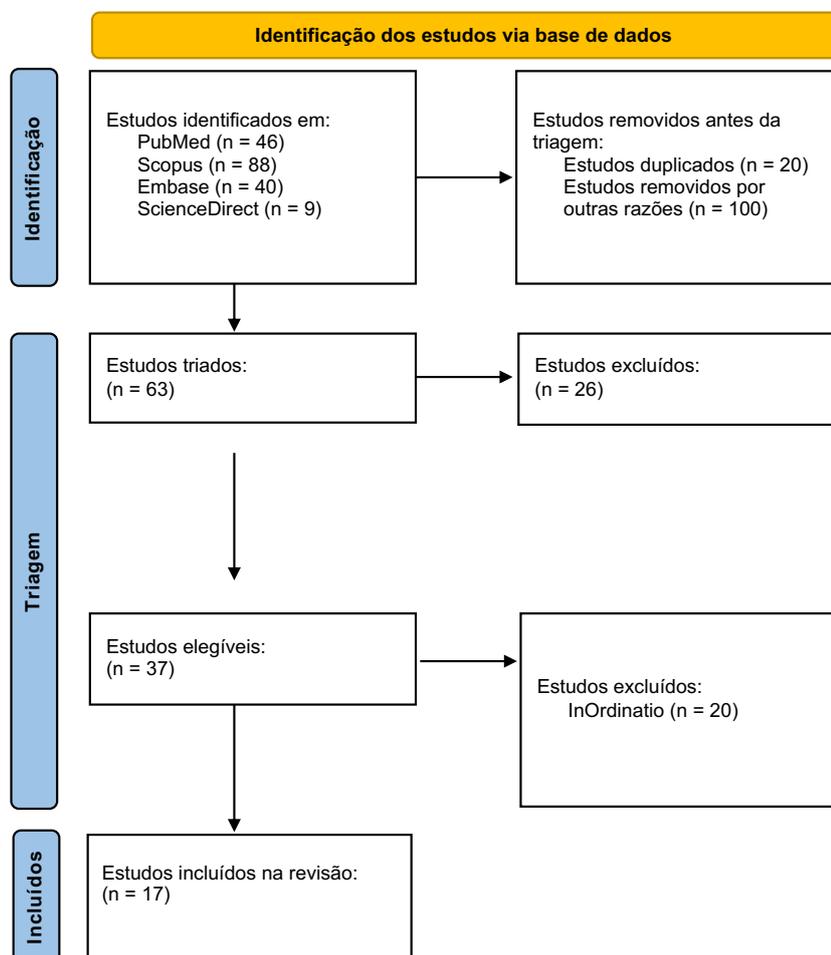


Figura 1 – Fluxograma PRISMA do processo de seleção dos estudos para a revisão.

Os 17 artigos validados pela equação 1 do *Methodi Ordinatio* foram listados em ordem decrescente de acordo com o valor *InOrdinatio* (tabela 1).

Tabela 1 – Classificação dos estudos conforme valor do *InOrdinatio*.

Classificação	Autores, referência	<i>InOrdinatio</i>
1°	Santonastaso et al 2021, (17)	85,0026
2°	Ponchia R et al 2022, (18)	79,0060
3°	Aghaz F et al 2021, (19)	77,0027
4°	Shi H et al 2024, (20)	76,0060
5°	Mahdavinezhad F et al 2022, (21)	75,0037
6°	Valipour J et al 2021, (22)	70,0023
7°	Chavoshi N et al 2021, (1)	69,0015
8°	Moradi B et al 2022, (23)	66,0021
9°	Baharsaadi M et al 2024, (24)	63,0023
10°	Salehi E et al 2024, (25)	62,0014
11°	Moradi G et al 2024, (26)	61,0026
12°	Hungerford A et al 2024, (6)	60,0060
13°	Hassoon A et al 2024, (27)	60,0045
14°	Jannatifar R et al 2024, (28)	60,0032
15°	Fu L et al 2024, (5)	60,0022
16°	Mohammadi B et al 2024, (29)	60,0021
17°	Ranganathan P et al 2024, (30)	60,0011

Fonte: Dados obtidos pela equação do Methodi Ordinatio.

3. Dano criogênico nos espermatozoides

A criopreservação convencional de espermatozoides possibilita maior flexibilidade no planejamento reprodutivo, entretanto há evidências que comprovam que essa técnica da medicina reprodutiva prejudica a vitalidade, a motilidade, a atividade mitocondrial e a fragmentação do DNA espermático (31-34). A literatura explica que o dano criogênico é causado por espécies reativas de oxigênio como os íons superóxido, radicais hidroxilas e peróxido de hidrogênio produzidos principalmente pelas mitocôndrias das células espermáticas durante o processo metabólico da cadeia oxidativa (35, 36). Durante o congelamento, mudanças na fluidez da membrana mitocondrial e plasmática aumentam, elevando a liberação de ERO'S, que por sua vez levam às alterações supracitadas (37).

Entretanto, o nível do dano criogênico é variável devido à criotolerância do ejaculado estar diretamente associada ao perfil seminal, demonstrando melhores taxas de vitalidade e motilidade pós-descongelamento em pacientes normozoospermicos quando comparado aos pacientes com alterações seminais como a oligozoospermia (24, 38). Os danos seminais possuem impacto muito maior do que apenas alterações no espermograma pois, como demonstrado em alguns estudos clínicos, a utilização de sêmen congelado proporciona resultados inferiores em algumas taxas clínicas em comparação a utilização do sêmen fresco (9). Outras publicações demonstram resultados contrários, afirmando que não existe superioridade significativa na utilização de um sobre o outro (10).

Esse sucesso variável, seja dos resultados dos parâmetros seminais pós-descongelamento ou dos resultados clínicos de ciclos de fertilização in vitro - FIV (sêmen fresco vs sêmen congelado) podem contemplar um viés importante na análise desses resultados: a ausência de padronização nos protocolos de congelamento-descongelamento. Atualmente os estudos clínicos e centros de reprodução humana no mundo realizam protocolos próprios, adequando-os às suas necessidades e estruturas para viabilizar o procedimento de preservação da fertilidade. Entretanto, aspectos variáveis, como o meio de congelamento comercial utilizado, período de abstinência ejaculatória, protocolo e tempo de congelamento da amostra para posterior análise e faixa etária/perfil seminal da população incluída, são vieses de confusão na comparação de resultados entre as análises de diferentes centros.

A análise da viabilidade e motilidade espermática são fatores preditores da fertilidade masculina e, além disto, são aspectos cruciais analisados pelo embriologista no momento de selecionar o espermatozoide para a injeção intracitoplasmática de espermatozoide - ICSI com o intuito de aumentar as chances de sucesso no procedimento de FIV (39, 40). Nessa perspectiva, foram avaliados estudos que observaram os parâmetros de viabilidade e motilidade espermática correlacionados ao impacto do congelamento na célula espermática.

Na avaliação do impacto do congelamento, realizou-se a comparação entre os grupos controles (fresco) e congelados (sem tratamento). Na análise da motilidade progressiva, a comparação entre os grupos evidencia uma redução significativa em todos os estudos revisados. Na análise da vitalidade, exceto dois estudos (5, 29) que não avaliaram o dano criogênico na viabilidade das células, todos os demais evidenciaram uma redução significativa nesse parâmetro (Tabela 2). O período de armazenamento do material seminal em nitrogênio líquido variou entre os estudos (2 - 14 dias).

Tabela 2 – Comparação dos parâmetros de viabilidade e motilidade progressiva relacionada ao dano criogênico.

Autores, referência	Viabilidade (%)		Motilidade progressiva (%)	
	Fresco	Congelado	Fresco	Congelado
Pochia R et al 2022, (18)	78,8 ± 3,1	46,9 ± 1,1*	63,7 ± 3	27 ± 1,5*
Aghaz F et al 2021, (19)	82 ± 12,9	53,1 ± 11,1*	80 ± 10,3	46,7 ± 15,6*
Valipour J et al 2021, (22)	81,4 ± 4,4	42,2 ± 7,8*	51,7 ± 9,2	27,7 ± 5*
Baharsaadi M et al 2024, (24)	96,2 ± 8,9	56,2 ± 10,9*	79,4 ± 8,2	35,8 ± 11,8*
Fu L et al 2024, (5)	Não avaliado	Não avaliado	31,9 ± 8,1	18,3 ± 7,1*
Mohammadi B et al 2024, (29)	Não avaliado	Não avaliado	52,5 ± 7,2	17,1 ± 9,7*
Hassoon et al 2024, (27)	78,8 ± 6,8	51,8 ± 5,9*	18,3 ± 3,5	6,1 ± 2,2*

Os dados são expressos em média ± desvio padrão. *Diferença estatística do grupo congelado em comparação ao grupo fresco (p<0,05).

Apesar de diferentes protocolos e períodos de congelamento serem vieses e exibirem resultados diferentes entre si (41-43) na análise da motilidade e viabilidade pós-descongelamento, os resultados desses estudos (tabela 2) demonstram que o dano criogênico à célula é um efeito inevitável da criopreservação e independe dessas variáveis. Os resultados corroboram com dados de Azam *et al* (2014), que demonstram a redução significativa da motilidade (40 ± 13 vs $86,6 \pm 5,9$) e vitalidade ($63,2 \pm 7,6$ vs $95,8 \pm 3,9$) no sêmen congelado em comparação ao sêmen fresco, respectivamente (44). Inclusive, os autores evidenciaram em seus experimentos que o dano criogênico não é atenuado com a utilização de métodos diferentes, como a vitrificação em comparação à técnica de congelamento convencional, respectivamente, nos parâmetros de motilidade ($41,9 \pm 10,3$ vs 40 ± 13) e vitalidade ($64,4 \pm 10$ vs $63,2 \pm 7,6$) (44). Entretanto, esse resultado diverge de outros estudos da literatura que afirmam que a vitrificação é capaz de reduzir o dano criogênico e recuperar melhores parâmetros seminais nos descongelamentos (45, 46). A divergência entre os métodos de vitrificação e congelamento convencional é influenciada não apenas pelo perfil de criotolerância seminal, uma vez que ambos os estudos avaliaram pacientes normozoospermicos, mas também pelo uso de diferentes crioprotetores e tempo específico de cada protocolo, vieses já avaliados e relacionados a resultados contraditórios entre as duas técnicas de criopreservação (47).

Os parâmetros da tabela 2, apesar de demonstrarem uma queda significativa, são viáveis para os procedimentos de fertilização *in vitro* devido à enorme margem de milhares de células presentes no ejaculado de homens normozoospermicos. Mas conforme citado anteriormente, cada perfil seminal exibe uma criotolerância e, devido a isso, é crucial conhecer os efeitos adversos do congelamento nos parâmetros seminais para a correta indicação do procedimento, pois amostras mais criosuscetíveis, como oligozoospermicas ou que sofreram terapias gonadotóxicas, podem ter uma recuperação reduzida dos parâmetros seminais pós-descongelamento, como demonstrado em Marchiani *et al*, 2023 (48).

4. Atividade antioxidante na viabilidade e motilidade espermática

A atividade antioxidante desempenha uma função crucial na neutralização da superprodução de ERO'S e regulação da homeostase redox no ambiente celular (49). E por isso, é potencialmente explorada como alternativa em cultivos celulares para o controle do dano criogênico (36), especificamente na área da reprodução humana e animal, onde a conservação do material genético é extremamente importante para o planejamento reprodutivo ou aprimoramento genético (50, 51). Nas células espermáticas, a via de sinalização antioxidante Keap1-Nrf2 é o mecanismo crítico no estresse oxidativo que regula a ativação de fator de transcrição Nrf2 e sua expressão gênica de antioxidantes e, por isso, é um alvo estratégico para as condições associadas ao estresse oxidativo no congelamento mencionado em estudos anteriores (52, 53). Nessa perspectiva, a literatura corrobora que essa via de sinalização é importante no controle redox, demonstrando que a expressão de Nrf2 é significativamente reduzida em amostras mais criosuscetíveis, como as oligozoospermicas em comparação às normozoospermicas (54).

Apesar do dano criogênico ser um aspecto inevitável dentro do congelamento das células, ele pode ser atenuado com a estratégia de adição de substância antioxidantes (55, 56). Diante disso, avaliou-se estudos que analisaram os parâmetros de motilidade e viabilidade comparando os resultados dos grupos controles (somente meio de congelamento) e testes (meio de congelamento + antioxidante). No parâmetro de viabilidade, todos os estudos demonstraram que a atividade antioxidante foi capaz de inibir significativamente o dano criogênico nas células em comparação ao seu respectivo grupo controle, exceto o tratamento com curcumina, conforme tabela 3 (17). Na análise de motilidade progressiva, a maioria dos estudos demonstraram que a progressividade linear dos espermatozoides foi significativamente maior no grupo tratamento em comparação ao respectivo controle, exceto o tratamento com os antioxidantes zinco e hydroxytyrosol, conforme tabela 3 (5, 24). Apesar dos valores do grupo controle no tratamento com Mito-Tempo (28) não serem fornecidos no estudo, os autores afirmam que houve diferença estatística significativa em ambos os parâmetros seminais avaliados (tabela 3).

Tabela 3 – Comparação dos parâmetros de viabilidade e motilidade progressiva entre os estudos após a criopreservação com tratamento antioxidante.

