

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Biociências
Curso de graduação em Ciências Biológicas

Bianca Suzin dos Santos

Avanços na preservação da fertilidade masculina - Uma revisão integrativa da
literatura

Porto Alegre
2024

Bianca Suzin dos Santos

Avanços na preservação da fertilidade masculina - Uma revisão integrativa da
literatura

Trabalho de conclusão de curso como
requisito parcial à obtenção do título de
Graduada em Ciências Biológicas do Instituto
de Biociências da Universidade Federal do
Rio Grande do Sul.

Orientadora: Adriana Bos-Mikich

Porto Alegre

2024

FICHA CATALOGRÁFICA

CIP - Catalogação na Publicação

Suzin dos Santos, Bianca
Avanços na preservação da fertilidade masculina -
Uma revisão da literatura / Bianca Suzin dos Santos.
-- 2024.
37 f.
Orientadora: Adriana Bos-Mikich.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto
de Biociências, Bacharelado em Ciências Biológicas,
Porto Alegre, BR-RS, 2024.

1. Fertilidade Masculina. 2. Preservação da
fertilidade masculina. 3. Reprodução Humana Assistida.
I. Bos-Mikich, Adriana, orient. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Bianca Suzin dos Santos

Avanços na preservação da fertilidade masculina - Uma revisão integrativa da literatura

Trabalho de conclusão de curso como requisito parcial à obtenção do título de Graduada em Ciências Biológicas do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Adriana Bos-Mikich

Porto Alegre, fevereiro de 2024.

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Adriana Bos-Mikich, professora associada da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e consultora científica da Clínica de Reprodução Humana Nilo Frantz.

Prof. Dr. Lucas Rosa Fraga, professor adjunto na UFRGS e professor permanente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da UFRGS.

Dra. Talita Giacomet de Carvalho, biomédica, coordenadora adjunta do Comitê de Ética em Pesquisa do Grupo Hospitalar Conceição (CEP-GHC) e Embriologista no Hospital Fêmeina do GHC.

AGRADECIMENTOS

À minha família, que sempre me deu força e apoio nos momentos difíceis, sem vocês eu nada seria! Obrigada mãe, pai, Manda, Lu, Biel, Lucas e Mateus, eu amo vocês mais que tudo nessa vida.

Ao meu parceiro, Bruno, por se fazer presente quando eu faltei, por ter vibrado tanto quanto eu com as minhas conquistas e por ter me dado a oportunidade de dividir a vida contigo.

Aos amigos que sempre estiveram ao meu lado, pela amizade incondicional e pelo apoio demonstrado ao longo de todo o período da graduação. Em especial, agradeço a Marina e ao Raul, com quem convivi intensamente durante os últimos anos. Obrigada pelo companheirismo e pela troca de experiências que me permitiram crescer não só como pessoa, mas também como profissional. Espero que nossa amizade perdure por toda a vida.

Aos professores da Bio e funcionários da COMGRADBio, pela ajuda e pela paciência com a qual guiaram o meu aprendizado.

À minha querida orientadora, Profe Adri, por ter aceitado me orientar e ser muito mais que isso na minha vida acadêmica. Obrigada por ter sido uma verdadeira mentora e ter desempenhado tal função com tanta dedicação e carinho.

Aos membros da banca, Prof. Lucas, o qual tenho muita gratidão por tudo o que tem me ensinado nesse pouco tempo em que sou sua aluna, e Talita, que, junto com a Luciane, foi tão receptiva e me ensinou tanto sobre Reprodução Assistida. Obrigada!

Por fim, a todos que, de alguma forma, cruzaram meu caminho e me ajudaram a crescer durante essa longa jornada que foi a graduação em Ciências Biológicas.

RESUMO

A reprodução humana assistida conta com diversas técnicas associadas a ela, que podem ser tanto dedicadas à geração de novos descendentes, quanto à saúde reprodutiva dos pacientes. As estratégias de preservação da fertilidade, que fazem parte da área, permitem o armazenamento de gametas ou tecidos reprodutivos e variam de acordo com a idade, condição de saúde e sexo do paciente. Atualmente, para homens, as técnicas aplicadas são a criopreservação de sêmen, considerada a padrão-ouro, e a criopreservação de tecido testicular, ainda reconhecida como experimental. Os avanços relacionados à preservação da fertilidade masculina são amplamente documentados por meio de artigos científicos e, com a realização desta revisão da literatura, objetivou-se compilar os dados mais recentes e relevantes sobre os avanços nas técnicas de preservação da fertilidade masculina, ocorridos na última década (2013-2023). Para tal, foi conduzida uma revisão bibliográfica integrativa da literatura. Através do estudo realizado foi constatado que a criopreservação de sêmen, é uma técnica que não apresenta resultados 100% satisfatórios, além de não englobar todos os grupos de pacientes que necessitam preservar a sua fertilidade. Além disso, alguns avanços na preservação da fertilidade de pacientes pré-púberes foram documentados, porém, nenhum deles é praticável na clínica atualmente. Ademais, muito ainda precisa ser feito para que o acesso às técnicas de reprodução humana assistida se torne maior e mais difundido entre os habitantes de áreas mais distantes e/ou pacientes que apresentem vulnerabilidade financeira.

Palavras-chave: preservação da fertilidade masculina, criopreservação de sêmen, criopreservação de tecido testicular.

ABSTRACT

Assisted human reproduction has several techniques that can be dedicated both to the generation of new descendants and to the reproductive health of patients. Fertility preservation strategies, which are part of the area, allow the storage of gametes or reproductive tissues and vary according to the patient's age, health condition and sex. Currently, for men, the techniques applied are semen cryopreservation, considered the gold standard, and testicular tissue cryopreservation, still recognized as experimental. Advances related to this area are widely documented through scientific articles and the present literature review aimed to compile the most recent and relevant data on advances in male fertility preservation techniques that have occurred in the last decade (2013- 2023). To this end, an integrative review of the literature was conducted. Through the study carried out, it was found that the semen cryopreservation technique does not present 100% satisfactory results, in addition to, it does not include all groups of patients who need preserving their fertility. Furthermore, some advances in fertility preservation in prepubertal patients have been documented, however, none of these are currently used in clinical practice. Moreover, much still needs to be done so that access to all assisted reproduction techniques becomes greater and more widespread among inhabitants of more distant areas and/or patients who are financially vulnerable.

Keywords: male fertility preservation, semen cryopreservation, testicular tissue cryopreservation.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 Introdução | 8 |
| 1.1 <i>Preservação da fertilidade</i> | 8 |
| 1.2. <i>Sistema reprodutor masculino e preservação da fertilidade masculina</i> | 9 |
| 1.3. <i>Técnicas de preservação da fertilidade masculina</i> | 10 |
| 1.4. <i>Justificativa</i> | 11 |
| 2 Desenvolvimento | 13 |
| 2.1 <i>Referencial teórico</i> | 13 |
| 2.2 <i>Objetivos</i> | 15 |
| 2.2.1 Objetivo geral | 15 |
| 2.2.2 Objetivos específicos | 16 |
| 2.3 <i>Metodologia</i> | 16 |
| 2.3.1 <i>Formulação da questão de investigação</i> | 16 |
| 2.3.2 <i>Seleção dos estudos</i> | 17 |
| 2.3.2 <i>Critérios de inclusão e de exclusão</i> | 17 |
| 2.3.3 <i>Extração e síntese dos dados</i> | 17 |
| 2.3.4 <i>Pesquisa de clínicas no Rio Grande do Sul que realizam PF masculina</i> | 17 |
| 2.4 <i>Resultados e discussão</i> | 18 |
| 2.4.1 <i>Seleção dos estudos</i> | 18 |
| 2.4.2 <i>Preservação da fertilidade em homens adultos</i> | 18 |
| 2.4.3 <i>Preservação da fertilidade em meninos pré-púberes</i> | 23 |
| 2.4.4 <i>Acesso aos Centros de Reprodução Humana Assistida no Rio Grande do Sul</i> | 26 |
| 3 Conclusão | 28 |
| REFERÊNCIAS | 29 |

1 INTRODUÇÃO

1.1. PRESERVAÇÃO DA FERTILIDADE

O desenvolvimento das técnicas de Reprodução Humana Assistida (RHA) teve início em 1978, com Robert Edwards e Patrick Steptoe, considerados pioneiros no desenvolvimento da fertilização *in vitro* (FIV) (Steptoe & Edwards, 1978). Atualmente, o ramo da RHA tem sido amplamente estudado e, com isso, diversas questões acabam surgindo, a exemplo têm-se a importância da possibilidade de preservação da fertilidade (PF) na qualidade de vida de pacientes sobreviventes de câncer, de outras doenças ou, ainda, para aqueles que desejam postergar a parentalidade.

No Brasil, para cada ano do triênio 2023-2025, são esperados em torno de 702 mil novos casos de câncer (INCA, 2022). Muitos desses pacientes diagnosticados estão em idade reprodutiva, aos quais seria aconselhado realizar a tentativa de PF. Além disso, na última década, as idades paterna e materna têm aumentado (Kaltsas et al., 2023). Alguns motivos que podem ter levado a essa mudança são: maior expectativa de vida, casamentos tardios e foco no desenvolvimento de carreira. Essa parentalidade em idade mais avançada levanta preocupações relacionadas ao declínio da capacidade reprodutiva dos pais e as consequências geradas à saúde dos filhos desses casais (Plas et al., 2000; Santiago et al., 2019).

