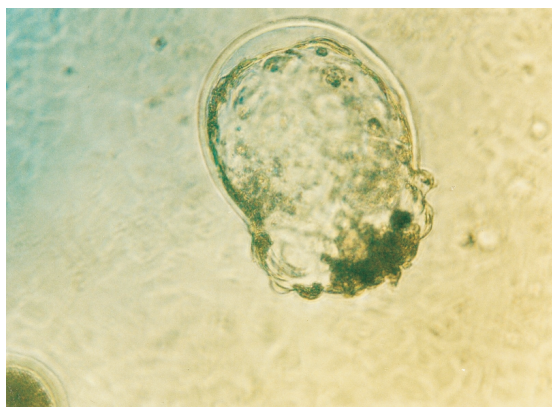
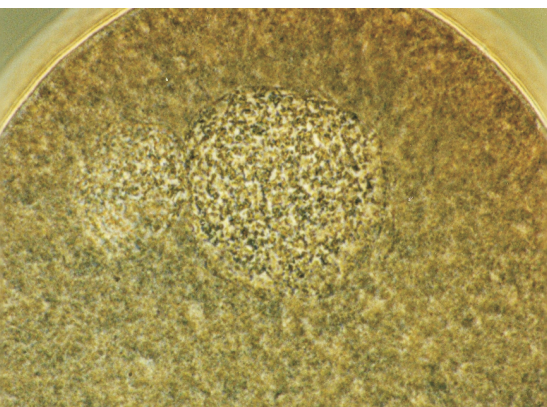
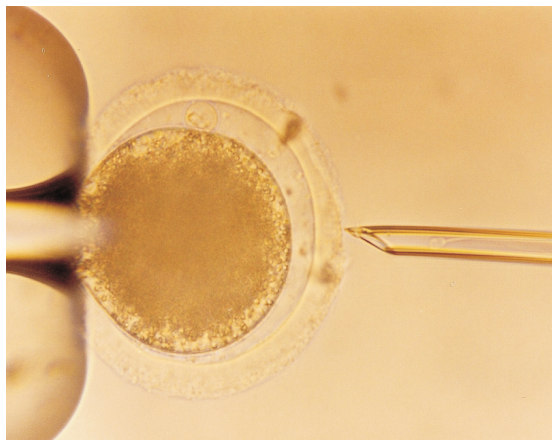
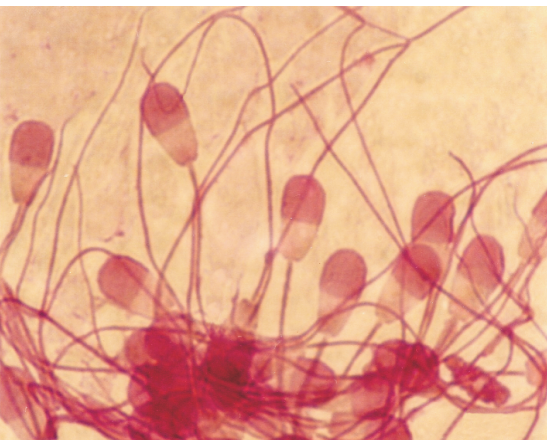


### Conservação de Espermatozóides Bovinos por Liofilização (*freeze-drying*)



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Cerrados  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

## ***Documentos 216***

# **Conservação de Espermatozóides Bovinos por Liofilização (*freeze-drying*)**

*Carlos Frederico Martins  
Margot Nunes Dode  
Roberto Guimarães Júnior  
Sônia Nair Bão  
José Robson Bezerra Sereno  
Rodolfo Rumpf*

Embrapa Cerrados  
Planaltina, DF  
2008

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Cerrados**

BR 020, Km 18, Rod. Brasília/Fortaleza

Caixa Postal 08223

CEP 73310-970 Planaltina, DF

Fone: (61) 3388-9898

Fax: (61) 3388-9879

<http://www.cpac.embrapa.br>

[sac@cpac.embrapa.br](mailto:sac@cpac.embrapa.br)