Substância, referência	Criopreservação	Viabilidade (%)		Motilidade progressiva (%)	
		Controle	Tratamento	Controle	Tratamento
Curcumina 20 µM, (17)	7 dias	50,57 ± 10,2	56,35 ± 12	42,59 ± 4,4	65 ± 3,73*
Myo-Inositol 20 mg/mL, (18)	Não informado	46,9 ± 1,1	48,5 ± 1,1*	27 ± 1,5	28,5 ± 1,8*
Sericina 5%, (19)	2 dias	53,13 ± 11,1	67,93 ± 10,1*	46,71 ± 15,6	61,66 ± 12,8*
Sulforaphano 5 µM, (22)	14 dias	42,22 ± 4,8	58,92 ± 6,2*	27,7 ± 5	37,28 ± 4,7*
L-prolina 4 mmol/L, (23)	Não informado	49,2 ± 13,3	58,3 ± 12,8*	36,1 ± 14,4	48,5 ± 15,2*
Hydroxytyrosol 100 µg/mL, (24)	7 dias	56,2 ± 10,9	71,5 ± 7,2*	35,8 ± 11,8	38,1 ± 10,4
Mitoquinona 2 nM, (26)	Não informado	56,3 ± 3,9	65,2 ± 2,6*	56,1 ± 2,6	67,7 ± 0,7*
Canthaxanthin 50 µM, (27)	30 dias	51,8 ± 5,9	71,3 ± 8,1*	6,1 ± 2,2	16,8 ± 3*
Mito-Tempo 0,2 mM, (28)	14 dias	-	58 ± 3,7*	-	14,5 ± 2,5*
Zinco 100 µM, (5)	60 dias	Não avaliado	Não avaliado	18,3 ± 7,1	18,4 ± 7,3
Astaxanthin 50 µM, (29)	14 dias	Não avaliado	Não avaliado	17,1 ± 9,7	27,5 ± 9,2*

Os dados são expressos em média ± desvio padrão. *Diferença estatística do grupo tratamento em comparação ao controle (p<0,05).

Os resultados da tabela 3 demonstram o potencial efeito antioxidante na preservação das células contra o dano criogênico e corrobora com outros estudos que avaliaram esse efeito no congelamento (53). Entretanto, os resultados da motilidade progressiva encontrados no estudo com zinco (5) são conflitantes com outro estudo da literatura com a mesma substância e concentração, o qual demonstrou resultados positivos na motilidade progressiva pós-descongelamento (57). As variáveis nos protocolos de congelamento entre ambos os estudos, como por exemplo o tempo de armazenamento em nitrogênio líquido de 10 (57) e 60 dias (5), pode explicar essa discrepância de resultados, fomentando a ideia de que o tempo de congelamento possa contribuir na intensidade do dano criogênico ou na meia-vida da substância. Ademais, Kotdawala *et al.* (2012)

demonstrou um aspecto anteriormente citado nesta revisão de que amostras mais criosuscetíveis demonstram parâmetros inferiores se comparadas às amostras normozoospermica sob mesmas condições de congelamento e concentração da molécula antioxidante utilizada (57). Isso reafirma a tese desta revisão, baseada nas análises do acervo bibliográfico revisado, de que o perfil seminal está relacionado com a criotolerância das células seminiais.

A literatura revisada permitiu correlacionar a motilidade progressiva e a fragmentação do DNA espermático com os níveis de espécies reativas de oxigênio e discutir a relação direta do estresse oxidativo nesses parâmetros. Na correlação entre a motilidade progressiva com ERO'S, 81,8% dos estudos (17, 20-23, 25, 26, 28, 29) exibiram o padrão de que a supressão significativa de espécies reativas de oxigênio aumentou significativamente a motilidade progressiva. Outros estudos (18,2%) (5, 24) divergiram desse padrão devido a um dos parâmetros analisados, ERO'S ou motilidade progressiva, não ter apresentado diferença significativa do grupo tratamento se comparado ao controle.

5. Atividade antioxidante na integridade do DNA espermático

Nos espermatozoides humanos, o DNA está ligado às histonas e protaminas que modelam a estrutura da cromatina para melhor estabilidade, proteção e funcionalidade do DNA (58). Esse processo inicia-se no estágio final da espermatogênese, durante a condensação, em que ocorre a substituição de histonas por protaminas (59). Entretanto, condições específicas, como o estresse oxidativo durante a criopreservação, podem causar danos ao DNA ou inibir o seu reparo, levando ao aumento da fragmentação do DNA espermático (60). A idade masculina também é um fator que está relacionado à fragmentação do DNA e aos resultados clínicos nos tratamentos de reprodução (61). Por isso a integridade conformacional do DNA espermático é importante para a fertilidade masculina, sendo um fator preditivo para diferenciar homens férteis e inférteis, em que o limite médio de DNA fragmentado varia entre 25-30% (62, 63). Estudos demonstram que amostras seminiais com o índice de fragmentação do DNA – DFI >25% impactam negativamente as taxas de fertilização, implantação, gravidez clínica e aborto, além dos impactos negativos em blastocistos, como o atraso dos eventos embrionários (tPNf, t2, t3, t4, t5, t6 e t8) avaliados pela morfocinética (64-66).

Diante disso, avaliou-se estudos que analisaram a relação da suplementação com antioxidante durante a criopreservação nos níveis de fragmentação do DNA espermático. Desses estudos, 77,8% (5, 17, 21, 25, 26, 28, 29) demonstraram que a atividade antioxidante inibiu significativamente a fragmentação do DNA espermático, mantendo o valor médio do DFI <25%. Os outros 22,2% evidenciaram resultados contrários, seja com a diminuição significativa da fragmentação mas com DFI >25% (26), aumento significativo da fragmentação com DFI >25% (6), DFI <25% (1) sem diferença significativa ou DFI >25% (23) sem diferença significativa, todos comparados aos respectivos controles. Esses estudos (5, 17, 21, 25, 26, 28, 29) demonstraram o padrão de que a supressão significativa de espécies reativas de oxigênio diminui significativamente a fragmentação do DNA espermático. Outros estudos divergiram desse padrão devido ao parâmetro de DFI não ter sido avaliado (20, 22) ou não demonstrar diferença significativa do grupo tratamento comparado ao controle nas análises de ERO'S ou DFI (23, 24).

A divisão de grupos utilizando uma linha de corte de 25% de DFI é devido a sua ampla utilização como valor de referência na análise seminal de homens sob investigação reprodutiva (62, 63). Mas, para além disto, neste estudo, o valor de referência definido pela literatura (DFI <25%), e amplamente utilizado na conduta clínica de diversos centros de reprodução humana assistida, serviu como base de relevância clínica por identificar potenciais moléculas antioxidantes capazes de reduzir a fragmentação de DNA para níveis aceitáveis. Isso possibilita a triagem de potenciais moléculas para uso clínico e aprimoramento da técnica de congelamento, mantendo a DFI em níveis normais e, consequentemente, possibilitando maior chance de sucesso nos resultados e na utilização do material criopreservado nos tratamentos.

6. Conclusão

O impacto do congelamento seminal mediado pelo estresse oxidativo é inevitável com as técnicas atualmente utilizadas. Entretanto, devido ao dano criogênico ser mediado por espécies reativas de oxigênio em níveis elevados, moléculas antioxidantes são potenciais alternativas para reduzir os efeitos nocivos do procedimento. As moléculas antioxidantes demonstraram um potencial clínico relevante inibindo o estresse oxidativo induzido durante a criopreservação, independentemente do período de armazenamento em nitrogênio líquido, associado ao aumento da vitalidade, motilidade progressiva e redução da fragmentação do DNA espermático para níveis dentro dos valores de referência clínica. Tal resultado demonstra que a via antioxidante é importante para a segurança e os resultados satisfatórios pós-descongelamento por participar do equilíbrio redox nas células atenuando o dano criogênico.

CAPÍTULO II

Estudo experimental - criopreservação com suplementação antioxidante

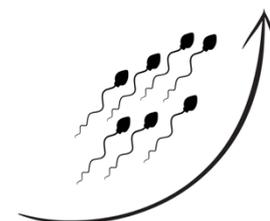
Congelamento + moléculas antioxidantes



Participante com perfil normozoospermico submetido ao procedimento de preservação da fertilidade



+



Material seminal descongelado com parâmetros seminais preservados e aptos para utilização em fertilização in vitro.

PEPTÍDEOS DA BIODIVERSIDADE BRASILEIRA COM PROMISSORA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PARA CRIOPROTEÇÃO DE ESPERMATOZOIDE HUMANOS CONTRA O DESEQUILÍBRIO REDOX: AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE, MOTILIDADE, E FRAGMENTAÇÃO DO DNA ESPERMÁTICO.

Resumo

O dano criogênico à motilidade e fragmentação espermática são questões críticas que afetam a fertilidade masculina e, conseqüentemente, os resultados dentro dos tratamentos de reprodução humana, devido ao estresse oxidativo gerado pela superprodução de radicais livres pelo processo metabólico da mitocôndria, induzido pela criopreservação. A motilidade é um fator determinante da capacidade de fertilização do gameta, enquanto altas taxas de fragmentação do DNA espermático estão associadas a maiores índices de aborto espontâneo e gravidez bioquímica. Diante desse contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a preservação de ambos os parâmetros seminais por meio da suplementação de peptídeos antioxidantes durante o processo de criopreservação, visando atenuar o estresse oxidativo envolvido no dano criogênico. Ambos os peptídeos (Antioxidin-I e PaT-2) demonstraram biocompatibilidade com espermatozoides humanos sem exibir citotoxicidade mesmo nas maiores concentrações testadas (200 – 12,5 µM). Aliado a isso, as maiores concentrações do Antioxidin-I exibiram resultados de motilidade em espermatozoides congelados semelhantes à motilidade de espermatozoides frescos. Na fragmentação do DNA espermático, embora demonstrada a redução da fragmentação nos grupos tratados de ambos os peptídeos, não houve diferença significativa quando comparada ao grupo congelado. Os resultados sugerem que, embora a suplementação com peptídeos antioxidantes tenha preservado a motilidade espermática através do equilíbrio redox, a ausência de efeito na fragmentação sugere um possível mecanismo celular diferente envolvido no dano criogênico que não é impactado pela ação antioxidante dos peptídeos.

Palavras-chave: Peptídeos bioativos, antioxidantes, criopreservação, estresse oxidativo.

1. Introdução

A tecnologia da criopreservação de espermatozoides é um importante avanço para o planejamento reprodutivo (48). A indicação do procedimento depende do perfil do caso, partindo desde indivíduos férteis com desejo de preservar a fertilidade devido a fatores sociais como a idade, tratamento hormonal e priorização da carreira profissional à indivíduos com fatores de infertilidade como astenozoospermia e oligozoospermia, condições que se caracterizam pela motilidade espermática progressiva <30% e concentração espermática <15 milhões/mL, respectivamente (67).

Entretanto, a criopreservação gera danos celulares nas células espermáticas, contribuindo na redução de espermatozoides com motilidade progressiva pós-descongelamento (56). Diante disto, a criopreservação de amostras, principalmente com perfis seminais mais criosucetíveis, como a astenozoospermia, devido a biomarcadores na membrana, implica, na maioria das vezes, em um descongelamento com ausência de espermatozoides móveis (68). Além disto, o estresse oxidativo oriundo de radicais livres da fosforilação, via respiração celular, pode causar danos celulares relacionados a infertilidade, como a diminuição severa na motilidade espermática (69). Além disto, danos ao DNA, lipídios e às proteínas também são relatados no estresse oxidativo em espermatozoides humanos (70).

O Antioxidin-I, caracterizado pela sequência de aminoácidos TWYFITPYIPDK, e o PaT-2, caracterizado pela sequência de aminoácidos FPPWL-NH₂, são peptídeos bioprospectados da secreção cutânea dos anfíbios *P. nattereri* e *P. azurea*, respectivamente (71, 72). Devido a suas composições, sequências e estruturas, esses peptídeos demonstraram atividade antioxidante em ensaios in vitro, suprimindo radicais livres semelhantes aos que ocorrem in vivo, conferindo maior relevância biológica para a atividade mensurada (71, 72). Pelo fato de o desequilíbrio redox ser o principal impulsionador do dano criogênico, ambos os peptídeos podem ter um potencial uso biotecnológico para o aprimoramento da criopreservação de espermatozoides, preservando os parâmetros seminais pós-descongelamento.

O objetivo deste estudo experimental foi suplementar o meio crioprotetor comercial TYB com os peptídeos Antioxidin-I e PaT-2 e avaliar se a atividade

antioxidante de ambos os peptídeos foi capaz de preservar a motilidade e a fragmentação do DNA espermático pós-descongelamento.

2. Materiais e métodos

2.1. Seleção do voluntário

A seleção do voluntário para o presente estudo foi aprovada pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (FM/UnB), sob o número de protocolo 69148723.6.0000.5558, e foi conduzida por meio de um processo sistemático na clínica de reprodução humana Genesis, localizada em Brasília, Distrito Federal, com o intuito de garantir a privacidade dos dados dos participantes. Inicialmente, foi realizada uma divulgação interna direcionada aos pacientes que estavam passando por avaliações de saúde reprodutiva, visando identificar potenciais voluntários. Após divulgação e triagem do histórico dos pacientes que se manifestaram como voluntários, foi possível selecionar um participante que atendia a todos os critérios de inclusão estabelecidos. Esse procedimento assegurou que a seleção fosse realizada de maneira ética, garantindo a adequação do participante ao perfil necessário para a pesquisa e minimizando os riscos de natureza psicológica associados ao diagnóstico de infertilidade, especialmente em pacientes que não haviam passado por uma análise seminal prévia.

2.2. Critérios de inclusão

A delimitação dos critérios de inclusão no estudo experimental foi baseada nas diretrizes da Organização Mundial da Saúde – OMS em seu manual de exame e processamento seminal, 6ª edição (2021) (67). Esses critérios visam minimizar variáveis, padronizando os parâmetros seminais adequados e garantindo a integridade das amostras seminais, sobretudo as análises posteriores. Os critérios definidos possuem, de forma direta ou indireta, associação com a fertilidade masculina e os parâmetros seminais analisados no espermograma, sendo eles:

- Homem cis com faixa etária entre 25-35 anos;
- Hábitos saudáveis (prática de exercícios físicos e alimentação equilibrada);
- Não etilista;
- Não tabagista;
- Sem histórico de uso de esteroides anabolizantes;

- Perfil seminal normal.