As estratégias de preservação da fertilidade variam de acordo com a idade e o sexo do paciente e permitem que os pacientes armazenem gametas ou tecidos reprodutivos para um potencial uso futuro na criação de descendentes (Dolmans & Manavella, 2018). Atualmente, diversas técnicas de PF são empregadas. Especificamente para pacientes do sexo masculino, a PF conta com a técnica de criopreservação de sêmen, considerada padrão-ouro, e com a técnica de criopreservação de tecido testicular, ainda reconhecida como experimental. Além desses, casais em tratamento de reprodução assistida podem optar pela criopreservação dos embriões gerados, possibilitando a utilização dos mesmos futuramente.

1.2. SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO E PRESERVAÇÃO DA FERTILIDADE MASCULINA

O sistema reprodutor masculino é extremamente organizado, sendo formado tanto por órgãos sexuais internos: testículos, epidídimos, ductos deferentes, glândulas seminais, ductos ejaculatórios (incluindo a uretra), próstata e glândulas bulbouretrais; quanto por órgãos sexuais externos: pênis, porção distal da uretra e escroto (Figura 1). Os testículos são responsáveis pela espermatogênese, processo de formação dos espermatozoides, uma ação complexa que envolve divisão e diferenciação celular. A espermatogênese pode ser dividida em três diferentes fases de eventos: fase proliferativa, fase meiótica e fase de diferenciação, essa última também é chamada de espermiogênese. Essas fases são seguidas por uma série de processos de maturação pós-testicular, necessários para que os espermatozoides se tornem totalmente funcionais (Jamsai & O'Bryan, 2011).

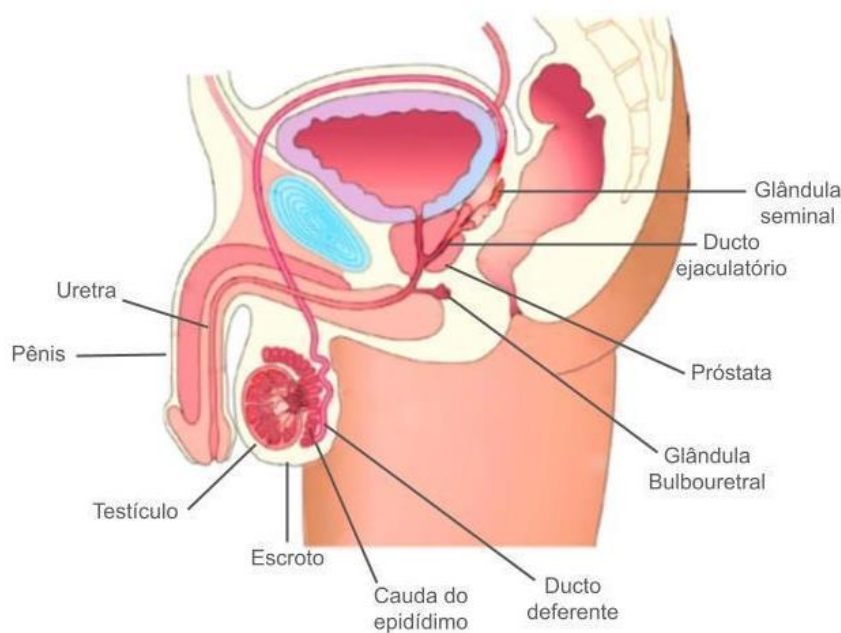


Figura 1. Estrutura e organização do sistema reprodutor masculino. Imagem adaptada de: Moore, Keith L.; Persaud, T.V.N; Torchia, Mark G. Embriologia Básica. Grupo GEN, 2022. E-book. ISBN 9788595159020. Disponível em: <https://app.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788595159020/>. Acesso em: 17 Jan. 2024.

O sêmen humano é formado por espermatozoides e secreções advindas das vesículas seminais, próstata e glândula bulbouretral. Essa composição caracteriza um meio complexo que contém uma grande variedade de moléculas, ideal para a manutenção e capacitação dos espermatozoides (Poiani, A., 2006). É esse material seminal que pode ser utilizado nas técnicas de RHA.

De acordo com a última edição do manual laboratorial da OMS para o exame e processamento do sêmen humano (WHO - Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen, 2021), a PF deve ser oferecida aos homens antes de tratamentos com agentes citotóxicos ou radioterapia, vasectomia, congelamento em casos de serviço ativo em ocupação perigosa, adultos e adolescentes transgêneros masculino-feminino antes do início das terapias hormonais.

1.3. TÉCNICAS DE PRESERVAÇÃO DA FERTILIDADE MASCULINA

A obtenção do ejaculado para criopreservação constitui um método seguro e não invasivo de preservação da fertilidade masculina para a maioria dos pacientes pós-púberes (McBride & Lipshultz, 2018). A criopreservação de sêmen é a abordagem mais eficiente e considerada padrão ouro na PF masculina, tornando-se um dos elementos essenciais das tecnologias de reprodução humana assistida (Grin et al., 2020). Essa técnica, desenvolvida pelos pioneiros Polge et al., (1949), consiste no armazenamento dos espermatozoides, após uma parada metabólica, por um período prolongado de tempo, o que permite a manutenção da viabilidade celular e do potencial de fertilização (Martins et al., 2019). A amostra seminal para a realização da criopreservação pode ser obtida através da ejaculação ou via extração testicular de espermatozoides (do inglês: testicular sperm extraction - TESE) (Figura 2).

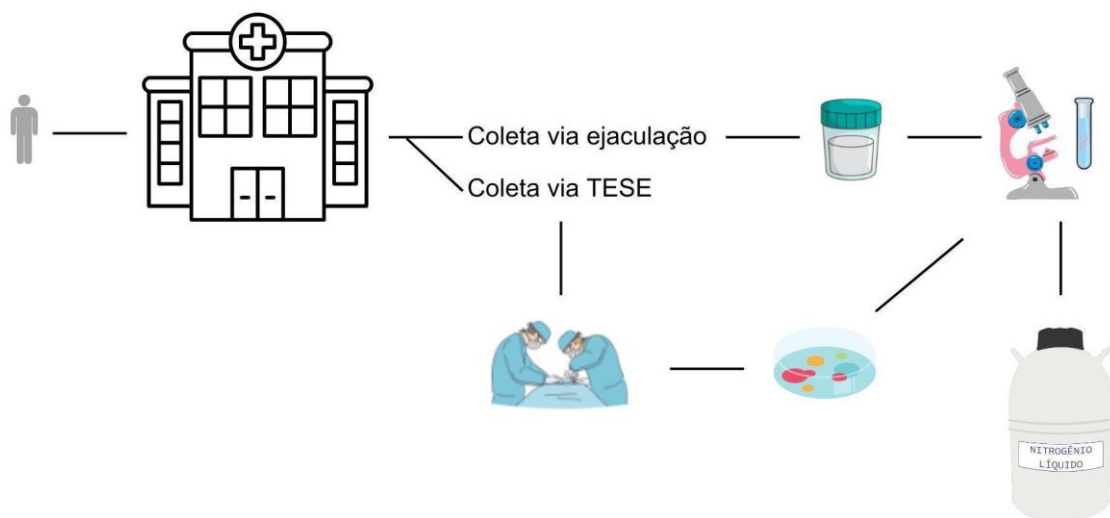


Figura 2. Etapas simplificadas da coleta de gametas masculinos por ejaculação ou via TESE.

Apesar dos benefícios e facilidades de aplicação, a criopreservação dos espermatozoides é uma técnica impraticável para pacientes com azoospermia não obstrutiva, pacientes pré-púberes e outros casos específicos. Nesse sentido, a criopreservação de tecido testicular, que consiste na preservação das espermatogônias tronco e de tecido testicular pode apresentar uma alternativa para esses pacientes (Nikmahzar et al., 2023). A técnica, apesar de ainda ser considerada experimental, apresenta resultados promissores em modelos animais, sendo sua importância advinda do possível benefício aos pacientes pediátricos diagnosticados com câncer e, também, aos pacientes com anomalias genéticas, ao entrar na prática clínica futuramente (Fayomi et al., 2019).

Os espermatozoides criopreservados podem permanecer congelados por décadas (Hossain & Nagamani, 2008; McBride & Lipshultz, 2018). Essas e outras técnicas são realizadas em Centros de Reprodução Humana Assistida (CRHAs), que estão presentes em uma escala global, com tendências de crescimento tanto de quantidade de centros, quanto de procedimentos realizados (Galic et al., 2021). No Brasil, estão registrados 175 CRHAs, sendo o estado de São Paulo a região com maior quantidade, com um total de 62 centros (ANVISA, Sistema SisEmbryo, dados de 2022).

1.4. JUSTIFICATIVA

A criopreservação de sêmen é uma técnica amplamente utilizada no Brasil e no mundo (Grin et al., 2020). Além dela, a criopreservação de tecido testicular tem se mostrado promissora para abordagens clínicas futuras em pacientes pré-púberes ou com outros casos clínicos específicos (Fayomi et al., 2019). Esses avanços são amplamente documentados por meio de artigos científicos e, com a realização desta revisão, objetivou-se compilar os dados mais recentes e relevantes para que, tanto pesquisadores, quanto andrologistas, possam aprimorar suas técnicas e conhecer novos métodos de preservação da fertilidade em homens.

Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo a realização de uma revisão integrativa da literatura, sobre os avanços nas técnicas de preservação da fertilidade masculina, ocorridos na última década (2013-2023). O recorte de tempo escolhido baseou-se na quantidade de publicações que carregam os principais termos de pesquisa relacionados ao objeto de estudo. As fases de seleção dos estudos,

critérios de inclusão e de exclusão, extração e síntese dos dados e disseminação dos resultados estarão descritas no capítulo de metodologia.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 REFERENCIAL TEÓRICO

A linha do tempo da evolução da Reprodução Humana Assistida no mundo apresenta diversos marcos de importância e avanços para a área, sendo o primeiro marco histórico registrado em 1978, no Reino Unido, com o nascimento do primeiro bebê através da técnica de Fertilização *in vitro* (FIV), Louise Brown (Stephoe & Edwards, 1978). No Brasil, o registro da primeira criança nascida a partir desta técnica ocorreu em 1984.

Devido a maior produção de embriões a partir da FIV, fenômeno que ocorre devido ao uso da estimulação hormonal e gonadotrofinas exógenas para a realização da técnica, fez-se necessária a criação de um meio efetivo de preservação dos embriões excedentes, que não eram transferidos para a paciente. Trounson & Mohr (1983) foram os primeiros a publicar sobre essa tentativa de preservação de embriões humanos em nitrogênio líquido. O estudo trouxe como resultado um procedimento de criopreservação que permite uma alta taxa de sobrevivência de embriões humanos de quatro e oito células, bem como o registro de gravidez de uma paciente (Trounson & Mohr, 1983). Os pesquisadores foram seguidos por Zeilmaker e colaboradores (1984), que obtiveram sucesso na criopreservação de embriões, com duas transferências de sucesso, que resultaram em duas mulheres com gestações confirmadas. Apesar da criopreservação de embriões ter registros de sucesso apenas em 1983, a tentativa preservação da fertilidade masculina já apresentava resultados desde 1949, com o pioneiro Christopher Polge e sua descoberta do poder protetor do glicerol contra danos causados pelo congelamento (Polge et al., 1949).

A partir desses marcos, diversos estudos foram publicados com objetivos de redução de custos e aprimoramento das técnicas de reprodução assistida. Em 1992, Palermo e colaboradores, publicam outra grande inovação para o ramo da RHA, o surgimento da nova técnica de fertilização, chamada Injeção intracitoplasmática de espermatozoides (do inglês: *Intracytoplasmic sperm injection* - ICSI), com o relato do nascimento de 4 crianças saudáveis. Essa nova técnica, que chegou ao Brasil somente em 1994, é capaz de contornar algumas etapas do processo de fertilização natural. Além disso, a ICSI permite a utilização de ejaculados que apresentam baixa concentração espermática, espermatozoides com propriedades cinéticas deficientes

e/ou anomalias acrossomais, já que um único espermatozoide é suficiente para a sua realização (Palermo et al., 1992).

Outra inovação importante para a RHA, foi o relato da primeira gravidez com gametas masculinos obtidos por extração testicular de espermatozoides (do inglês: *testicular sperm extraction* - TESE). Este estudo pioneiro ocorreu com um paciente diagnosticado com azoospermia obstrutiva, no ano de 1993 (Schoysman et al., 1993). A inovação foi seguida pela publicação de estudos com resultados positivos de pacientes que tiveram espermatozoides extraídos dos testículos via TESE, posteriormente criopreservados e, então, descongelados para utilização em procedimentos de ICSI (Gil-Salom et al., 1996; Romero et al., 1996).

Ainda com o propósito de melhoramento e utilização das técnicas de RHA, em 1999, Kuleshova e colaboradores publicaram um relato de caso registrando o nascimento do primeiro bebê após a realização da vitrificação de oócitos. Essa técnica consiste na coleta dos oócitos durante os ciclos de RHA, preservação dos mesmos via vitrificação e posterior realização de ICSI para a tentativa de gerar embriões que possam ser transferidos para a mãe (Kuleshova et al., 1999). No ano de 2012 outra grande novidade para o ramo da RHA é publicada: a confirmação da restauração da função ovariana em uma mulher que passou pelo procedimento de autotransplante de tecido ovariano criopreservado (Donnez et al., 2012). Esse resultado foi seguido pelo relato do primeiro ensaio clínico de transplante de útero realizado, sendo este um tratamento que representa a possibilidade de reverter a infertilidade causada por fator uterino (Brännström et al., 2014) (Figura 3).

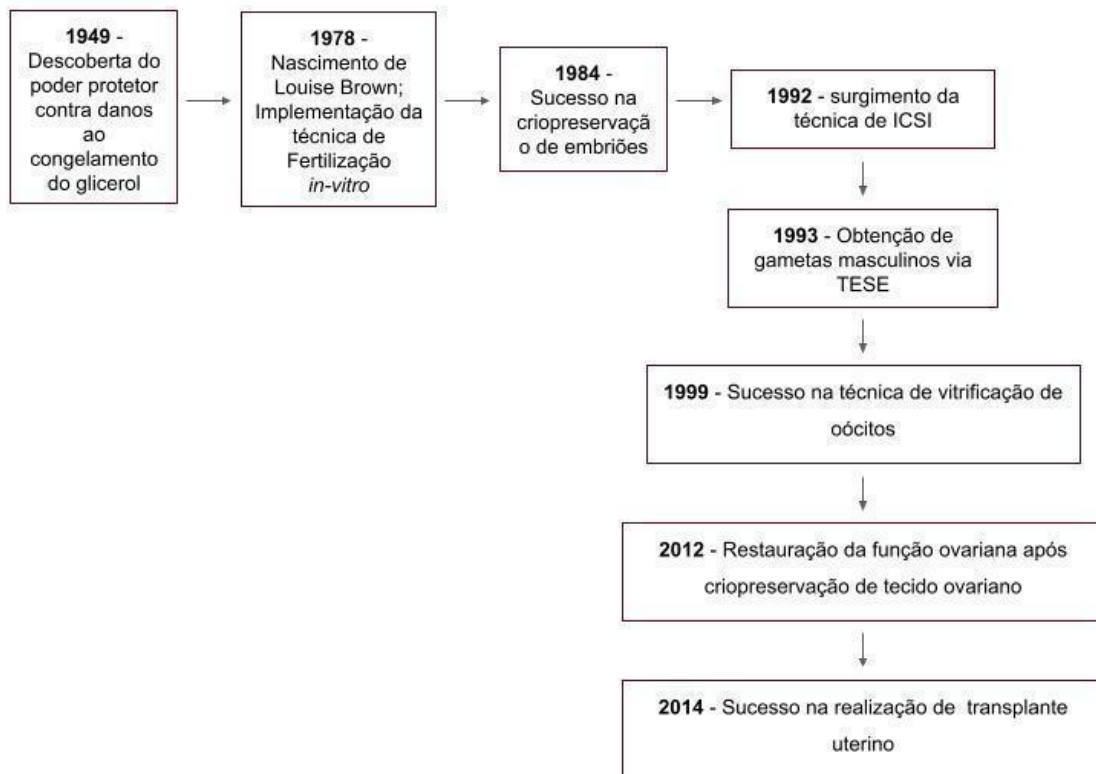


Figura 3. Principais marcos históricos da Reprodução Humana Assistida

Desde então inovações como ferramentas de Inteligência Artificial, novas funções em equipamentos já utilizados e técnicas experimentais vem sendo registradas (Bulletti et al., 2023; Bossi et al., 2023; Nikmahzar et al., 2023). Entender e compreender a importância da linearidade da história da RHA tem grande significância para que possamos compreender as principais necessidades de inovações do momento e saber como lidar com tais demandas, pensando sempre no bem estar do(a) paciente.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os diferentes métodos de preservação da fertilidade masculina ao longo da história da reprodução assistida no Brasil e no mundo, bem como a eficácia de tais métodos.

2.2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar quais são os métodos utilizados atualmente e quais os avanços mais recentes em tais métodos;
- Documentar os métodos experimentais aplicados em pesquisas atualmente;
- Avaliar CRHAs do Rio Grande do Sul, Brasil, que realizam essa técnica e levantar dados de quantidades de procedimentos realizados;
- Avaliar quais foram os maiores avanços documentados entre os anos de 2013 e 2023.

2.3 METODOLOGIA

O presente trabalho foi conduzido no formato de uma revisão bibliográfica integrativa da literatura.

2.3.1 FORMULAÇÃO DA QUESTÃO DE INVESTIGAÇÃO

A questão foi formulada de acordo com o modelo definido pelo acrônimo PICO (Population - Intervention – Comparison – Outcome) e está descrita na Tabela 1 (Wright et al., 2007).