A faixa etária do voluntário, definida como primeiro critério de inclusão, foi baseada em estudos recentes na literatura científica que demonstram o impacto negativo da idade masculina avançada nos parâmetros seminais, especificamente na maior taxa de fragmentação do DNA e redução severa na motilidade espermática (73). Os demais critérios, como o tabagismo, o etilismo, o sedentarismo e uso de esteroides anabolizantes, são associados como causalidade da infertilidade, de forma transitória ou não, causando azoospermia e/ou oligozoospermia, caracterizados pela ausência ou diminuição da contagem de espermatozoides, respectivamente, e supressão do eixo hormonal hipotálamo-hipófise-gonadal – HHG, afetando a espermatogênese (74, 75). Diante disso, as delimitações dos critérios possibilitaram maior confiabilidade nos resultados gerados através do controle de possíveis vieses nos parâmetros seminais, seja de causa social ou ambiental.

2.3. Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo os voluntários que não se adequaram aos critérios de inclusão previamente definidos no tópico 2.2.

2.4. Amostra seminal

2.4.1. Coleta seminal

O processo de coleta de amostras (n= 4) foi conduzido em conformidade com o Procedimento Operacional Padrão - POP da clínica Genesis, fundamentado nas diretrizes do manual de exame e processamento seminal da Organização Mundial da Saúde - OMS (67). Esse protocolo visa assegurar a integridade das amostras e, por conseguinte, a confiabilidade das análises seminais. Com o agendamento da coleta previamente definido, o voluntário recebeu orientações detalhadas 72 horas antes do procedimento, fornecidas pela equipe da clínica. Essas orientações incluíam a recomendação de abstinência ejaculatória por um período de 2 dias e a proibição do consumo de bebidas alcoólicas nas 72 horas que antecedem a coleta. Tais diretrizes têm como objetivo padronizar o preparo pré-coleta e minimizar os impactos negativos transitórios que podem ser causados por longos períodos de abstinência e pelo consumo de álcool. No dia da coleta, o voluntário foi encaminhado para a sala de coleta seminal, onde foi instruído a realizar a higienização e secagem das mãos e da glândula antes de proceder à masturbação

em um coletor estéril. Após a coleta, as amostras foram entregues ao laboratório da clínica para análise seguida do processamento seminal.

2.4.2. Espermograma

A análise seminal do voluntário foi conduzida em estrita conformidade com as diretrizes estabelecidas na sexta edição do manual de examinação e processamento de Sêmen da Organização Mundial da Saúde – OMS (67). Após a coleta do ejaculado fresco, as amostras foram submetidas a um processo de liquefação a 37 °C por 20 minutos, o que é fundamental para garantir a adequação das amostras para avaliação. Durante essa fase, foram analisados diversos parâmetros macroscópicos, incluindo volume, aspecto, potencial hidrogeniônico - pH, liquefação e viscosidade.

- a) Volume: a medida do volume ejaculatório é uma avaliação fundamental na análise seminal, uma vez que ela reflete a funcionalidade das glândulas sexuais e auxiliares responsáveis pela secreção seminal. A pesagem do volume ejaculatório foi realizada utilizando balança analítica disponível na clínica, garantindo a precisão e confiabilidade do volume.
- b) Aspecto: o ejaculado considerado normal apresenta uma aparência homogênea, com coloração que varia entre branco e cinza opalescente. Alterações na coloração do sêmen podem ocorrer em decorrência de diversos fatores, como períodos prolongados de abstinência ejaculatória, resultando em uma coloração amarelada. Além disto, a presença de coloração marrom-avermelhada pode indicar a presença de sangue, frequentemente associada a infecções ou outras condições patológicas.
- c) Potencial hidrogeniônico (pH): o pH no ejaculado é variável e pode apresentar flutuações, sendo influenciado pela secreção prostática, que possui características ácidas, e pela secreção vesicular, que é alcalina. Essa interação resulta em um pH que, em condições normais, se mantém acima de 7,2, essencial para a viabilidade e motilidade dos espermatozoides. A medição do pH foi realizada imediatamente após a entrega das amostras, utilizando fita reagente específica para sêmen.
- d) Liquefação: a liquefação seminal é um processo fisiológico crucial para a funcionalidade do sêmen. Após a coleta do ejaculado, a amostra apresenta-se tipicamente de forma heterogênea, coagulada ou semissólida, em decorrência das

proteínas presentes nas secreções da vesícula seminal. No decorrer do tempo, geralmente entre 30 e 60 minutos, essa amostra deve se tornar mais homogênea, fluida ou aquosa, indicando que as enzimas prostáticas estão atuando de forma eficaz na liquefação seminal. A liquefação é um fator fundamental, pois a incapacidade de ocorrer adequadamente pode comprometer a motilidade espermática e, conseqüentemente, a fertilidade natural.

- e) Viscosidade: a viscosidade normal é caracterizada pelo gotejamento lento do sêmen ao ser dispensado de uma pipeta, indicando uma consistência adequada que favorece a motilidade espermática. Em contraste, uma viscosidade anormal ou aumentada é identificada pela formação de um fio de sêmen com comprimento igual ou superior a 2 centímetros.

Em seguida, as amostras foram submetidas a uma análise microscópica detalhada, que envolveu a concentração de espermatozoides, a avaliação da motilidade, vitalidade e fragmentação do DNA espermático.

- a) Concentração: para contagem, 10 μ L de sêmen liquefeito e homogeneizado foi adicionado na câmara Makler, garantindo uma distribuição uniforme dos espermatozoides na câmara que possui uma grade de contagem projetada para determinação da concentração em milhões/mL. A câmara foi colocada sob microscópio óptico Eclipse Ei – Nikon em objetiva de 40x e realizada a média de 4 contagens para cada classificação de motilidade (A, B, C e D), cada uma realizada em 10 quadrantes da câmara de Makler.
- b) Motilidade: a motilidade progressiva dos espermatozoides, calculada pela média da concentração da respectiva motilidade, é importante por estar relacionada com a taxa de gravidez, conferindo relevância biológica para este parâmetro. Existem 4 classificações de motilidade (A, B, C e D) que são especificadas nas análises seminais sendo expressas em % relativa.
- Motilidade Progressiva Rápida – MPR (A): espermatozoides com movimento linear com a velocidade de 25 μ m/s;
 - Motilidade Progressiva Lenta – MPL (B): espermatozoides com movimento linear com a velocidade menor de 25 μ m/s;

- Não Progressivos – NP (C): espermatozoides com movimento de cauda, mas ausência de progressão linear ou progressão em torno do próprio eixo, com velocidade média de 5µm/s;
 - Imóveis – IM (D): espermatozoides sem movimento e progressão linear.
- c) Vitalidade: a vitalidade espermática, realizada através da análise da integridade da membrana corada com eosina-nigrosina – VitalScreen, é importante em amostra com baixa motilidade para diferenciar espermatozoides imóveis de mortos, diagnosticando a condição clínica de necrozoospermia. Para a análise foram observadas 200 células e o valor é expresso em % relativa.
- d) Fragmentação do DNA espermático: a análise da integridade do DNA espermático, realizada pela técnica de dispersão da cromatina, é importante devido a sua elevada taxa estar associada à morte celular, ao estresse oxidativo e a outras condições ambientais, impactando as taxas de gravidez. O teste foi realizado de acordo com as instruções do fabricante do kit comercial CanFrag – Candore.

Somente os ejaculados que apresentaram valores dentro dos parâmetros normatizados conforme as diretrizes do Manual de Processamento de Sêmen da OMS (67), tabela 1, foram consideradas para os procedimentos subsequentes. As amostras que demonstraram alterações, especialmente no volume, concentração, motilidade, vitalidade e fragmentação do DNA foram descartadas. Nesses casos, foi agendada uma nova coleta de sêmen do voluntário, permitindo uma reavaliação seminal que possibilitasse a obtenção de amostras adequadas para a pesquisa.

Tabela 1 – Valores de referência dos parâmetros seminais segundo o manual de examinação e processamento seminal da OMS.

Parâmetro seminal	Valores normais
Volume	>1,4 mL
pH	>7,2
Aspecto	Branco opalescente
Liquefação	<60 min, completa
Viscosidade	Normal
Concentração/mL	$\geq 16 \times 10^6$ espermatozoides/mL
Motilidade progressiva	$\geq 30\%$ de progressivos (A+B)
Vitalidade	$\geq 54\%$ de vivos

Dados obtidos do manual de examinação e processamento seminal da OMS, sexta edição (67).

Apesar desses valores referenciarem cada parâmetro, o manual preconiza e recomenda avaliações individualizadas da fertilidade pelo médico especialista. O manual da OMS discrimina os percentis de cada parâmetro para guiar o profissional na análise de cada paciente, conforme figura 2.

Tabela 2 – Distribuição dos resultados seminais de homens em casais que engravidaram de maneira natural dentro do período de um ano de tentativas sem métodos contraceptivos (OMS).

	Nº	Percentis								
		2.5	5	10	25	50	75	90	95	97,5
Volume seminal (mL)	3586	1	1,4	1,8	2,3	3	4,2	5.5	6,2	6,9
Concentração espermática (10^6 /mL)	3587	11	16	22	36	66	110	166	208	254
Motilidade progressiva (%)	3389	24	30	36	45	55	63	71	77	81
Imóveis (%)	2800	15	20	23	30	37	45	53	58	65

Dados obtidos do manual de examinação e processamento seminal da OMS, sexta edição (67).

2.4.3. Processamento seminal

Para o processamento seminal, foi realizado gradiente de 0,5 de camada única de 45%, preparado a partir da diluição de 4,5 mL de GV gradiente concentrado 100% - Ingaméd® em 5,5 mL de meio DMEM, a fim de criar o gradiente de densidade necessário para a separação dos espermatozoides, processando todo o volume ejaculado dividido em vários tubos. O processamento seminal foi realizado em tubo cônico de 15 mL – Corning®, sob agitação de 1200 rpm durante 10 minutos, a fim de promover a formação de um pellet no fundo do tubo. A agitação e a aceleração da centrifugação permitem a separação eficiente dos espermatozoides em função da sua motilidade e capacidade de migração através do gradiente (figura 1).

Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado cuidadosamente, e o pellet de espermatozoides foi ressuspensão em 4 mL de meio DMEM aquecido a 37 °C. A ressuspensão foi seguida de uma nova centrifugação a 1100 rpm por 5 minutos, realizada para eliminar possíveis resíduos do gradiente e de impurezas presentes no sobrenadante. Após a segunda centrifugação, o sobrenadante foi novamente descartado e o pellet foi ressuspensão em um volume final de 1 mL de meio DMEM, para possibilitar a avaliação da concentração e motilidade espermática necessária, garantindo que os espermatozoides selecionados estivessem aptos para procedimentos subsequentes do estudo (figura 1).

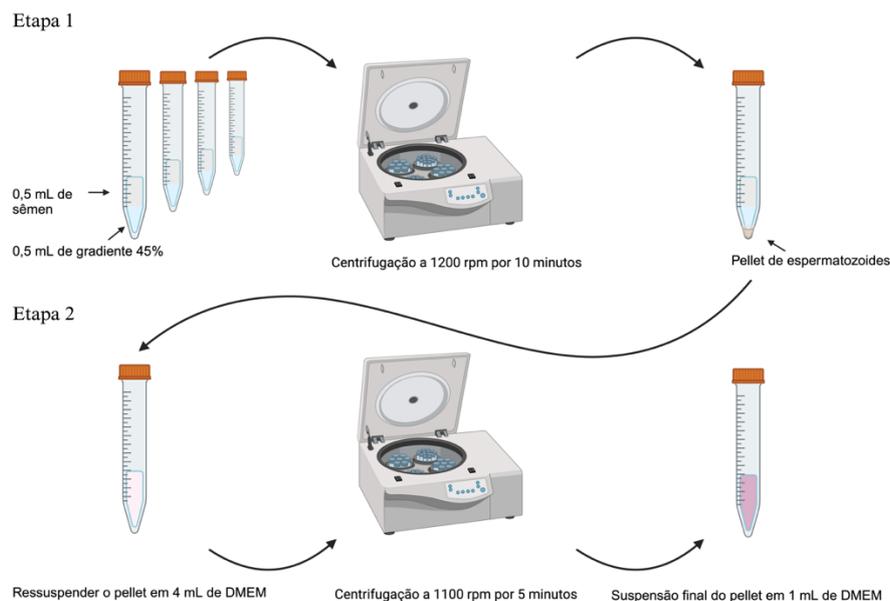


Figura 1 – Esquema ilustrativo do processamento seminal.

2.4.4. Congelamento-descongelo seminal

O congelamento foi realizado pelo método de congelamento rápido em vapor de nitrogênio. As amostras processadas foram diluídas com crioprotetor TYB – Irvine Scientific®, suplementado ou não com os peptídeos na faixa de concentração 200 – 100 μ M, adicionando gota a gota de crioprotetor à suspensão de células a cada 30 segundos (1:1) em criotubos de 1,5 mL – Corning®. Finalizada a diluição, os criotubos foram mantidos em temperatura ambiente por 10 minutos, seguido do armazenamento em freezer (-20 °C) pelo mesmo período. Em seguida foram submetidos ao vapor de nitrogênio (-80 °C) por 1 hora antes de serem submersos em nitrogênio líquido (-196 °C) e armazenados em tanques específicos da clínica gênese durante 7 dias. Para o descongelamento das amostras, os criotubos foram retirados do nitrogênio líquido e mantidos a temperatura ambiente até o descongelamento completo (20 minutos).

2.5. Peptídeos antioxidantes

2.5.1. Síntese de peptídeos: Antioxidin-I e PaT2

Ambos os peptídeos foram sintetizados pelo método Solid Phase Peptide Synthesis – SPPS utilizando 9-fluorenilmetiloxycarbonil (Fmoc) como grupo protetor do N-terminal dos aminoácidos (76). O peptídeo PaT-2 (FFPWL-NH₂), amidado no C-

terminal, foi sintetizado em resina Rink Amide (0,62 mmol/g, 100-200 mesh, Novabiochem, Merck) e os acoplamentos realizados com N, N - diisopropilcarbodiimida (DIC, Sigma-Aldrich) e Oxima® (Novabiochem, Merck) durante 1h30. O peptídeo Antioxidin-I (TWYFITPYIPDK), carboxilado no C-terminal, foi sintetizado em resina Wang (0,4 – 0,7 mmol/g, 100-200 mesh, Novabiochem, Merck) com o primeiro aminoácido acoplado já de fábrica e utilizando 2 - (1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminium tetrafluoroborate (TBTU) e N, N – Diisopropiletilamina (DIPEA) para o acoplamento dos demais aminoácidos durante 1h.

Após a finalização do processo de acoplamento de cada aminoácido, as sequências de aminoácidos foram submetidas à reação de desproteção para a retirada do grupo protetor Fmoc utilizando a base 4-metilpiperidina (20% em dimetilformamida - DMF), v/v) em duas reações de 15min, viabilizando o acoplamento do próximo aminoácido. Entre os processos de acoplamento-desacoplamento foram realizados os testes quantitativos de Kaiser para verificação de amina livre e, para isso, uma quantidade mínima de resina da síntese foi aquecida com 2 gotas de 5% de ninhidrina em etanol (m/v), 2 gotas de 80% fenol em etanol (v/v) e 2% KCN em piridina (v/v).

Após a finalização do acoplamento da sequência primária completa de ambos os peptídeos, ácido trifluoracético – TFA, Sigma-Aldrich foi utilizado para clivar os peptídeos dos suportes poliméricos, em coquetéis de clivagem com tianisol, água, fenol e etanoditiol (82,5:5:5:5:2,5 (v/v)), como sequestradores de espécies reativas geradas na reação de clivagem. Os produtos de síntese foram adicionados às soluções de clivagem e deixados sob agitação por 1h30min. Posteriormente, a solução reacional foi deixada sob fluxo de argônio para a evaporação do TFA presente, e adicionado éter diisopropílicos gelado para precipitação do peptídeo livre da resina. Em um funil com placa sinterizada, os produtos de síntese foram filtrados com 50% acetonitrila em água (v/v) para a separação dos peptídeos e da resina.

2.5.2. Secagem e purificação das sínteses em cromatografia líquida

As frações coletadas durante a filtragem dos produtos de ambas as sínteses foram submetidas ao concentrador centrífugo CentriVap – LabConco® para evaporação dos solventes orgânicos seguido do congelamento a -20 °C para liofilização das frações em liofilizador L101 – LioBras®. Com as frações liofilizadas, foi realizada a purificação por cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE em cromatógrafo - Shimadzu®

utilizando coluna preparativa de fase reversa Jupiter C18 (250 x 21,2 mm, 10 µm, 300 Å) da phenomenex, sistema binário de bombeamento (LC-20AR), detector de arranjo de diodo (DAD, SPD-M20A) e sistema de análise e processamento de dados LabSolutions versão 5.92. As purificações foram realizadas com soluções de, no máximo, 20mg/ml de peptídeo bruto, com gradiente de fase móvel (Acetonitrila + 0,1% de TFA e água + 0,1% de TFA) e fluxo de 10 ml/min:

0 – 5min: 5% acetonitrila + 0,1% TFA;

5 – 50min: 5% a 100% acetonitrila + 0,1% TFA;

50 – 55min: 100% acetonitrila + 0,1% TFA;

55min – 56min: 100% a 5% acetonitrila + 0,1% TFA;

56min – 60min: 5% acetonitrila + 0,1% TFA.

Durante o processo de purificação, os tempos de retenção foram monitorados em comprimentos de onda iguais a 216 e 280 nm, valores referentes às absorções das ligações peptídicas e da cadeia lateral do triptofano, respectivamente. Todos os picos observados no cromatograma foram coletados, secos, liofilizados e posteriormente submetidos à caracterização por espectrometria de massas.

2.5.3. Identificação e confirmação das sínteses por espectrometria de massas

A verificação da síntese dos peptídeos foi realizada por meio de espectrometria de massa acoplada a um cromatógrafo líquido (LC-MS) e análise dos fragmentos gerados (LC-MS/MS), com o objetivo de determinar a composição da molécula, comparando a massa molecular teórica com a obtida experimentalmente. O experimento foi conduzido utilizando um espectrômetro de alta resolução TripleTOF 5600+ (Sciex, Ontário, Canadá) pertencente à Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de Brasília (CAIQ – UnB). Equipado com uma fonte de ionização por electrospray (ESI – Electrospray Ionization), separador de íons do tipo triplo quadrupolo, módulo de colisão para geração de fragmentos por dissociação em gás inerte, analisador de massas tempo

de voo (TOF – Time of Flight) e, por fim, conectado a um cromatógrafo líquido (Eksigent UltraLC 100, Sciex) que permite a injeção automática da solução do analito a uma vazão constante de 0,3 mL/min.

Os ensaios foram realizados com o espectrômetro ajustado no modo positivo e utilizando o modo de aquisição IDA (Information Dependent Acquisition), que seleciona automaticamente os íons para fragmentação com base em critérios previamente estabelecidos. Para a análise, pegou-se uma ponta de espátula com alguns grãos do peptídeo liofilizado e dissolvido em 1 mL de uma solução de metanol com 0,1 % de ácido fórmico. Os espectros de massa gerados foram analisados e processados com o software PeakView v2.1, enquanto os espectros de fragmentação (MS/MS) foram interpretados com a ferramenta online Interactive Peptide Spectral Annotator (77).

2.6. Citotoxicidade em espermatozoides humanos

A avaliação de citotoxicidade do Antioxidin-I e PaT-2 foi realizada em espermatozoides frescos utilizando o ensaio de viabilidade baseado em luciferase - CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay, Promega®, um método sensível para medir a viabilidade celular através da quantificação bioluminescente de ATP, um indicador da integridade celular, em placa de 96 poços em triplicata técnica. As células foram mantidas em DMEM de alta glicose após o processamento seminal e adicionados 80 µL da suspensão (2×10^6 por poço) nos respectivos poços mais 20 µL de meio DMEM suplementado com o respectivo peptídeo ou não, na faixa de concentração 200 - 12,5 µM, seguido da incubação em estufa a 37 °C sem CO₂ por 1 hora. Posteriormente, as placas de 96 poços foram retiradas da estufa e adicionados 50 µL do reagente CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay em todos os poços e incubado por mais 30 minutos sob mesmas condições. A leitura foi realizada em luminômetro (SpectraMax® Plus 384 – Molecular Devices, EUA). Para o controle positivo e negativo de morte celular, foi utilizado Triton – X 100 a 0,5% e meio DMEM, respectivamente, sem adição de tratamento em ambos os controles.

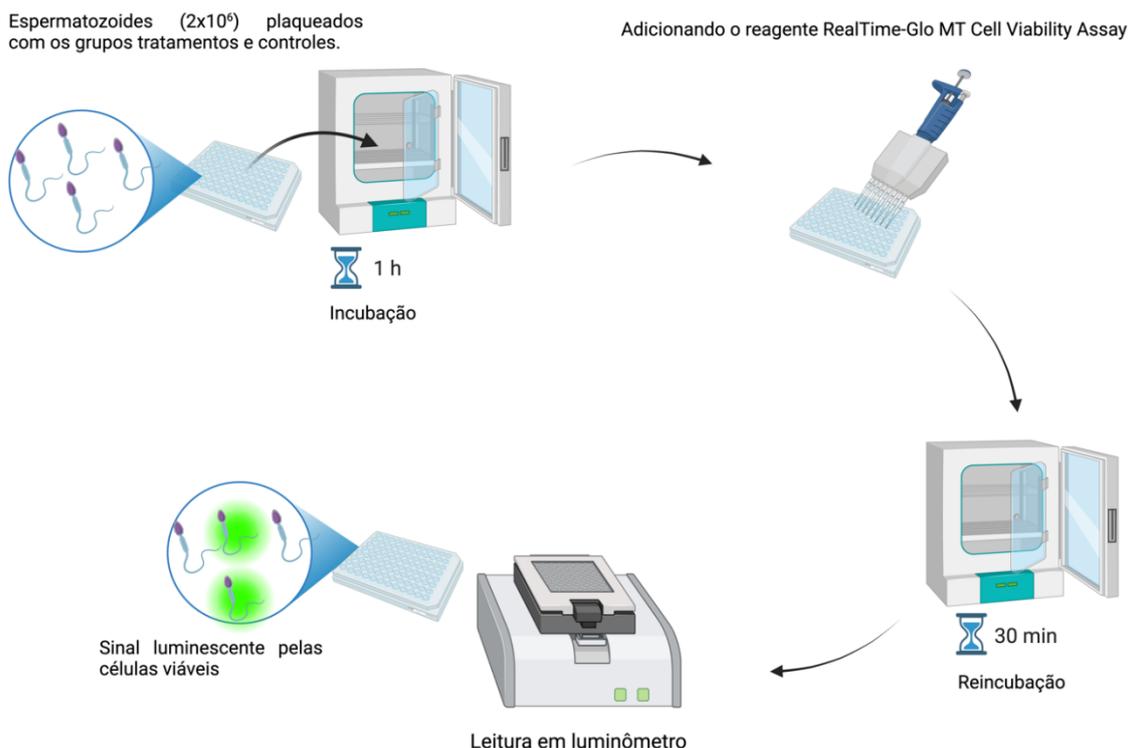


Figura 2 – Esquema ilustrativo da análise de citotoxicidade por luminescência.

2.7. Atividade antioxidante na motilidade espermática

Para avaliar o efeito da atividade antioxidante na motilidade pós-descongelamento, o congelamento foi realizado em triplicatas pelo método de congelamento rápido em vapor de nitrogênio com os grupos:

- Congelado: suspensão de células com crioprotetor TYB;
- Ant I – 200: suspensão de células com crioprotetor TYB suplementado com $200\mu\text{M}$ do peptídeo Antioxidin-I;
- Ant I – 100: suspensão de células com crioprotetor TYB suplementado com $100\mu\text{M}$ do peptídeo Antioxidin-I;
- PaT2 – 200: suspensão de células com crioprotetor TYB suplementado com $200\mu\text{M}$ do peptídeo PaT2;
- PaT2 – 100: suspensão de células com crioprotetor TYB suplementado com $100\mu\text{M}$ do peptídeo PaT2.

Após processamento seminal, 250 μ L do crioprotetor TYB, suplementado ou não, foi adicionado, gota a gota, a cada 30 segundos em 250 μ L de suspensão de células. Após diluição, o congelamento seguiu o protocolo anteriormente citado e o material permaneceu congelado por 7 dias em tanque de nitrogênio. No descongelamento, as triplicatas foram descongeladas por 20 minutos em temperatura ambiente e foram mantidas a 37 °C até avaliação da motilidade em câmara de Makler.

2.8. Atividade antioxidante na integridade do DNA espermático

Para avaliar o efeito da atividade antioxidante na integridade do DNA espermático pós-descongelamento, o congelamento foi realizado em triplicatas pelo método de congelamento rápido em vapor de nitrogênio com os grupos:

- Congelado: suspensão de células com crioprotetor TYB;
- Ant I – 200: suspensão de células com crioprotetor TYB suplementado com 200 μ M do peptídeo Antioxidin-I;
- Ant I – 100: suspensão de células com crioprotetor TYB suplementado com 100 μ M do peptídeo Antioxidin-I;
- PaT2 – 200: suspensão de células com crioprotetor TYB suplementado com 200 μ M do peptídeo PaT2;
- PaT2 – 100: suspensão de células com crioprotetor TYB suplementado com 100 μ M do peptídeo PaT2.

Após processamento seminal, 250 μ L do crioprotetor TYB, suplementado ou não, foi adicionado, gota a gota, a cada 30 segundos em 250 μ L de suspensão de células. Após diluição, o congelamento seguiu protocolo anteriormente citado e o material permaneceu congelado por 7 dias em tanque de nitrogênio. No descongelamento, as triplicatas foram descongeladas por 20 minutos em temperatura ambiente e foram mantidas a 37 °C até preparo das lâminas, conforme instruções do Kit comercial CanFrag – Candore®, baseado na dispersão da cromatina (SCD). Foram analisados 200 espermatozoides observando-se a presença ou ausência de halo (figura 3). Um valor abaixo de 25% de fragmentação do DNA espermático foi considerado normal.

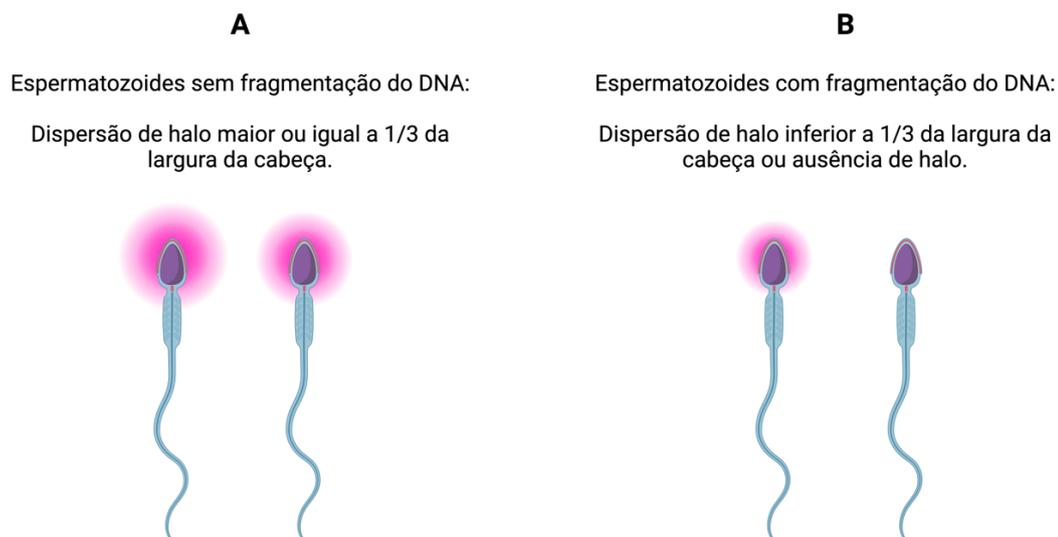


Figura 3 – Escala do grau de fragmentação do DNA espermático.