Tabela 1. Formulação da questão de investigação.

| Descrição | Abreviação | Componentes da pergunta |
|-------------|------------|--|
| População | P | Homens em idade reprodutiva |
| Intervenção | I | Tentativa de preservação da fertilidade |
| Comparação | C | Diferentes métodos de PF masculina existentes atualmente |
| Desfecho | O | Avanços obtidos nos métodos de PF masculina entre os anos de 2013 e 2023 |

2.3.2 SELEÇÃO DOS ESTUDOS

Esta etapa foi realizada com a utilização das bases de dados textuais eletrônicos Google Acadêmico e PubMed. A estratégia de busca incluiu termos relacionados a (1) preservação da fertilidade masculina e (2) técnicas de preservação da fertilidade masculina. Quanto as palavras-chave, foram utilizadas: “male fertility preservation”, “human sperm cryopreservation” e “testicular tissue AND spermatogonial stem cell culture”. Na primeira fase (triagem), foram examinados os títulos e resumos dos estudos. A segunda fase consistiu na avaliação do texto completo dos estudos selecionados na primeira fase.

2.3.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E DE EXCLUSÃO

Os estudos foram selecionados de maneira arbitrária, tendo como critérios de inclusão a publicação realizada entre os anos de 2013 e de 2023 e com disponibilização online, sem limitações dos resultados de investigação científica ou com acesso via instituição (Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS). Foram excluídos artigos publicados anteriormente a 2013, escritos em línguas diferentes de inglês e português e/ou que não passaram por uma revisão por pares. Além desses, também foram excluídos relatos de casos, estudos sem informações metodológicas e estudos que não se enquadram no PICO desta revisão.

2.3.4 EXTRAÇÃO E SÍNTESE DOS DADOS

Foi realizada uma descrição detalhada de cada estudo, na qual os dados foram extraídos e fichados. Posteriormente estes dados foram compilados e discutidos entre a aluna e a orientadora, para então serem preparados para a disseminação dos resultados.

2.3.5 PESQUISA DE CLÍNICAS NO RIO GRANDE DO SUL QUE REALIZAM PF MASCULINA

Objetivando contabilizar a quantidade de clínicas localizadas no Rio Grande do Sul (RS) e o acesso de pacientes a elas, foi realizado contato direto com todas as clínicas localizadas no estado e devidamente registradas no sistema SisEmbryo (ANVISA). O contato foi realizado através dos números registrados nos sites de identificação de cada Centro de Reprodução Humana e os dados obtidos, sobre a realização de algum tipo de PF masculina, foram discutidos.

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.4.1 SELEÇÃO DOS ESTUDOS

Após a busca dos artigos nas bases de dados, foram identificados um total de 206 artigos, incluindo duplicatas e artigos que não tinham relevância para as questões primárias da pesquisa. Após a análise de 206 títulos e resumos, 152 artigos foram excluídos e 54 artigos foram analisados por completo. Após a aplicação de todos os critérios mencionados no capítulo de metodologia, 16 artigos foram incluídos na revisão (Figura 4). Todos os artigos incluídos na revisão foram publicados entre 2013 e 2023 e apresentavam apenas estudos em humanos. Os 16 artigos incluídos tiveram seus dados tabelados e resultados separados em dois principais grupos: PF de homens adultos e PF de meninos pré-púberes.

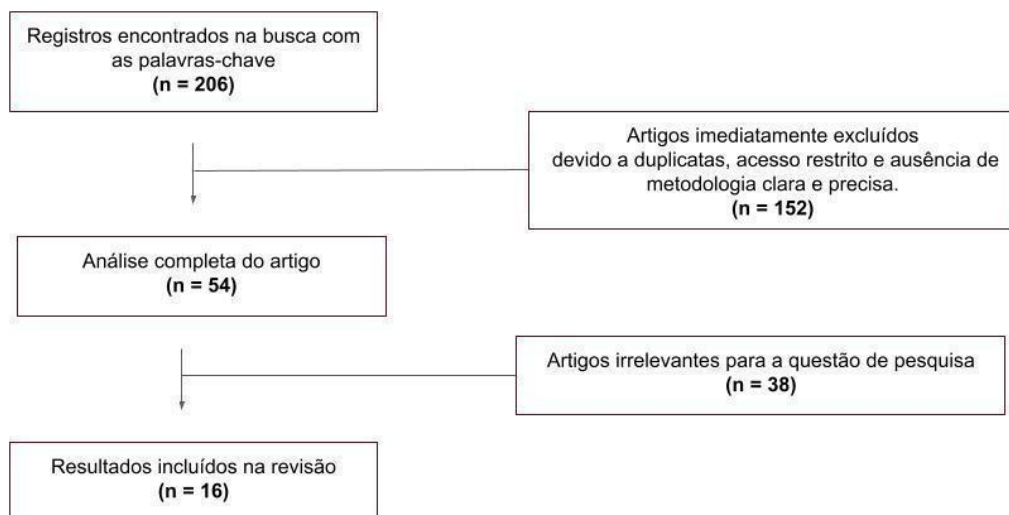


Figura 4. Fluxograma de seleção de estudos para revisão com base de dados PubMed e Google Scholar entre 1º de janeiro de 2013 a 30 de novembro de 2023.

2.4.2 PRESERVAÇÃO DA FERTILIDADE EM HOMENS ADULTOS

A preservação da fertilidade de homens adultos consiste na criopreservação da amostra seminal, que pode ser obtida através da ejaculação ou via extração testicular de espermatozoides (do inglês: *testicular sperm extraction* - TESE). A criopreservação espermática, apesar de considerada a técnica padrão-ouro para a PF masculina, apresenta alguns problemas como a baixa viabilidade pós-descongelamento, uma vez que 25 a 75% dos espermatozoides recuperados

apresentam danos estruturais e/ou funcionais ou não sobrevivem aos estresses mecânicos e osmóticos associados ao processo de congelamento e descongelamento (Pariz et al., 2019). Desde as primeiras tentativas de preservação de espermatozoides humanos, muitos avanços foram feitos, sendo a descoberta de crioprotetores eficazes e a possibilidade da utilização do nitrogênio líquido muito importantes para a área de estudo (Tamburrino et al., 2023).

Os crioprotetores são agentes utilizados na prevenção de danos e proteção das células, e desempenham papel significativo na sobrevivência celular (Ivanova et al., 2023). O meio crioprotetor básico, mais comumente utilizado para a criopreservação de espermatozoides humanos, apresenta-se em uma solução aquosa de glicerol, sacarose e albumina (Anger et al., 2003; Ivanova et al., 2023). Também vale ressaltar que a criopreservação de espermatozoides é um processo fundamentado no congelamento através de etapas de exposição da amostra a temperaturas muito baixas, de forma que, ao final da técnica, a temperatura atingida seja de -196°C , em nitrogênio líquido. Em comparação, a técnica de vitrificação, considerada uma inovação na PF masculina, possibilita a não formação de cristais de gelo dentro do citoplasma do espermatozoide, uma vez que a amostra é exposta diretamente ao nitrogênio líquido na temperatura de -196°C (Schulz et al., 2020). Sendo assim, com relação aos dados encontrados na revisão bibliográfica, os avanços registrados dentro do tópico de PF masculina de homens adultos, encontram-se na tabela 2.

Tabela 2. Resultados encontrados acerca da PF de homens adultos.

| <i>Estudo</i> | <i>Proposta</i> | <i>N amostral</i> | <i>Principais achados</i> |
|--------------------|--|-------------------|---|
| Raad et al., 2018 | Comparar cinco meios de criopreservação de espermatozoides disponíveis comercialmente, em termos de motilidade, morfologia e integridade do DNA. | n = 100 | Os cinco meios de criopreservação selecionados tiveram efeitos negativos na motilidade e morfologia dos espermatozoides por si só. Sugerem que a amostra de sêmen congelado deve ser utilizada somente quando necessário. |
| Fu et al., 2019 | Estudos moleculares das diferenças encontradas em amostras seminais frescas e criopreservadas/descongeladas. | n = 14 | 174 proteínas diferenciais foram identificadas entre as amostras de sêmen fresco e criopreservado: 98 proteínas diminuíram e 76 proteínas aumentaram no grupo de criopreservação. |
| Pariz et al., 2019 | Avaliar o efeito protetor e estimulante da | n = 30 | A combinação de suplementação de cafeína e melatonina em amostras de |

| | | | |
|------------------------------|--|---------|--|
| | suplementação de melatonina e cafeína nas características funcionais dos espermatozóides humanos antes e após o congelamento. | | esperma pré-congeladas e pós-descongeladas provou ser uma forma eficaz e simples de melhorar a qualidade do sêmen. |
| Schulz et al., 2020 | Revisão da metodologia de vitrificação desenvolvida pelo grupo de pesquisa dos autores. | - | A técnica de vitrificação possibilita a preservação de espermatozóides selecionados sem plasma seminal e com crioprotetores e proteínas não permeáveis. Atualmente, é uma das formas mais eficazes de manter a função espermática e tem sido utilizada na fertilização <i>in vitro</i> ou na inseminação intrauterina em humanos. |
| Ernandez et al., 2021 | Estudar a qualidade e a heterogeneidade dos resultados publicados sobre extração microcirúrgica de espermatozoide testicular (do inglês, <i>microsurgical testicular sperm extraction</i> - mTESE). | - | Existem inconsistências na qualidade dos resultados publicados sobre a mTESE. Estas lacunas podem orientar o desenvolvimento de diretrizes de notificação padronizadas para melhor avaliar e comparar os resultados clínicos entre instituições e manter o foco nos resultados de casais em futuros estudos mTESE. |
| González-Ravina et al., 2022 | Primeiro estudo que analisou o efeito da classificação de células ativadas magneticamente (do inglês, <i>magnetic-activated cell sorting</i> - MACS) nos ciclos de inseminação intrauterina com sêmen de doadores previamente congelados (do inglês, <i>cryopreservation of sperm in donor intrauterine insemination</i> - D-IUI). | n = 181 | Resultados não mostraram diferenças significativas nas taxas de gestação, nascidos vivos ou aborto espontâneo entre os grupos amostrais. |
| Huang et al., 2022 | Avaliar se a criopreservação de espermatozóide único melhora os resultados clínicos em pacientes com azoospermia ou oligospermia grave. | - | As técnicas para preservação de espermatozóides únicos são viáveis e eficientes e podem beneficiar pacientes com oligospermia grave ou azoospermia. |
| Ogouma et al., 2022 | Identificar situações em que a realização da TESE foi benéfica para o tratamento de PF do paciente. | - | Antes do início do tratamento oncológico, a TESE é mais frequentemente proposta para homens com câncer testicular que apresentam azoospermia, uma vez que ela poderá ser realizada simultaneamente com a remoção do tumor ou orquiectomia. Após a quimioterapia, a TESE pode ser realizada se o paciente apresentar quadro de azoospermia persistente. |