2.9. Análise estatística

Na análise estatística dos dados, foram empregadas as técnicas de análise de variância (ANOVA two-way e one-way), seguidas das comparações múltiplas de Bonferroni e análise do tamanho de efeito. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão, permitindo uma interpretação da variabilidade dos dados. As análises foram realizadas utilizando o software estatístico GraphPad Prims® versão 9.

3. Resultados e discussões

3.1. Espermograma

As análises das coletas seminais foram realizadas para garantir a conformidade das amostras antes da realização dos experimentos. Na tabela 3 foram listados os parâmetros seminais de todas as coletas realizadas. Na análise geral das coletas, apesar da correlação dos valores seminais do voluntário serem com os valores de referência da tabela 1, os parâmetros listados abaixo demonstram que o perfil de fertilidade do voluntário é superior (75th) ao percentil dos valores de referência (5th). Apesar da viscosidade seminal em todas as coletas do voluntário ser aumentada, todas as amostras foram utilizadas para o estudo devido o manual da OMS enfatizar que a alteração desse parâmetro não possui impacto clínico negativo nos parâmetros seminais.

Tabela 3 – Parâmetros seminais das coletas do voluntário

Análise seminal				
Avaliação macroscópica				
Coleta	Volume (ml)	pH	Aspecto	Viscosidade
1	5,9 mL	8,7	Branco opalescente	Aumentada
2	5 mL	8,7	Branco opalescente	Aumentada
3	5,8 mL	8,1	Branco opalescente	Aumentada
4	4,7 mL	8,3	Branco opalescente	Aumentada
Ref	>1,4 mL	> 7,2	*	Normal
Avaliação microscópica				
Coleta	Concentração	Progressiva	Não progressiva	Imóvel
1	100 milhões/mL	80%	11%	9%
2	127 milhões/mL	91%	4%	5%
3	98 milhões/mL	86%	4%	10%
4	115 milhões/mL	95%	2%	3%
Ref	>16 milhões/mL	>30%	*	*

*Sem valor de referência determinado.

3.2. Peptídeos antioxidantes

As purificações dos peptídeos Antioxidin-I e PaT-2 foram feitas com aproximadamente 80 mg solubilizados em 4 mL de água ultrapura para ambas as moléculas. Realizou-se 4 corridas de 1 mL com concentração de 20 mg/mL, com medidas de absorbâncias feitas em 216 e 280 nm. Nas figuras 4 e 5, é demonstrada a presença dos picos com elevada absorbância referentes aos peptídeos PaT-2 e Antioxidin-I, com os tempos de retenção de 25,642 e 26,229 minutos, respectivamente.

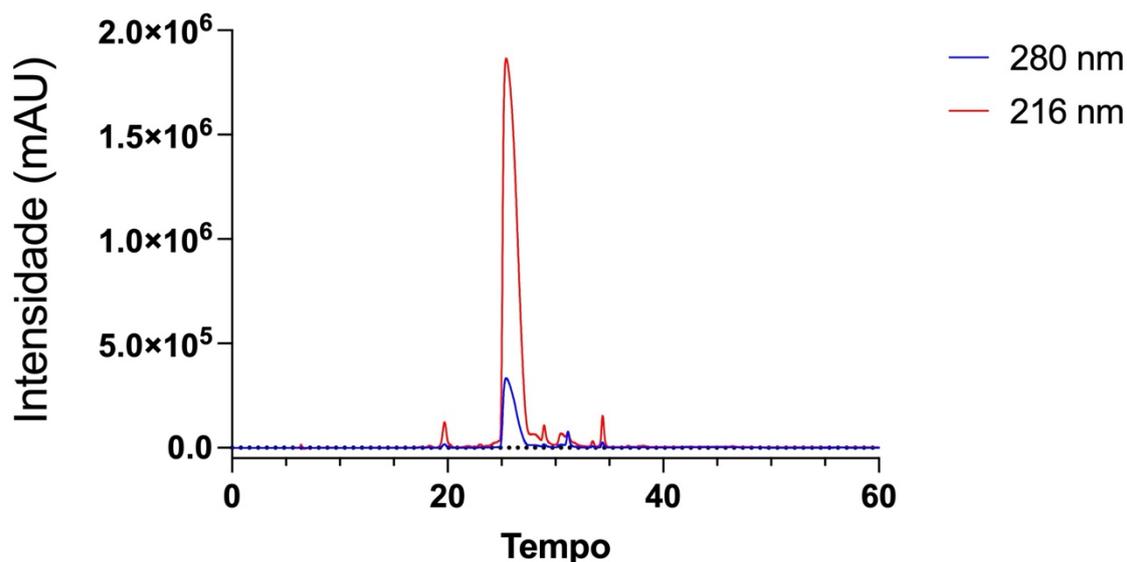


Figura 4 – Gráfico de RP-HPLC da purificação do PaT-2, com pico principal apresentando tempo de retenção de 25,642 minutos.

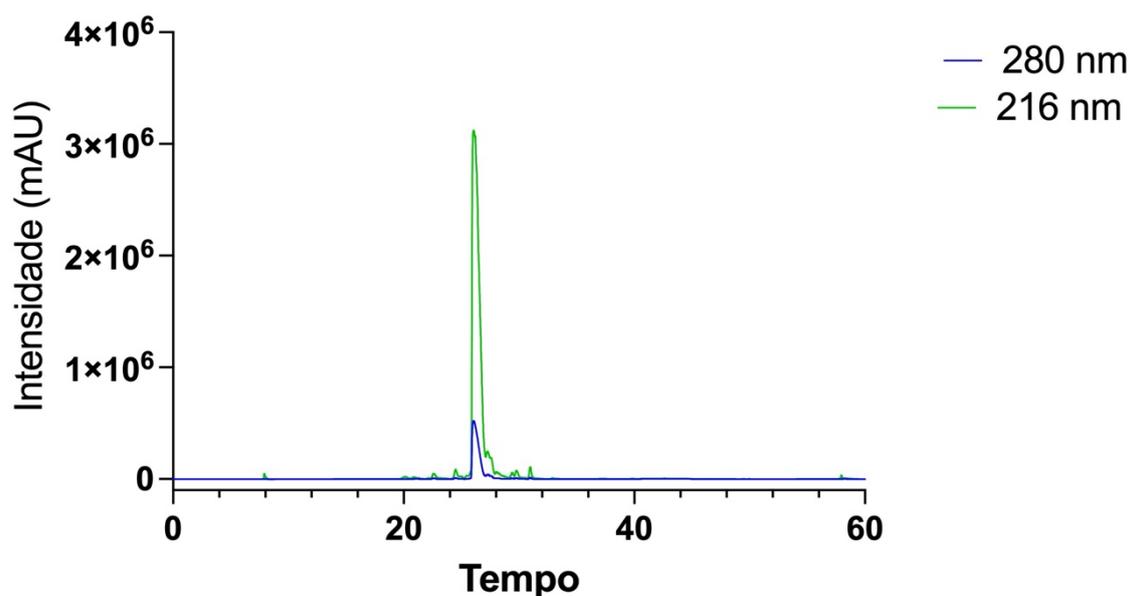


Figura 5 – Gráfico de RP-HPLC da purificação do Antioxidin-I, com pico principal apresentando tempo de retenção de 26,229 minutos.

As frações coletadas das cromatografias líquidas, representando os peptídeos PaT-2 e Antioxidin-I purificados, foram analisadas por espectrometria de massa utilizando um ESI Q-ToF (Triple ToF 5600+) para a confirmação do sucesso da síntese, através da elucidação das sequências FPPWL-NH2 (PaT-2) e TWYFITPYIPDK (Antioxidin-I), com massas teóricas de $[M+H]^{+2} = 658,3716$ Da e $[M+H]^{+2} = 1543,7832$ Da, respectivamente.

Para o PaT-2, a molécula foi identificada na presença de uma carga, apresentando massa experimental $[M+H]^{+2} = 658,3717$ Da juntamente com sua série isotópica, resultando em um erro de massa de apenas 0,152 ppm (figura 6 – espectro de massa). Similarmente, para o Antioxodin-I, o peptídeo foi identificado, porém na presença de duas cargas, apresentando massa experimental $[M+2H]^{+2} = 772,3958$ Da acompanhado de sua série isotópica, resultando em um erro de massa de 0,129 ppm (figura 7 – espectro do Antioxodin-I).

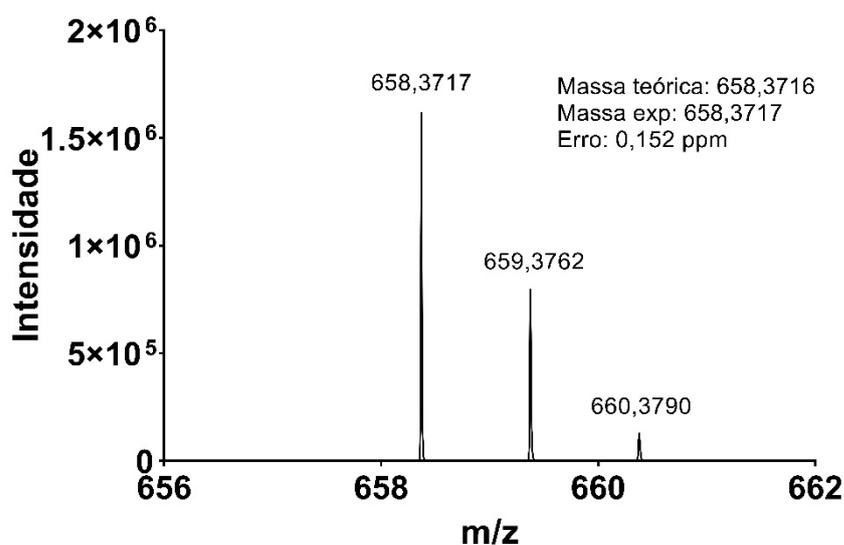


Figura 6 - Espectro de massa do PaT-2 $[M+H]^{+2} = 658,3716$ Da e sua série isotópica. A partir da massa teórica exata é possível calcular o erro de massa, com valor de 0,152 ppm.

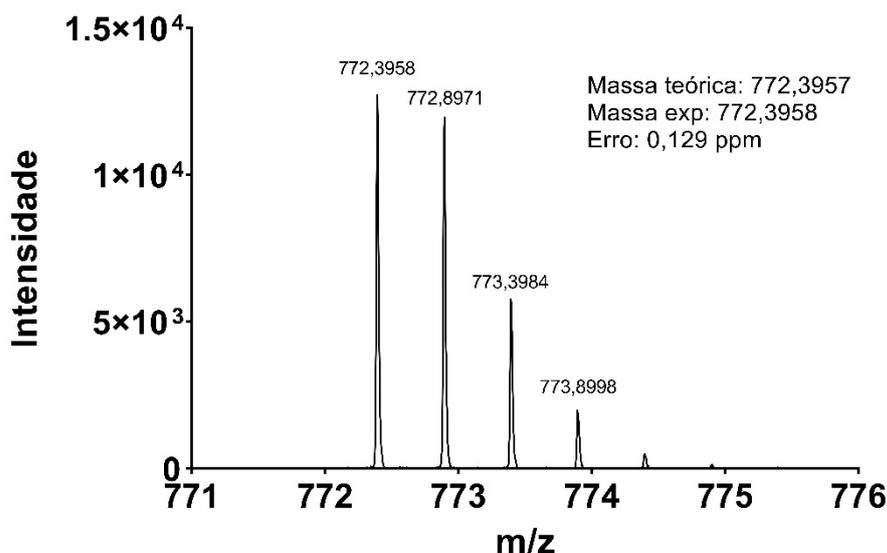


Figura 7 - Espectro de massa do Antioxidin-I com dupla carga $[M+2H]^{+2} = 772,3957$ Da e sua série isotópica. A partir da massa teórica exata é possível calcular o erro de massa, com valor de 0,129 ppm.

Nas figuras 8 e 9, estão representados os espectros de fragmentação de ambos os peptídeos, demonstrando picos referentes às quebras de todas as ligações através das principais séries de fragmentações de peptídeos. Dessa forma, os fragmentos encontrados permitem confirmar que as sequências foram sintetizadas com sucesso, na ordem correta.

O íon destinado à fragmentação foi selecionado automaticamente seguindo a pré-configuração do modo IDA (Information Dependent Acquisition). A análise revelou, predominantemente, fragmentos pertencentes às séries a, b e y, conforme indicados nas figuras, com os respectivos erros de massa em ppm para cada fragmento apresentados nos quadros abaixo dos espectros. Os dados obtidos foram processados utilizando a ferramenta online Interactive Peptide Spectral Annotator (77).