Quanto ao método de coleta via TESE, que consiste na extração dos gametas masculinos via biópsia testicular, foram encontrados estudos que comparam seus resultados de eficácia em pacientes que desejavam realizar a PF e também que a comparam com uma técnica menos invasiva, a extração microcirúrgica de espermatozoide testicular (do inglês, *microsurgical testicular sperm extraction - mTESE*) (Ogouma et al., 2022; Schlegel & Li, 1998). A mTESE é realizada a partir da extração de pequenos fragmentos de testículo, o que, ao contrário da TESE convencional, facilita aos embriologistas o processamento da amostra e a busca de espermatozoides, além de reduzir os danos testiculares para o paciente (Achermann et al., 2021). No estudo de Hernandez e colaboradores (2021), os resultados demonstram que existem algumas inconsistências na qualidade dos trabalhos publicados sobre a mTESE. Neste cenário, a mTESE é considerada a técnica padrão ouro para a recuperação cirúrgica de espermatozoides, porém requer mais experiência e disponibilidade de tempo do urologista, além de apresentar custos operacionais mais elevados em comparação com as outras técnicas de biópsia testicular (Tharakan et al., 2021).

Quanto ao sêmen coletado via ejaculação, há, principalmente, estudos que abordam a utilização de suplementações de meios de cultura já consolidados no mercado, realização de técnicas inovadoras, como a de criopreservação de espermatozoide único, e estudos moleculares que procuram investigar diferenças entre amostras seminais frescas e criopreservadas/ descongeladas, além da proposta de seleção dos melhores espermatozoides através da biologia molecular (Fu et al., 2019; Huang et al., 2022; Pariz et al., 2019). Existem diversos fatores que podem influenciar a qualidade dos espermatozoides durante o manuseio e preparação das amostras seminais, eles incluem: a composição do meio de cultura, o tempo de incubação nos meios de preparo, as restrições de temperatura durante as etapas de centrifugação e a presença de leucócitos na amostra, mesmo quando em concentrações consideradas normais segundo os padrões da OMS (Ranéa et al., 2022).

Dado o conhecimento consolidado dos danos causados pelo estresse oxidativo aos espermatozoides, meios de cultura que sejam suplementados com antioxidantes, protetores e estimulantes, podem vir a ser uma solução para melhora da qualidade da amostra seminal durante e após o processo de criopreservação (Wang et al., 1997; Zribi et al.; 2010; Pariz et al., 2019). O meio de cultura mais utilizado nas técnicas de

RHA atualmente é o HTF® (*Human Tubal Fluid*), sendo aplicado, também, durante o procedimento de criopreservação de sêmen. Pariz e colaboradores (2019), utilizaram HTF® modificado, com suplementação de melatonina e cafeína e obtiveram resultados interessantes. A suplementação do meio com esses compostos resultou em uma melhora na motilidade espermática pós-descongelamento, que foi associada a um estado mitocondrial mais saudável dos espermatozoides (Pariz et al., 2019). Esse resultado pode ser útil para amostras seminais de baixa qualidade inicial, seja qual for a causa da infertilidade do homem.

Existem diversos fatores masculinos que são associados a infertilidade, alguns exemplos são: disfunção testicular e espermática, endocrinopatias, estilo de vida, fatores anatômicos congênitos, exposições gonadotóxicas e envelhecimento (Eisenberg et al., 2023). Disfunções espermáticas como oligospermia e azoospermia, que estão relacionadas à baixa ou inexistente concentração de espermatozoides no sêmen, podem impossibilitar a realização da PF masculina rotineira. Em vista disso, a criopreservação de espermatozoides únicos beneficia homens com essa condição (Huang et al., 2022). Huang e colaboradores (2022) relatam, após uma revisão da literatura, que 21 bebês nasceram advindos dessas técnicas de preservação de espermatozoide único, no entanto, faz-se necessária uma quantidade maior de estudos com boa qualidade e tamanhos amostrais maiores para que a técnica seja difundida e aplicada dentro dos CRHAs.

Outro ponto importante para a criopreservação de sêmen é a etapa de análise e processamento da amostra, que é realizada pelo laboratório. Essa etapa normalmente não inclui análises moleculares e funcionais dos espermatozoides, porém, estudos apontam para a importância desse diagnóstico diferencial e o resultado nos tratamentos de PF e de RHA (González-Ravina et al., 2022; Juliá et al., 2023). González-Ravina e colaboradores (2022), sugerem a utilização da classificação de células ativadas magneticamente (do inglês, *magnetic-activated cell sorting* - MACS) nos ciclos de inseminação intrauterina, porém não obtiveram resultados significativamente diferenciais dentre os grupos contidos no estudo. Embora estejam em grande visibilidade, esses métodos avançados de seleção de espermatozoides requerem mais estudos para validar sua eficácia e aplicabilidade na prática clínica.

2.4.3 PRESERVAÇÃO DA FERTILIDADE EM MENINOS PRÉ-PÚBERES

A preservação da fertilidade em meninos pré-púberes é considerada experimental e ainda não apresenta resultados satisfatórios suficientes para que seja aplicada na prática clínica. No entanto, em diversos locais do mundo, a criopreservação de tecido testicular tem sido realizada de forma “preventiva”, na esperança de que pesquisadores obtenham sucesso na realização da espermatogênese *in vitro*, ou, então, que isso ocorra de forma natural no paciente após o retransplante (Tran et al., 2022). Os dados encontrados na revisão bibliográfica, com base nos termos de busca aplicados, encontram-se na tabela 3 e serão discutidos ao longo deste capítulo.

Tabela 3. Resultados encontrados acerca da PF de meninos pré-púberes.

| Estudo | Proposta | N amostral | Principais achados |
|----------------------|--|-------------------|--|
| Guo et al., 2015 | O objetivo do estudo foi a tentativa de isolar, identificar e cultivar células tronco espermatogoniais humanas por um longo período. | n = 40 | As células tronco espermatogoniais humanas isoladas puderam ser cultivadas durante dois meses com um aumento significativo do número de células com um meio definido contendo fatores de crescimento e hidrogel. |
| Medrano et al., 2016 | Estudar a capacidade das células-tronco espermatogoniais humanas de proliferarem <i>in vitro</i> sob condições de cultura de células-tronco espermatogoniais de camundongos. | n = 3 | Descobriram que as células-tronco espermatogoniais humanas apresentam proliferação limitada <i>in vitro</i> sob condições de cultura de células-tronco espermatogoniais de camundongos. |
| Onofre et al., 2016 | A revisão fornece uma visão geral dos protocolos de criopreservação existentes utilizados em diferentes modelos animais e humanos. | - | Poucos ou nenhum dado está disponível sobre os aspectos de segurança inerentes à geração de descendentes com gametas derivados de tecido testicular ou células testiculares em suspensão congelados e descongelados. Além disso, é necessário esclarecer qual a melhor forma de tentativa de preservação, dentre esses dois modelos. |
| Richer et al., 2020 | Revisar as diferentes estratégias que têm sido utilizadas na tentativa de criar organoides testiculares e na geração de espermatozoides. | - | Apenas um número limitado de estudos se concentrou na recriação da arquitetura testicular <i>in vitro</i> . Embora alguns avanços tenham sido feitos nessa questão de pesquisa, nenhum dos sistemas de cultura descritos é adequado para a reprodução da |

| | | | |
|-----------------------------|--|-------|--|
| | | | arquitetura testicular e da realização da espermatogênese <i>in vitro</i> . |
| Yuan et al., 2020 | Tentativa de recapitulação da organogênese testicular humana <i>in vitro</i> a partir de gônadas fetais cultivadas. | - | O modelo exibiu a formação de epitélio seminífero maduro e espermatogônias auto-renováveis. As espermátides haplóides derivadas <i>in vitro</i> sofreram recombinação meiótica e mostraram maior diversidade genética. Além disso, essas espermátides foram capazes de fertilizar oócitos e apoiar a subsequente formação de blastocistos. |
| Martin-Inaraja et al., 2021 | Investigaram o efeito de dois meios de cultura diferentes e quatro substratos na cultura de testículos dissociados do segundo trimestre de gestação, enriquecidos de células germinativas fetais humanas masculinas. | - | Forneceram evidências de que as escolhas do meio de cultura e do substrato adequado são cruciais para otimizar os protocolos de cultura para células germinativas fetais humanas masculinas. |
| Gholami et al., 2022 | Esta revisão resume os métodos utilizados para descélularizar tecidos e obter matriz extracelular, bem como seu uso na engenharia de tecidos testiculares. | - | A matriz extracelular descélularizada como uma estrutura biocompatível, funcionalmente graduada e biodegradável, com componentes específicos de tecido e fatores de crescimento, pode apoiar a reorganização e os processos fisiológicos das células originadas. |
| Younis et al., 2023 | Investigar a viabilidade de indução da espermatogênese <i>in vitro</i> a partir de tecido testicular imaturo criopreservado para pacientes pediátricos, antes do início da terapia gonadotóxica. | n = 1 | Os tecidos foram mantidos em cultura por até 32 dias. As espermatogônias foram diferenciadas para produzir espermátócitos primários. No entanto, a espermatogênese completa não foi observada em nenhum dos grupos. |

Entre os 8 artigos encontrados com a temática de PF de meninos pré-púberes, os principais tópicos são relacionados a criopreservação de tecido testicular imaturo (TTI) e indução da espermatogênese *in vitro*. Para que seja realizada a tentativa de indução da espermatogênese *in vitro*, primeiramente deve ser realizada a coleta de TTI, seguida do isolamento das células tronco espermatogoniais contidas no tecido. Em modelos murinos, considerados alternativas viáveis para os estudos em reprodução, já é possível realizar esse feito com sucesso, desde 1994 (Brinster & Avarbock, 1994; Brinster & Zimmermann, 1994; Jamsai & O'Bryan, 2011). Na tentativa de translação de modelo animal para a prática clínica, Medrano e colaboradores (2016) conduziram um trabalho sobre a capacidade das células-tronco

espermatogoniais humanas de proliferarem *in vitro* sob condições de cultura de células-tronco espermatogoniais de camundongos. Infelizmente as células-tronco espermatogoniais humanas apresentaram proliferação limitada *in vitro* sob condições de cultura das mesmas células de modelo animal (Medrano et al., 2016).

Guo e colaboradores (2015) testaram uma outra forma de cultivo desse tipo celular, sendo possível a cultura das células tronco espermatogoniais durante dois meses, com um aumento significativo da quantidade de células com um meio definido, que continha fatores de crescimento e hidrogel. Entretanto, não houve sucesso na indução da espermatogênese (Guo et al., 2015). Martin-Inaraja e colaboradores (2021), reforçam a importância da escolha do meio de cultura para as células tronco espermatogoniais. Nesse sentido, Younis e colaboradores (2023), utilizaram TTI criopreservado e descongelado de pacientes pré-púberes em diversos meios de cultura, estando um grupo sem suplementação hormonal e outros dois grupos suplementados. O estudo foi realizado com diferentes quantidades do hormônio folículo estimulante (do inglês: *follicle-stimulating hormone* - FSH) e de gonadotrofina coriônica humana (do inglês: *human chorionic gonadotropin* - hCG) e obteve como resultados o mantimento da viabilidade celular por até 32 dias, além da diferenciação das espermatogônias em espermatócitos primários. Entretanto, a espermatogênese completa não foi observada em nenhum dos grupos (Younis et al., 2023).

Atualmente, já existem registros de realização de injeção de espermátides redondas (do inglês: *round spermatid injection* - ROSI) com 90 nascidos vivos registrados (Tanaka et al., 2018). Ou seja, se esses estudos de indução da espermatogênese *in vitro* conseguissem desenvolver uma técnica que possibilite a diferenciação dessas espermatogônias tronco em espermátides, provavelmente poderiam ser utilizados TTIs que estão, hoje, criopreservados sem um destino propriamente concedido. Quanto aos aspectos de segurança inerentes à geração de descendentes a partir desses gametas advindos da criopreservação de TTI, Onofre e colaboradores (2016) atentam para a existência de poucos ou nenhum estudo sobre o tópico.

Em contrapartida, alguns pesquisadores têm trabalhado na tentativa de recapitulação da organogênese testicular humana *in vitro* a partir de gônadas fetais cultivadas. Yuan e colaboradores (2020), conseguiram desenvolver um modelo *in vitro* que exibiu a formação de epitélio seminífero maduro, com espermatogônias auto-renováveis, além de espermátides haplóides derivadas que sofreram recombinação

meiótica e mostraram maior diversidade genética, conforme indicado pela análise genética. Essas espermátides foram capazes de fertilizar oócitos humanos e, com isso, foram gerados blastocistos (Yuan et al., 2020). Os resultados da organogênese testicular *in vitro* descrita, podem desempenhar um papel muito importante no esclarecimento sobre a regulação do desenvolvimento dos testículos humanos e na manutenção da fertilidade masculina.

2.4.4 ACESSO AOS CENTROS DE REPRODUÇÃO HUMANA ASSISTIDA NO RIO GRANDE DO SUL

Os dados de acessibilidade de pacientes aos Centros de Reprodução Humana Assistida (CRHAs) no Rio Grande do Sul (RS) foram extraídos de forma simplificada, via contato por mensagens e busca on-line nos sites das clínicas cadastradas do sistema SisEmbrio (ANVISA, Sistema SisEmbrio, dados de 2022). Os centros apresentam uma má distribuição, tanto no estado do RS, quanto no Brasil, pois estão concentrados, em sua maioria, na capital do estado, Porto Alegre. Atualmente estão registrados dezesseis CRHAs no estado, sendo dez destes localizados em Porto Alegre, três em Passo Fundo, um em Bento Gonçalves, um em Caxias do Sul e um em Lajeado (Figura 5). Além disso, dos dezesseis CRHAs registrados, treze realizam preservação da fertilidade masculina e nenhum destes oferece o serviço pelo Sistema Único de Saúde (SUS).



Figura 5. Mapa ilustrando a localização dos CRHA's cadastrados no RS.

O RS possui uma extensão territorial de 281.707 km² e apresenta uma densidade demográfica de 38,63 hab/km² (IBGE, 2022). A partir dessa informação, é possível inferir que há, sim, dificuldade de acesso aos serviços de RHA de pacientes que residem em localidades distantes desses centros, e que estão distribuídos em apenas cinco cidades de todo o estado. Os custos da viagem e o tempo de ausência do trabalho são alguns dos problemas enfrentados por pessoas que residem distantes dos CRHAs e podem vir a criar barreiras adicionais para que esses pacientes não realizem o tratamento (Ethics Committee of the ASRM, 2015; Mikhael et al., 2021). Além disso, para a realização da técnica de criopreservação de sêmen, na tentativa de preservação da fertilidade masculina, são recomendadas mais de uma coleta de amostra, justamente para aumentar as chances dos pacientes obterem uma amostra utilizável no futuro.

Na tentativa de reduzir o problema da barreira geográfica, um dos CRHAs do RS, localizado em Caxias do Sul, oferece uma parceria com uma rede hoteleira da cidade, no sentido de minimizar a exaustão, causada pela busca de tratamento de RHA que alguns pacientes podem enfrentar. Esse problema geográfico alia-se a alguns outros, tais como: acesso financeiro e, até mesmo, dificuldade de obter recomendações de médicos oncologistas, para que seja realizada a tentativa de PF por pacientes que entrarão em tratamento oncológico (Adams et al., 2013; Huang et al., 2022).

3 CONCLUSÃO

Através do estudo realizado foi possível compreender o estado atual das formas de preservação da fertilidade masculina, bem como o acesso de pacientes a tais técnicas. Foi constatado que a técnica considerada padrão-ouro atualmente, a criopreservação de sêmen, não apresenta resultados 100% satisfatórios e também não engloba todos os grupos de pacientes que necessitam preservar a sua fertilidade. Alguns avanços na PF de pacientes pré-púberes foram documentados, tais como o sucesso na reprodução da espermatogênese *in vitro*, a partir de gônadas fetais cultivadas e a diferenciação das espermatogônias em espermátocitos primários em estudos que utilizaram tecido testicular imaturo. No entanto, nenhuma delas é praticável na clínica atualmente. Além disso, muito ainda precisa ser feito para que o acesso às técnicas de RHA se torne maior e mais difundido entre os habitantes de áreas mais distantes e/ou pacientes que apresentem vulnerabilidade financeira.

Diante do grande corpo de evidências registrados nessa e em outras revisões sobre o tema, o esforço para o desenvolvimento de técnicas cada vez melhores de PF masculina deve continuar. Para mais, com a publicação deste trabalho espera-se informar andrologistas e embriologistas sobre o status atual do tema, incitando-os na criação e realização de novos projetos de pesquisa e melhoramentos nas técnicas que já são aplicadas clinicamente.