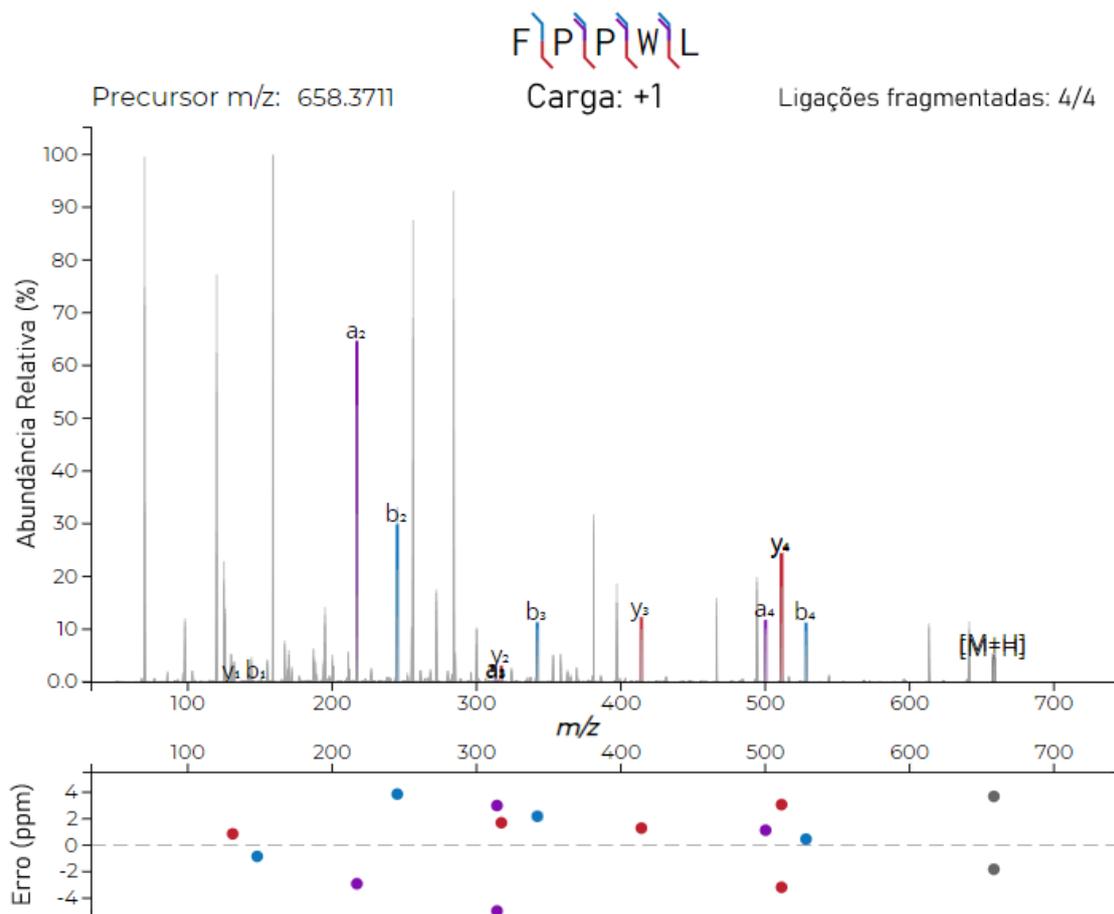


Figura 8 - Espectro de fragmentação (MS/MS) obtido em modo IDA do íon $[M+H]^+1$. Os fragmentos obtidos a partir das séries estão destacados em roxo (série a), azul (série b) e vermelho (série y).

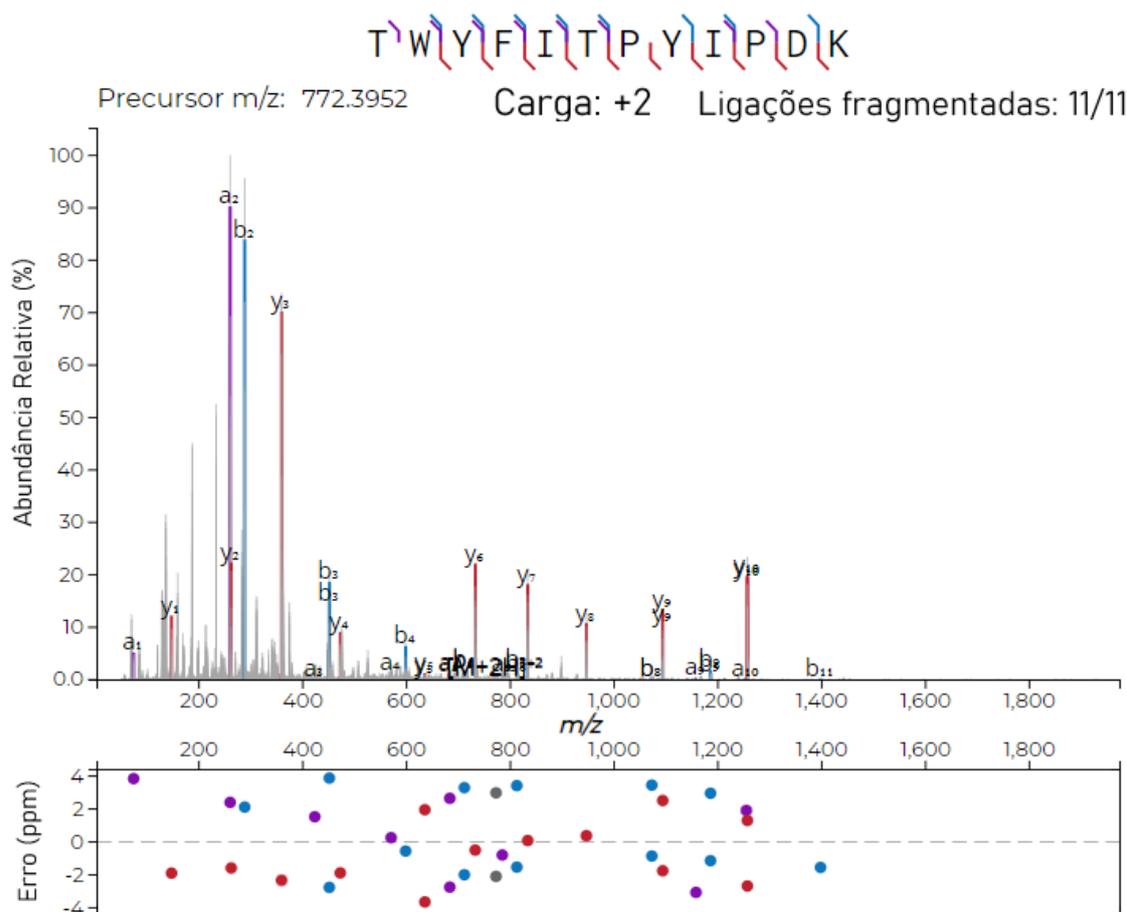


Figura 9 - Espectro de fragmentação (MS/MS) obtido em modo IDA do íon $[M+2H]^{+2}$. Os fragmentos obtidos a partir das séries estão destacados em roxo (série a), azul (série b) e vermelho (série y).

3.3. Citotoxicidade em espermatozoides humanos

Na avaliação da citotoxicidade, o ensaio de bioluminescência revelou que a faixa de concentração testada em ambos os peptídeos (200 – 12,5 μ M) não demonstrou redução significativa da viabilidade se comparada ao grupo DMEM (figura 10 A/B), demonstrando a ausência de citotoxicidade dos peptídeos, nas referidas concentrações, em espermatozoides humanos frescos. Essa biocompatibilidade possui uma relevância biológica atrativa, uma vez que esses peptídeos podem ser uma alternativa biotecnológica para aprimoramento da criopreservação de espermatozoides através da formulação de meios crioprotetores suplementados com essas moléculas bioativas.

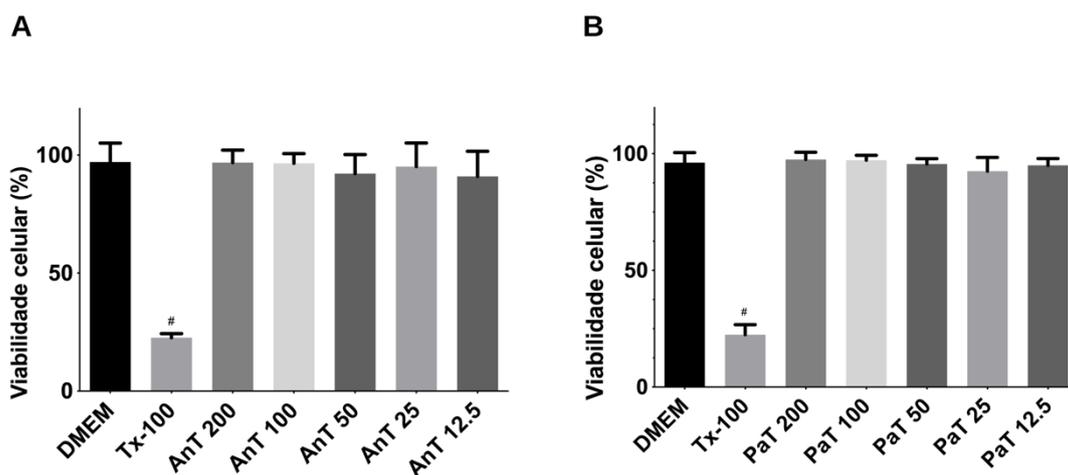


Figura 10 - Citotoxicidade dos peptídeos Antioxidin-I (A) e PaT-2 (B) em espermatozoides frescos. Grupos: DMEM (espermatozoides em meio DMEM); Tx-100 (espermatozoides com Triton – X100 a 0,5%); AnT 200 - 12,5 (espermatozoides em meio DMEM suplementado com Antioxidin-I nas respectivas concentrações) e PaT 200 – 12,5 (espermatozoides em meio DMEM suplementado com PaT-2 nas respectivas concentrações). # Diferença estatística significativa comparado com DMEM ($p < 0,0001$).

3.4. Atividade antioxidante na motilidade espermática

Na avaliação da motilidade pós-descongelamento, o Antioxidin-I demonstrou resultados significativos nos valores de motilidade progressiva (figura 11). O peptídeo, em suas maiores concentrações já validadas em estudos anteriores pela intensa atividade antioxidante, preservou motilidade progressiva significativamente (70). Em específico, destaca-se o nível da motilidade progressiva do grupo com 200 μM de Antioxidin-I semelhante ao grupo fresco e o efeito superior na preservação motilidade progressiva comparado ao grupo com 100 μM do mesmo peptídeo com diferença estatística significativa ($p < 0,0001$). O peptídeo PaT-2, em ambas as concentrações, não demonstrou atividade satisfatória na recuperação da motilidade progressiva pós descongelamento (figura 11).

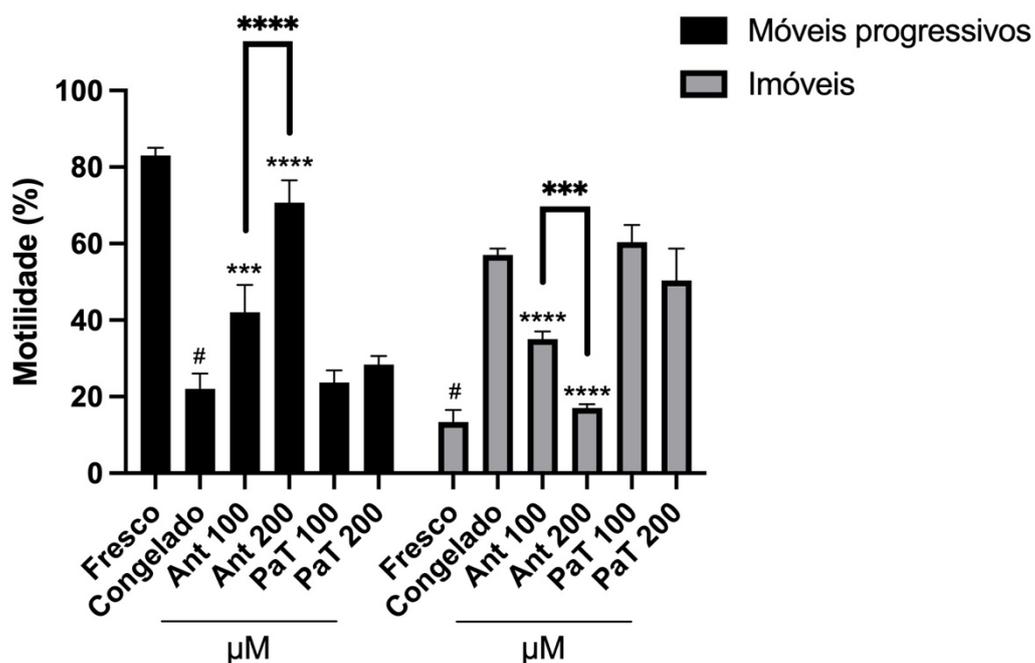


Figura 11- Avaliação de peptídeos antioxidantes na motilidade espermática pós-descongelamento. Grupos: fresco (amostra processada sem tratamento); congelado (amostra processada e congelada sem tratamento); AnT 200 – 100 (amostra processada e congelada com tratamento com as respectivas concentrações de Antioxidin-I) e PaT 200 – 100 (amostra processada e congelada com tratamento com as respectivas concentrações de PaT-2). Diferença estatística significativa: **** (p<0000,1) e *** (p<000,1) entre grupos; # (p<0000,1) comparado ao grupo fresco

Esses resultados corroboram com a literatura científica, demonstrando que moléculas antioxidantes são capazes de preservar a motilidade progressiva através do equilíbrio redox (5, 18, 19, 22, 27, 29). Isso porque o estresse oxidativo, oriundo da superprodução de radicais livres, subprodutos da via oxidativa mitocondrial, se intensifica durante a criopreservação (35, 36). E, como a mitocôndria tem relação direta com a motilidade devido à geração de energia, alternativas antioxidantes capazes de neutralizar esses radicais podem evitar danos celulares na organela e preservar seu correto funcionamento (78).

Diante da atividade antioxidante na preservação da motilidade, aliada à biocompatibilidade desse peptídeo (Antioxidin-I) em espermatozoides humanos, a suplementação dessa molécula revela um potencial biotecnológico promissor como alternativa na criopreservação de sêmen com perfil normozoospermico. Mas não apenas limitado a ele, pois amostras astenozoospermica, que recuperam valores extremamente reduzidos ou inexistentes de espermatozoides móveis pós-descongelamento, podem se beneficiar desse efeito na motilidade, devido à expressão de proteínas NOX5 e à via de

sinalização antioxidante Keap1-Nrf2, fatores interligados ao estresse oxidativo, estarem reduzidas nesse perfil seminal menos criotolerante (50, 51, 68). A suplementação antioxidante exógena pode trazer possíveis resultados satisfatórios nesses casos de desequilíbrio redox através do mecanismo supracitado. Não se limitando a amostras criopreservadas, a suplementação do Antioxidin-I pode ser útil em amostras frescas com motilidade reduzida, auxiliando as técnicas de reprodução humana assistida nos resultados clínicos, uma vez que a motilidade é um fator preditor na fertilidade masculina e um aspecto crucial no processo de escolha dos espermatozoides para a injeção intracitoplasmática de espermatozoide – ICSI na tentativa de aumentar as chances de sucesso do tratamento (39, 40).