REFERÊNCIAS

- Achermann, A. P. P.; Pereira, T. A.; Esteves, S. C.** (2021). Microdissection testicular sperm extraction (micro-TESE) in men with infertility due to nonobstructive azoospermia: summary of current literature. *Int Urol Nephrol* 53, 2193–2210. doi: 10.1007/s11255-021-02979-4.
- Adams, E.; Hill, E.; Watson, E.** (2013). Fertility preservation in cancer survivors: A national survey of oncologists' current knowledge, practice and attitudes. *British Journal of Cancer*.108(8), 1602-1615. doi: 10.1038/bjc.2013.139.
- Anger, J. T.; Gilbert, B. R.; Goldstein, M.** (2003). Cryopreservation of sperm: indications, methods and results. *J Urol* 170(4):1079–1084. doi: 10.1097/01.ju.0000084820.98430.b8.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária.** Sistema SisEmbrio. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/acessoainformacao/dadosabertos/informacoes-analiticas/sisembrio>>. Acesso em: 16 de dezembro de 2023. BRASIL.
- Bossi, R. L.; Pinto, B. C. V.; Sampaio, M. A. C.; Geber, S.** (2023). How to optimize culture media osmolality during Assisted Reproductive Technologies treatments. *JBRA Assist Reprod*.27(1):35-40. doi: 10.5935/1518-0557.20210123.
- Brännström, M.; Johannesson, L.; Dahm-Kähler, P.; Enskog, A.; Mölne, J.; Kvarnström, N.; Diaz-Garcia, C.; Hanafy, A.; Lundmark, C.; Marcickiewicz, J.; Gäbel, M.; Groth, K.; Akouri, R.; Eklind, S.; Holgersson, J.; Tzakis, A.; Olausson, M.** (2014). First clinical uterus transplantation trial: A six-month report. *Fertility and Sterility*, 101(5), 1228-1236. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.02.024.
- Brinster, R. L. & Avarbock, M. R.** (1994). Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91(24):11303-7. doi: 10.1073/pnas.91.24.11303.
- Brinster, R. L. & Zimmermann, J. W.** (1994). Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91(24):11298-302. doi: 10.1073/pnas.91.24.11298.

Bulletti, F. M.; Berrettini, M.; Sciorio, R.; Bulletti, C. (2023). Artificial intelligence algorithms for optimizing assisted reproductive technology programs: A systematic review. *Global Translational Medicine* 2023, 2(2), 0308. doi: 10.36922/gtm.0308.

Dolmans, M.M. & Manavella, D. D. (2018). Recent advances in fertility preservation. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* Vol. 45, No. 2: 266–279. doi: 10.1111/jog.13818J.

Donnez, J.; Jadoul, P.; Pirard, C.; Hutchings, G.; Demylle, D.; Squifflet, J.; Smitz, J.; Dolmans, M. M. (2012). Live birth after transplantation of frozen-thawed ovarian tissue after bilateral oophorectomy for benign disease. *Fertil Steril.* 98(3):720-5. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.05.017.

Eisenberg, M. L.; Esteves, S. C.; Lamb, D. J.; Hotaling, J. M.; Giwercman, A.; Hwang, K.; Cheng, Y. (2023). Male infertility. *Nature Reviews Disease Primers*, 9(1), 1-22. doi: 10.1038/s41572-023-00459-w.

Ernandez, J.; Berk, B.; Han, T.; Ghayda, R. A.; Kathrins, M. (2021). Evaluating the quality of reported outcomes for microsurgical TESE in men with non-obstructive azoospermia: A methodological analysis. *Andrology.* 9(4), 1108-1118. doi: 10.1111/andr.12997.

Ethics Committee of the American Society for Reproductive Medicine. (2015). Disparities in access to effective treatment for infertility in the United States: an Ethics Committee opinion. *Fertil Steril.* 104(5):1104-10. doi: 10.1016/j.fertnstert.2015.07.1139.

Fu, L.; An, Q.; Zhang, K.; Liu, Y.; Tong, Y.; Xu, J.; Zhou, F.; Wang, X.; Guo, Y.; Lu, W.; Liang, X.; Gu, Y. (2019). Quantitative proteomic characterization of human sperm cryopreservation: using data-independent acquisition mass spectrometry. *BMC Urol.* 19(1):133. doi: 10.1186/s12894-019-0565-2.

Galic, I.; Negris, O.; Warren, C.; Brown, D.; Bozen, A.; Jain, T. (2021). Disparities in access to fertility care: Who's in and who's out. *F&S Reports*, 2(1), 109-117. doi: 10.1016/j.xfre.2020.11.001.

Gholami, K.; Solhjoo, S.; Aghamir, S. M. K. (2022). Application of Tissue-Specific Extracellular Matrix in Tissue Engineering: Focus on Male Fertility Preservation. *Reprod Sci.* 29(11):3091-3099. doi: 10.1007/s43032-021-00823-9.

Gil-Salom, M.; Romero, J.; Ménguez, Y.; Rubio, C.; De los Santos, M. J.; Remohé, J.; Pellicer, A. (1996). Pregnancies after intracytoplasmic sperm injection with cryopreserved testicular spermatozoa. *Human Reproduction*. Vol 11, I 6, Pages 1309–1313. doi: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a019377.

González-Ravina, C.; Santamaría-López, E.; Pacheco, A.; Ramos, J.; Carranza, F.; Murria, L.; Ortiz-Vallecillo, A.; Fernández-Sánchez, M. (2022). Effect of Sperm Selection by Magnetic-Activated Cell Sorting in D-IUI: A Randomized Control Trial. *Cells*, 11(11). doi: 10.3390/cells11111794.

Grin, L.; Girsh, E.; Harlev, A. (2020). Male fertility preservation - Methods, indications and challenges. *Andrologia*. Vol 53, Pages 1-11. doi:10.1111/and.13635.

Guo, Y.; Liu, L.; Sun, M.; Hai, Y.; Li, Z.; He, Z. (2015). Expansion and long-term culture of human spermatogonial stem cells via the activation of SMAD3 and AKT pathways. *Experimental Biology and Medicine*. 240(8), 1112-1122. doi: 10.1177/1535370215590822.

Hossain, A. & Nagamani, M. (2008). Cryopreservation of male gametes. In *Infertility and Assisted Reproduction* (pp. 466-477). Cambridge University Press. doi: 10.1017/CBO9780511547287.054.

Huang, C.; Gan, X.; Hu, L.; Liu, F.; Hong, Y.; Zhu, B.; Li, Z. (2022). Clinical benefit for cryopreservation of single human spermatozoa for ICSI: A systematic review and meta-analysis. *Andrology*, 10(1), 82-91. doi: 10.1111/andr.13091.

Huang, C.; Xu, Y. C.; Kuang, L. H.; Lan, Q. Y.; Hu, J.; Zhu, W.; Fan, L.; Li, Q. (2022). Practices, Attitudes, and Knowledge Among Healthcare Providers and Oncologists in China Regarding Male Fertility Preservation. *Frontiers in Reproductive Health*, 4, 801378. doi: 10.3389/frph.2022.801378.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2023 – Incidência de Câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. – Rio de Janeiro: INCA, 2022.

Ivanova, A.; Simonenko, E.; Yakovenko, S.; Spiridonov, V. (2023). Problems of human spermatozoa cryopreservation: research methods, solutions. *Biophys Rev* 15, 1223–1232. doi: 10.1007/s12551-023-01133-x.

Jamsai, D.; O'Bryan, M. K. (2011). Mouse models in male fertility research. *Asian J Androl.* 13(1):139-51. doi: 10.1038/aja.2010.101.

Juliá, M. G.; Hervas, I.; Navarro-Gomezlechón, A.; Mossetti, L.; Quintana, F.; Amoros, D.; Pacheco, A.; Gonzalez-Ravina, C.; Rivera-Egea, R.; Garrido, N. (2023). Semen processing using magnetic-activated cell sorting before ICSI is deemed safe for obstetric and perinatal outcomes: A retrospective multicentre study. *Reproductive BioMedicine Online*, 47(2), 103172. doi: 10.1016/j.rbmo.2023.01.022.

Kaltsas, A.; Moustakli, E.; Zikopoulos, A.; Georgiou, I.; Dimitriadis, F.; Symeonidis, E.N.; Markou, E.; Michaelidis, T.M.; Tien, D.M.B.; Giannakis, I. (2023). Impact of Advanced Paternal Age on Fertility and Risks of Genetic Disorders in Offspring. *Genes* 14, 486. doi: 10.3390/genes14020486.

Kuleshova, L.; Gianaroli, L.; Magli, C.; Ferraretti, A.; Trounson, A. (1999). Birth following vitrification of a small number of human oocytes: Case Report. *Human Reproduction*, 14(12), 3077-3079. doi: 10.1093/humrep/14.12.3077.

Martin-Inaraja, M.; Ferreira, M.; Taelman, J.; Eguizabal, C.; Lopes, S. M. C. S. (2021). Improving In Vitro Culture of Human Male Fetal Germ Cells. *Cells*. 10(8):2033. doi: 10.3390/cells10082033.

Martins, A. D.; Agarwal, A.; Henkel, R. (2019). Sperm Cryopreservation. In: Nagy, Z., Varghese, A., Agarwal, A. (eds) *In Vitro Fertilization*. Springer, Cham. doi: 10.1007/978-3-319-43011-9_51

McBride, A. J. & Lipshultz, L. I. (2018). Male Fertility Preservation. *Curr Urol Rep* 19, 49. doi: 10.1007/s11934-018-0803-2.