A preservação significativa da motilidade progressiva com Antioxidin-I sugere um efeito protetor robusto contra os danos oxidativos associados à criopreservação. Essa proteção pode ser atribuída à capacidade do peptídeo de neutralizar radicais livres e estabilizar a função mitocondrial. Além disso, a ausência de um efeito similar no peptídeo PaT-2 pode indicar diferenças no mecanismo de ação antioxidante entre os compostos.

3.5. Atividade antioxidante na integridade do DNA espermático

Os dados mostram que, embora ambos os peptídeos tenham reduzido a fragmentação do DNA em relação ao grupo congelado, essa redução não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$), conforme figura 12A. Isso pode sugerir que, ao contrário da motilidade, a integridade do DNA pode depender de fatores adicionais além do equilíbrio redox, bem como a estabilidade da cromatina espermática, a eficiência do sistema de reparo celular pós-descongelamento e outros mecanismos celulares ainda desconhecidos (79). Estudos prévios indicam que o estresse oxidativo é um fator chave na fragmentação do DNA (5, 17, 21, 25, 26, 28, 29), mas sua modulação pode não ser o suficiente para reverter completamente o dano induzido pela criopreservação.

Diante a limitação técnica do número de participante no estudo experimental ($n = 1$) e como esse número amostral (pequeno) possui um viés na análise estatística do valor de p , realizou-se análise do tamanho de efeito entre os grupos para observar a magnitude da intervenção. Segundo Cohen et al (1988), a interpretação sobre o tamanho de efeito deve se feita através da luz da literatura de pesquisas relevantes, mas, seguindo a seguinte diretriz: $d = 0,20$ (efeito pequeno), $d = 0,50$ (efeito médio) e $d = 0,80$ (efeito grande) (80).

Os resultados da comparação do tamanho de efeito entre os grupos (congelado vs AnT 100 = 0,88; congelado vs AnT 200 = 0,56; congelado vs PaT-2 100 = 0,66 e congelado vs PaT 2 100 = 0,60) demonstraram que, apesar do valor de p não ser significativo (Figura 12A), a magnitude do efeito da intervenção antioxidante na preservação do DNA espermático foi de média a grande para ambos os peptídeos testados (Antioxidin-I e PaT-2), conforme a diretriz supracitada. Isso demonstra que o efeito antioxidante impactou positivamente e, além disto, sugere que com o aumento populacional do estudo, o valor de p possa atingir valores de diferença estatística significativa.

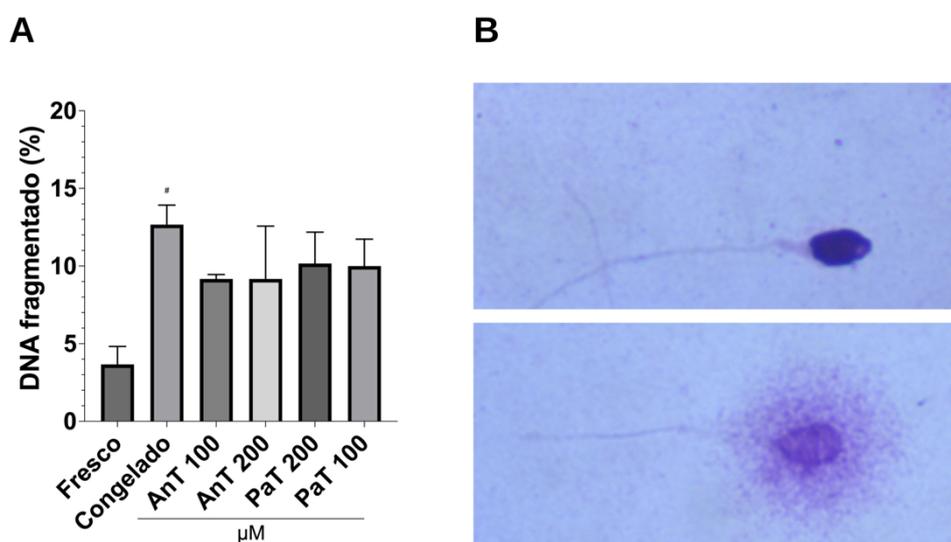


Figura 12 – (A) Avaliação de peptídeos antioxidantes na integridade do DNA pós-descongelamento. Grupos: fresco (amostra processada sem tratamento); congelado (amostra processada e congelada sem tratamento); AnT 200 – 100 (amostra processada e congelada com tratamento com as respectivas concentrações de Antioxidin-I) e PaT 200 – 100 (amostra processada e congelada com tratamento com as respectivas concentrações de PaT-2). (B) Espermatozoides analisados por microscopia de luz, evidenciando células com DNA fragmentado (sem halo ao redor da cabeça) e células íntegras (com halo ao redor da cabeça). Diferença estatística significativa: # ($p < 0000,1$) comparado ao grupo fresco.

Outras análises a partir desse resultado, comparado aos resultados vistos em outros estudos da literatura, é o valor de fragmentação do grupo congelado sem tratamento. Em estudos que compararam grupo congelado sem tratamento com grupo congelado com tratamento, listados no capítulo I, mais de 70% mostraram que os níveis de fragmentação do DNA no grupo congelado sem tratamento ultrapassaram 25% de fragmentação. Esse valor médio é amplamente utilizado como valor de corte,

diferenciando homens inférteis (>25% de fragmentação) de férteis (fragmentação <25%) (60). Entretanto, apesar da individualidade dos ejaculados utilizados nos estudos da literatura e nesta pesquisa experimental, todos possuem um perfil normozoospermico definido com maior capacidade de criotolerância. Entretanto, o nível de fragmentação do voluntário da pesquisa não ultrapassou os 15% de fragmentação no grupo congelado sem tratamento. Diante disso, podemos discutir que, apesar de todas as amostras possuírem um padrão seminal normozoospermico, o perfil de criotolerância pode ser diferente conforme o enquadramento dos pacientes nos diferentes percentis (tabela 2). Sendo assim, valores globais para avaliação de forma não individualizada podem ser um fator limitante na compreensão sobre infertilidade.

4. Conclusão

Este estudo experimental demonstrou um interessante potencial biotecnológico do peptídeo Antioxidin-I na preservação da motilidade progressiva de espermatozoides humanos após criopreservação com biocompatibilidade satisfatória, demonstrando segurança e eficácia na suplementação antioxidante.

O Antioxidin-I demonstrou um promissor efeito na preservação da motilidade espermática, com potencial aplicação na criopreservação de sêmen humano em bancos de sêmen e em tratamento de fertilização in vitro como ICSI, inseminação artificial e fertilização in vitro clássica. Essa abordagem pode beneficiar pacientes com amostras nosmozoospermicas e, possivelmente, aqueles com astenozoospermia, ao melhorar a recuperação da motilidade, seja em amostras congeladas ou frescas.

Estudos adicionais devem explorar combinações de Antioxidin-I com outros antioxidantes ou crioprotetores, buscando aprimorar a preservação da integridade do DNA espermático. Além disso, a avaliação de sua aplicabilidade em diferentes perfis seminais e maior número de voluntários pode ampliar sua relevância clínica.

A heterogeneidade das respostas entre os grupos tratados indica a necessidade de estratégias individualizadas na suplementação antioxidante. O perfil seminal do paciente pode influenciar diretamente a eficácia desses compostos, sugerindo que protocolos personalizados de criopreservação poderiam otimizar os resultados pós-descongelamento.

Referências

1. Chavoshi Nezhad N, Vahabzadeh Z, Allahveisie A, Rahmani K, Raoofi A, Rezaie MJ, et al. The Effect of L-Carnitine and Coenzyme Q10 on the Sperm Motility, DNA Fragmentation, Chromatin Structure and Oxygen Free Radicals During, before and after Freezing in Oligospermia Men. *Urol J.* 2021;18(3):330-6.
2. Li L, Liao H, Li M, Xiao J, Wu L. Comparative Clinical Study of Percutaneous Epididymal Sperm Aspiration and Testicular Biopsy in the Outcome of ICSI-Assisted Fertility Treatment in Patients with Obstructive Azoospermia. *Front Surg.* 2022;9:901601.
3. Ausavarungnirun C, Orwig KE. REPRODUCTIVE HEALTH IN TRANS AND GENDER-DIVERSE PATIENTS: Gonadal tissue cryopreservation in transgender and gender-diverse people. *Reproduction.* 2024;168(6).
4. Safian F, Ghaffari Novin M, Nazarian H, Shams Mofarahe Z, Abdollahifar M-A, Jajarmi V, et al. Photobiomodulation preconditioned human semen protects sperm cells against detrimental effects of cryopreservation. *Cryobiology.* 2021;98:239-44.
5. Fu L, Ma J, Chen L, Guo Y, Li W, Zhang X, et al. Enhancement of Frozen-Thawed Human Sperm Quality with Zinc as a Cryoprotective Additive. *Med Sci Monit.* 2024;30:e942946.
6. Hungerford AJ, Bakos HW, Aitken RJ. Addition of Vitamin C Mitigates the Loss of Antioxidant Capacity, Vitality and DNA Integrity in Cryopreserved Human Semen Samples. *Antioxidants (Basel).* 2024;13(2).
7. Tachibana R, Takeuchi H, Yoshikawa-Terada K, Maezawa T, Nishioka M, Takayama E, et al. Carboxylated Poly-L-lysine Potentially Reduces Human Sperm DNA Fragmentation after Freeze-Thawing, and Its Function Is Enhanced by Low-Dose Resveratrol. *Cells.* 2023;12(22).
8. Ponchia R, Bruno A, Renzi A, Landi C, Shaba E, Luongo FP, et al. Oxidative Stress Measurement in Frozen/Thawed Human Sperm: The Protective Role of an In Vitro Treatment with Myo-Inositol. *Antioxidants (Basel).* 2021;11(1).
9. McCarter K, Setton R, Chung A, An A, Rosenwaks Z, Spandorfer S. Comparison of fresh and frozen ejaculated spermatozoa in sibling oocyte recipient cycles. *Reprod Biomed Online.* 2022;44(2):333-9.
10. Torra-Massana M, Vassena R, Rodríguez A. Sperm cryopreservation does not affect live birth rate in normozoospermic men: analysis of 7969 oocyte donation cycles. *Hum Reprod.* 2023;38(3):400-7.
11. Delgado-Bermúdez A, Noto F, Bonilla-Correal S, Garcia-Bonavila E, Catalán J, Papas M, et al. Cryotolerance of Stallion Spermatozoa Relies on Aquaglyceroporins rather than Orthodox Aquaporins. *Biology (Basel).* 2019;8(4).
12. Peña FJ, Gibb Z. OXIDATIVE STRESS AND REPRODUCTIVE FUNCTION: Oxidative stress and the long-term storage of horse spermatozoa. *Reproduction.* 2022;164(6):F135-F44.
13. Migdal C, Serres M. [Reactive oxygen species and oxidative stress]. *Med Sci (Paris).* 2011;27(4):405-12.
14. Berby B, Bichara C, Rives-Feraille A, Jumeau F, Pizio PD, Sétif V, et al. Oxidative Stress Is Associated with Telomere Interaction Impairment and Chromatin Condensation Defects in Spermatozoa of Infertile Males. *Antioxidants (Basel).* 2021;10(4).
15. Aitken RJ, De Iuliis GN, Finnie JM, Hedges A, McLachlan RI. Analysis of the relationships between oxidative stress, DNA damage and sperm vitality in a patient population: development of diagnostic criteria. *Hum Reprod.* 2010;25(10):2415-26.
16. Pagani R, Kovaleski J, Resende L. Avanços na composição da Methodi Ordinatio para revisão sistemática de literatura. *Ciência da Informação.* 2018;46.

17. Santonastaso M, Mottola F, Iovine C, Colacurci N, Rocco L. Protective Effects of Curcumin on the Outcome of Cryopreservation in Human Sperm. *Reprod Sci.* 2021;28(10):2895-905.
18. Ponchia R, Bruno A, Renzi A, Landi C, Shaba E, Luongo FP, et al. Oxidative stress measurement in frozen/thawed human sperm: The protective role of an in vitro treatment with myo-inositol. *Antioxidants.* 2022;11(1).
19. Aghaz F, Khazaei M, Vaisi-Raygani A, Bakhtiyari M. Cryoprotective effect of sericin supplementation in freezing and thawing media on the outcome of cryopreservation in human sperm. *Aging Male.* 2021;23(5):469-76.
20. Shi H, Li QY, Li H, Wang HY, Fan CX, Dong QY, et al. ROS-induced oxidative stress is a major contributor to sperm cryoinjury. *Human Reproduction.* 2024;39(2):310-25.
21. Mahdavinezhad F, Gilani MAS, Gharaei R, Ashrafnezhad Z, Valipour J, Nashtaei MS, et al. Protective roles of seminal plasma exosomes and microvesicles during human sperm cryopreservation. *Reproductive BioMedicine Online.* 2022;45(2):341-53.
22. valipour J, nashtaei MS, khosravizadeh Z, mahdavinezhad F, nekoonam S, esfandyari S, et al. Effect of sulforaphane on apoptosis, reactive oxygen species and lipids peroxidation of human sperm during cryopreservation. *Cryobiology.* 2021;99:122-30.
23. Moradi B, Faramarzi A, Ghasemi-Esmailabad S, Aghaz F, Hashemian AH, Khazaei M. L-proline as a novel additive to cryopreservation media improved post-thaw quality of human spermatozoon via reducing oxidative stress. *Andrologia.* 2022;54(1).
24. Baharsaadi M, Hezavehei M, Shahverdi A, Halvaei I. Evaluation of the effects of hydroxytyrosol on human sperm parameters during cryopreservation. *Cryobiology.* 2024;114:104840.
25. Salehi E, Shadboorestan A, Mohammadi-Bardbori A, Mousavi A, Kargar-Abargouei E, Sarkoohi P, et al. Effect of crocin and quercetin supplementation in cryopreservation medium on post-thaw human sperm quality. *Cell Tissue Bank.* 2024;25(2):531-40.
26. Moradi Gardeshi T, Shahandeh E, Tavakolpoor Saleh N, Karami S, Mirzaei Azandaryani Z, Mazaheri F, et al. Evaluation of the effect of mitoquinone on functional parameters, DNA structure, and genes expression related to the apoptotic and antioxidants of human sperm after freezing-thawing. *Molecular Biology Reports.* 2024;51(1).
27. Hassoon Ali K, Ibrahim Yahiya Y, Almajidi YQ, Al-Musawi MH, Hajipour H, Moradian SA, et al. Protective effects of canthaxanthin-loaded seminal exosomes on the quality of human spermatozoa during cryopreservation. *Journal of Drug Delivery Science and Technology.* 2024;96:105696.
28. Jannatifar R, Piroozmanesh H, Sahraei SS, Verdi A, Asa E. The evaluation effect of nanoliposome-loaded Mito-Tempo on sperm parameters during human sperm cryopreservation. *J Assisted Reprod Genet.* 2024;41(8):2053-63.
29. Mohammadi-Bardbori A, Shadboorestan A, Salehi E, Rahimi MA, Kargar-Abarghouei E, Amidi F, et al. Protective Effects of Astaxanthin on Post-Thaw Sperm Quality in Normozoospermic Men. *Andrologia.* 2024;2024.
30. Ranganathan P, Sridharan TB, Babujanarthanam R, Madhan Kumar P, Ganesamoorthy R, Thirugnanasambandham K. Cinnamon-mediated nano emulsion and its cryogenic activity on ROS-affected human sperm-A short study. *Toxicol Rep.* 2024;13:101714.
31. Najafi A, Asadi E, Moawad AR, Mikaeili S, Amidi F, Adutwum E, et al. Supplementation of freezing and thawing media with brain-derived neurotrophic factor protects human sperm from freeze-thaw-induced damage. *Fertil Steril.* 2016;106(7):1658-65.e4.