Medrano, J. V.; Rombaut, C.; Simon, C.; Pellicer, A.; Goossens, E. (2016). Human spermatogonial stem cells display limited proliferation in vitro under mouse spermatogonial stem cell culture conditions. *Fertil Steril.* 106(6):1539-1549.e8. doi: 10.1016/j.fertnstert.2016.07.1065.

Mikhael, S.; Gaidis, A.; Gavrilova-Jordan, L. (2021). Regional disparities in access to assisted reproductive technology: assessment of patient satisfaction when employing modern technology to close the gap. *J Assist Reprod Genet.* 38(4):889-894. doi: 10.1007/s10815-020-02027-7.

Moore, Keith L.; Persaud, T.V.N; Torchia, Mark G. (2022). *Embriologia Básica*. Grupo GEN. E-book. ISBN 9788595159020. Disponível em: <https://app.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788595159020/>. Acesso em: 17 jan. 2024.

Nikmahzar, A.; Khadivi, F.; Abbasi, M. (2023). Testicular Tissue Vitrification: a Promising Strategy for Male Fertility Preservation. *Reprod. Sci.* 30, 1687–1700. doi: 10.1007/s43032-022-01113-8.

Ogouma, L.; Berthaut, I.; Lévy, R.; Hamid, R. H.; Prades, M.; Audouin, M.; Sermondade, N.; Dupont, C. (2022). Testicular sperm extraction (TESE) outcomes in the context of malignant disease: a systematic review. *Asian J Androl.* 24(6):584-590. doi: 10.4103/aja2021129.

Onofre, J.; Baert, Y.; Faes, K.; Goossens, E. (2016). Cryopreservation of testicular tissue or testicular cell suspensions: A pivotal step in fertility preservation. *Human Reproduction Update*, 22(6), 744-761. doi:10.1093/humupd/dmw029.

Palermo, G.; Joris, H.; Devroey, P.; Van Steirteghem, A. (1992). Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *The Lancet*, 340(8810), 17-18. doi: 10.1016/0140-6736(92)92425-F.

Pariz, J. R.; Ranéa, C. C.; Monteiro, R. A.; Evenson, D. P.; Drevet, J. R.; Hallak, J. (2019). Melatonin and Caffeine Supplementation Used, Respectively, as Protective and Stimulating Agents in the Cryopreservation of Human Sperm Improves Survival, Viability, and Motility after Thawing compared to Traditional TEST-Yolk Buffer. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. doi: 10.1155/2019/6472945.

Plas, E.; Bergerb, P.; Hermannb, M.; Pfluger, H. (2000). Effects of aging on male fertility? *Experimental Gerontology* 35 543–551. doi: 10.1016/s0531-5565(00)00120-0.

Poiani, A. (2006). Complexity of seminal fluid: a review. *Behav Ecol Sociobiol* 60, 289–310. doi: 10.1007/s00265-006-0178-0.

Polge, C.; Smith, A. U.; Parkes, A. S. (1949). Revival of Spermatozoa after Vitrification and Dehydration at Low Temperatures. *Nature*, 164(4172), 666. doi: 10.1038/164666a0.

- Raad, G.; Lteif, L.; Lahoud, R.; Azoury, J.; Tanios, J.; Hazzouri, M. (2018).** Cryopreservation media differentially affect sperm motility, morphology and DNA integrity. *Andrology*. 2018 Nov;6(6):836-845. doi: 10.1111/andr.12531.
- Ranéa, C.; Pariz, J. R.; Drevet, J. R.; Hallak, J. (2022).** Sperm motility in asthenozoospermic semen samples can be improved by incubation in a continuous single culture medium (CSCM®). *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 68:1, 25-35. doi: 10.1080/19396368.2021.2004623.
- Richer, G.; Baert, Y.; Goossens, E. (2020).** In-vitro spermatogenesis through testis modelling: Toward the generation of testicular organoids. *Andrology*. 8(4), 879-891. doi: 10.1111/andr.12741.
- Romero, J.; Remohí, J.; Mínguez, Y.; Rubio, C.; Pellicer, A.; Gil-Salom, M. (1996).** Fertilization after intracytoplasmic sperm injection with cryopreserved testicular spermatozoa. *Fertil Steril*. 65(4):877-9. doi: 10.1016/s0015-0282(16)58232-6. PMID: 8654657.
- Santiago, J.; Silva, J. V.; Alves, M. G.; Oliveira, P. F.; Fardilha, M. (2019).** Testicular Aging: An Overview of Ultrastructural, Cellular, and Molecular Alterations. *The Journals of Gerontology*. Vol 74, I 6, P 860–871. doi: 10.1093/gerona/gly082.
- Schlegel, P. N. & Li, P. S. (1998).** Microdissection TESE: sperm retrieval in non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod Update*. 4(4):439. doi: 10.1093/humupd/4.4.439.
- Schoysman, R.; Vanderzwalmen, P.; Nijs, M.; Segal, L.; Segal-Bertin, G.; Geerts, L.; van Roosendaal, E.; Schoysman D. (1993).** Pregnancy after fertilization with human testicular spermatozoa. *Lancet* 13;342(8881):1237. doi: 10.1016/0140-6736(93)92217-h.
- Schulz, M.; Risopatrón, J.; Uribe, P.; Isachenko, E.; Isachenko, V.; Sánchez, R. (2020).** Human sperm vitrification: A scientific report. *Andrology*, 8(6), 1642-1650. doi: 10.1111/andr.12847.
- Steptoe, P. & Edwards, R. (1978).** BIRTH AFTER THE REIMPLANTATION OF A HUMAN EMBRYO. *The Lancet*, 312(8085), 366. doi: 10.1016/S0140-6736(78)92957-4.

- Tamburrino, L.; Traini, G.; Marcellini, A.; Vignozzi, L.; Baldi, E.; Marchiani, S.** (2023). Cryopreservation of Human Spermatozoa: Functional, Molecular and Clinical Aspects. *Int. J. Mol. Sci.*, 24, 4656. doi: 10.3390/ijms24054656.
- Tanaka, A.; Suzuki, K.; Nagayoshi, M.; Tanaka, A.; Takemoto, Y.; Watanabe, S.; Takeda, S.; Irahara, M.; Kuji, N.; Yamagata, Z.; Yanagimachi, R.** (2018). Ninety babies born after round spermatid injection into oocytes: survey of their development from fertilization to 2 years of age. *Fertil Steril.* 110(3):443-451. doi: 10.1016/j.fertnstert.2018.04.033.
- Tharakan, T.; Luo, R.; Jayasena, C. N.; Minhas, S.** (2021). Non-obstructive azoospermia: current and future perspectives. *Fac Rev.* 2021 Jan 26;10:7. doi: 10.12703/r/10-7.
- Tran, K. T. D.; Valli-Pulaski, H.; Colvin, A.; Orwig, K. E.** (2022). Male fertility preservation and restoration strategies for patients undergoing gonadotoxic therapies. *Biol Reprod.* 107(2):382-405. doi: 10.1093/biolre/ioac072.
- Trounson, A. & Mohr, L.** (1983). Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature*, 305(5936), 707-709. doi: 10.1038/305707a0.
- Wang, A. W.; Zhang, H.; Ikemoto, I.; Anderson, D. J.; Loughlin, K. R.** (1997). Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation. *Urology.* 49(6):921-5. doi: 10.1016/s0090-4295(97)00070-8.
- World Health Organization.** WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen, 6th ed.; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2021.
- Wright, R. W.; Brand, R. A.; Dunn, W; Spindler, K. P.** (2007). How to Write a Systematic Review. *Clinical Orthopaedics and Related Research.* Vol 455, P 23-29. doi: 10.1097/BLO.0b013e31802c9098.
- Younis, N.; Caldeira-Brant, A. L.; Chu, T.; Abdalla, S.; Orwig, K. E.** (2023). Human immature testicular tissue organ culture: a step towards fertility preservation and restoration. *Front Endocrinol (Lausanne).* 14:1242263. doi: 10.3389/fendo.2023.1242263.

Yuan, Y.; Li, L.; Cheng, Q.; Diao, F.; Zeng, Q.; Yang, X.; Wu, Y.; Zhang, H.; Huang, M.; Chen, J.; Zhou, Q.; Zhu, Y.; Hua, R.; Tian, J.; Wang, X.; Zhou, Z.; Hao, J.; Yu, J.; Hua, D.; Liu, J.; Guo, X.; Zhou, Q.; Sha, J. (2020). In vitro testicular organogenesis from human fetal gonads produces fertilization-competent spermatids. *Cell Res.* (3):244-255. doi: 10.1038/s41422-020-0283-z.

Zeilmaker, G. H.; Alberda, A. T.; Van Gent, I.; Rijkmans, C. M.; Drogendijk, A. C. (1984). Two pregnancies following transfer of intact frozen-thawed embryos. *Fertility and Sterility*, 42(2), 293-296. doi: 10.1016/S0015-0282(16)48029-5.

Zribi, N.; Chakroun, N. F.; El Euch, H.; Gargouri, J.; Bahloul, A.; Keskes, L. A. (2010). Effects of cryopreservation on human sperm deoxyribonucleic acid integrity. *Fertil Steril.* 93(1):159-66. doi: 10.1016/j.fertnstert.2008.09.038.