32. Paoli D, Pelloni M, Lenzi A, Lombardo F. Cryopreservation of Sperm: Effects on Chromatin and Strategies to Prevent Them. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1166:149-67.
33. Kumar A, Prasad JK, Srivastava N, Ghosh SK. Strategies to Minimize Various Stress-Related Freeze-Thaw Damages During Conventional Cryopreservation of Mammalian Spermatozoa. *Biopreserv Biobank.* 2019;17(6):603-12.
34. Aitken RJ, Drevet JR. The Importance of Oxidative Stress in Determining the Functionality of Mammalian Spermatozoa: A Two-Edged Sword. *Antioxidants* [Internet]. 2020; 9(2).
35. Plotnikov EY, Zorov DB. Pros and Cons of Use of Mitochondria-Targeted Antioxidants. *Antioxidants (Basel).* 2019;8(8).
36. Gualtieri R, Kalthur G, Barbato V, Di Nardo M, Adiga SK, Talevi R. Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress Caused by Cryopreservation in Reproductive Cells. *Antioxidants* [Internet]. 2021; 10(3).
37. Said TM, Gaglani A, Agarwal A. Implication of apoptosis in sperm cryoinjury. *Reproductive BioMedicine Online.* 2010;21(4):456-62.
38. Degl'Innocenti S, Filimberti E, Magini A, Krausz C, Lombardi G, Fino MG, et al. Semen cryopreservation for men banking for oligospermia, cancers, and other pathologies: prediction of post-thaw outcome using basal semen quality. *Fertility and Sterility.* 2013;100(6):1555-63.e3.
39. Harada Y, Fukunaga E, Shiba R, Ikeda M, Okano S, Kinutani M. P-022 Relationship between sperm movement characteristics assessed by a sperm motility analysis system (SMAS) and normal fertilization rates in vitro. *Human Reproduction.* 2022;37(Supplement_1):deac107.021.
40. Sifer C, Sasportes T, Barraud V, Poncelet C, Rudant J, Porcher R, et al. World Health Organization grade 'a' motility and zona-binding test accurately predict IVF outcome for mild male factor and unexplained infertilities. *Human Reproduction.* 2005;20(10):2769-75.
41. Huang C, Lei L, Wu H-L, Gan R-X, Yuan X-B, Fan L-Q, et al. Long-term cryostorage of semen in a human sperm bank does not affect clinical outcomes. *Fertility and Sterility.* 2019;112(4):663-9.e1.
42. De Vita B, Monteiro GA, Melo-Oña C, Maziero R, Carmo MT, Alvarenga M, et al. Influência de diferentes sistemas e curvas de congelamento na congelabilidade e fertilidade do sêmen equino. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.* 2019;71:770-6.
43. Cavalcante MB, Duarte ABG, Araújo DOD, Teles EPdB. Criopreservação de sêmen humano: comparação entre métodos de congelamento e tipos de envase. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia.* 2006;28.
44. Agha-Rahimi A, Khalili MA, Nabi A, Ashourzadeh S. Vitrification is not superior to rapid freezing of normozoospermic spermatozoa: effects on sperm parameters, DNA fragmentation and hyaluronan binding. *Reproductive BioMedicine Online.* 2014;28(3):352-8.
45. Patel K, Sharma N, Mishra V, Aggarwal R, Suthar A, Sheth H. P-109 Comparison between the outcome of sperm vitrification protocol and conventional slow freezing protocol for semen cryopreservation. *Human Reproduction.* 2021;36(Supplement_1):deab130.08.
46. Aizpurua J, Medrano L, Enciso M, Sarasa J, Romero A, Fernández MA, et al. New permeable cryoprotectant-free vitrification method for native human sperm. *Human Reproduction.* 2017;32(10):2007-15.
47. Li Y-x, Zhou L, Lv M-q, Ge P, Liu Y-c, Zhou D-x. Vitrification and conventional freezing methods in sperm cryopreservation: A systematic review and meta-analysis.

- European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology. 2019;233:84-92.
48. Tamburrino L, Traini G, Marcellini A, Vignozzi L, Baldi E, Marchiani S. Cryopreservation of Human Spermatozoa: Functional, Molecular and Clinical Aspects. *Int J Mol Sci.* 2023;24(5).
 49. Berean DI, Bogdan LM, Cimpean R. Advancements in Understanding and Enhancing Antioxidant-Mediated Sperm Cryopreservation in Small Ruminants: Challenges and Perspectives. *Antioxidants [Internet].* 2024; 13(6).
 50. Moretti E, Signorini C, Corsaro R, Giamalidi M, Collodel G. Human Sperm as an In Vitro Model to Assess the Efficacy of Antioxidant Supplements during Sperm Handling: A Narrative Review. *Antioxidants [Internet].* 2023; 12(5).
 51. Cardenas-Padilla AJ, Jimenez-Trejo F, Cerbon M, Medrano A. The Role of Melatonin on Caprine (*Capra hircus*) Sperm Freezability: A Review. *Antioxidants [Internet].* 2024; 13(12).
 52. Signorini C, Saso L, Ghareghomi S, Telkoparan-Akillilar P, Collodel G, Moretti E. Redox Homeostasis and Nrf2-Regulated Mechanisms Are Relevant to Male Infertility. *Antioxidants (Basel).* 2024;13(2).
 53. Zhou Q, Wu X, Liu Y, Wang X, Ling X, Ge H, et al. Curcumin improves asthenozoospermia by inhibiting reactive oxygen species reproduction through nuclear factor erythroid 2-related factor 2 activation. *Andrologia.* 2020;52(2):e13491.
 54. Han P, Wang X, Zhou T, Cheng J, Wang C, Sun F, et al. Inhibition of ferroptosis attenuates oligospermia in male Nrf2 knockout mice. *Free Radic Biol Med.* 2022;193(Pt 1):421-9.
 55. Chiba LN, Monteiro Barduchi AC, Rodrigues M, Faquineti H, Pariz JR, Hallak J. AN UPDATE IN SPERM CRYOPRESERVATION: DETERMINATION OF MELATONIN CONCENTRATION USED AS ANTIOXIDANT AGENT IN PRE-FREEZING SAMPLES. *Fertility and Sterility.* 2020;114(3):e185.
 56. Bahmyari R, Zare M, Sharma R, Agarwal A, Halvaei I. The efficacy of antioxidants in sperm parameters and production of reactive oxygen species levels during the freeze-thaw process: A systematic review and meta-analysis. *Andrologia.* 2020;52(3):e13514.
 57. Kotdawala AP, Kumar S, Salian SR, Thankachan P, Govindraj K, Kumar P, et al. Addition of zinc to human ejaculate prior to cryopreservation prevents freeze-thaw-induced DNA damage and preserves sperm function. *J Assist Reprod Genet.* 2012;29(12):1447-53.
 58. Kopeika J, Thornhill A, Khalaf Y. The effect of cryopreservation on the genome of gametes and embryos: principles of cryobiology and critical appraisal of the evidence. *Human Reproduction Update.* 2015;21(2):209-27.
 59. Andrabi SW, Ara A, Saharan A, Jaffar M, Gugnani N, Esteves SC. Sperm DNA Fragmentation: causes, evaluation and management in male infertility. *JBRA Assist Reprod.* 2024;28(2):306-19.
 60. Esteves SC, Santi D, Simoni M. An update on clinical and surgical interventions to reduce sperm DNA fragmentation in infertile men. *Andrology.* 2020;8(1):53-81.
 61. Luo QX, Liao YB, Huang CP, Guo JH, Liang XD. [Correlation of sperm DNA fragmentation index with age and semen parameters and its influence on the outcomes of IVF-ET]. *Zhonghua Nan Ke Xue.* 2020;26(8):708-12.
 62. Esteves SC, Sánchez-Martín F, Sánchez-Martín P, Schneider DT, Gosálvez J. Comparison of reproductive outcome in oligozoospermic men with high sperm DNA fragmentation undergoing intracytoplasmic sperm injection with ejaculated and testicular sperm. *Fertil Steril.* 2015;104(6):1398-405.

63. Li F, Duan X, Li M, Ma X. Sperm DNA fragmentation index affect pregnancy outcomes and offspring safety in assisted reproductive technology. *Sci Rep.* 2024;14(1):356.
64. Ribas-Maynou J, Yeste M, Becerra-Tomás N, Aston KI, James ER, Salas-Huetos A. Clinical implications of sperm DNA damage in IVF and ICSI: updated systematic review and meta-analysis. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 2021;96(4):1284-300.
65. Wang S, Tan W, Huang Y, Mao X, Li Z, Zhang X, et al. Sperm DNA fragmentation measured by sperm chromatin dispersion impacts morphokinetic parameters, fertilization rate and blastocyst quality in ICSI treatments. *Zygote.* 2022;30(1):72-9.
66. Robinson L, Gallos ID, Conner SJ, Rajkhowa M, Miller D, Lewis S, et al. The effect of sperm DNA fragmentation on miscarriage rates: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod.* 2012;27(10):2908-17.
67. WHO WHO-. WHO laboratory manuel for the examination and processing of human semen2021. 276 p.
68. Suo J, Wang J, Zheng Y, Xiao F, Li R, Huang F, et al. Recent advances in cryotolerance biomarkers for semen preservation in frozen form-A systematic review. *PLoS One.* 2024;19(5):e0303567.
69. Vatannejad A, Tavilani H, Sadeghi MR, Karimi M, Lakpour N, Amanpour S, et al. Evaluation of the NOX5 protein expression and oxidative stress in sperm from asthenozoospermic men compared to normozoospermic men. *J Endocrinol Invest.* 2019;42(10):1181-9.
70. Deng W, Chen Y, Sun X, Wang L. AODB: A comprehensive database for antioxidants including small molecules, peptides and proteins. *Food Chemistry.* 2023;418:135992.
71. Barbosa EA, Oliveira A, Plácido A, Socodato R, Portugal CC, Mafud AC, et al. Structure and function of a novel antioxidant peptide from the skin of tropical frogs. *Free Radical Biology and Medicine.* 2018;115:68-79.
72. Barbosa EA, Plácido A, Moreira DC, Albuquerque L, Dematei A, Silva-Carvalho A, et al. The peptide secreted at the water to land transition in a model amphibian has antioxidant effects. *Proc Biol Sci.* 2021;288(1962):20211531.
73. Albani E, Castellano S, Gurrieri B, Arruzzolo L, Negri L, Borroni EM, et al. Male age: negative impact on sperm DNA fragmentation. *Aging (Albany NY).* 2019;11(9):2749-61.
74. Andersen E, Juhl CR, Kjølner ET, Lundgren JR, Janus C, Dehestani Y, et al. Sperm count is increased by diet-induced weight loss and maintained by exercise or GLP-1 analogue treatment: a randomized controlled trial. *Hum Reprod.* 2022;37(7):1414-22.
75. Sermondade N, Faure C, Fezeu L, Shayeb AG, Bonde JP, Jensen TK, et al. BMI in relation to sperm count: an updated systematic review and collaborative meta-analysis. *Hum Reprod Update.* 2013;19(3):221-31.
76. Chan W, White P. *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*: Oxford University Press; 1999. Available from: <https://doi.org/10.1093/oso/9780199637256.001.0001>.
77. Brademan DR, Riley NM, Kwiecien NW, Coon JJ. Interactive Peptide Spectral Annotator: A Versatile Web-based Tool for Proteomic Applications. *Mol Cell Proteomics.* 2019;18(8 suppl 1):S193-s201.
78. Tas DO, Ozkavukcu S, Inanc I, Kose SK, Erdemli E. The effects of coenzyme Q10 and curcumin supplementation in freezing medium for human sperm cryopreservation. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology.* 2023;287:36-45.

79. Hallam J, Burton P, Sanders K. Poor Sperm Chromatin Condensation Is Associated with Cryopreservation-Induced DNA Fragmentation and Cell Death in Human Spermatozoa. *J Clin Med.* 2024;13(14).
80. Cohen J. *Statistical power analysis for the behavioral sciences* Lawrence Erlbaum Associates 1988.