**Comitê de Publicações da Unidade**

Presidente: *José de Ribamar N. dos Anjos*

Secretária-Executiva: *Maria Edilva Nogueira*

Supervisão editorial: *Fernanda Vidigal Cabral de Miranda*

Equipe de Revisão: *Fernanda Vidigal Cabral de Miranda*

*Francisca Elijani do Nascimento*

*Jussara Flores de Oliveira Arbués*

Normalização bibliográfica: *Rosângela Lacerda de Castro*

*Marilaine Schaun Pelufé*

Tratamento de ilustrações: *Wellington Cavalcanti*

Editoração eletrônica: *Wellington Cavalcanti*

Capa: *Wellington Cavalcanti*

Foto(s) da capa: *Carlos Frederico Martins*

Impressão e acabamento: *Divino Batista de Sousa*

*Jaime Arbués Carneiro*

Impresso no Serviço Gráfico da Embrapa Cerrados

**1ª edição**

1ª impressão (2007): tiragem 100 exemplares

**Todos os direitos reservados**

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

**Embrapa Cerrados**

---

C755 Conservação de espermatozóides bovinos por liofilização (freeze-drying) / Carlos Frederico Martins... [et al.]. – Planaltina, DF : Embrapa Cerrados, 2008.

30 p.— (Documentos / Embrapa Cerrados, ISSN 1517-5111 ; 216).

1. Genética animal. 2. Liofilização. 3. Criopreservação. 4. Reprodução animal. I. Martins, Carlos Frederico. II. Série.

---

636.082 - CDD 21

© Embrapa 2008

# **Autores**

## **Carlos Frederico Martins**

Médico Veterinário, D.Sc.

Pesquisador da Embrapa Cerrados

carlos.frederico@cpac.embrapa.br

## **Margot Alves Nunes Dode**

Médica Veterinária, Ph.D.

Pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e  
Biotecnologia

margot.dode@pq.cnpq.br

## **Roberto Guimarães Júnior**

Médico Veterinário, D.Sc.

Pesquisador da Embrapa Cerrados

guimarães@cpac.embrapa.br

## **Sônia Nair Bão**

Bióloga, Ph.D.

Professora da Universidade de Brasília (UnB)

snbao@pq.cnpq.br

**José Robson Bezerra Sereno**

Médico Veterinário, Ph.D.

Pesquisador da Embrapa Cerrados

[sereno@cpac.embrapa.br](mailto:sereno@cpac.embrapa.br)

**Rodolfo Rumpf**

Médico Veterinário, Ph.D.

Pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e  
Biotecnologia

[rodolfo@cenargen.embrapa.br](mailto:rodolfo@cenargen.embrapa.br)

# **Apresentação**

A liofilização é um método que visa à preservação celular pela retirada da água dos sistemas biológicos por sublimação do gelo. Recentemente, a liofilização tem sido aplicada para preservar espermatozóides de mamíferos, representando uma ferramenta alternativa para conservação do material genético. Existem poucos estudos dessa técnica com bovinos. É um método que ainda encontra-se em desenvolvimento, mas que poderá revolucionar a criobiologia, quando estabelecido. Dessa forma, esta publicação tem a finalidade de apresentar a técnica de liofilização de espermática, as vantagens e as dificuldades, bem como demonstrar os estudos realizados de forma pioneira com essa tecnologia, nos laboratórios da Embrapa.

*Roberto Teixeira Alves*  
Chefe-Geral da Embrapa Cerrados

# Sumário

Introdução.....	9
Estrutura Espermática Bovina.....	10
Criopreservação Convencional .....	12
Liofilização Espermática .....	14
Substâncias Núcleo-protetoras na Liofilização .....	18
Estudos de Conservação de Espermatozóides Bovinos por Liofilização no Brasil.....	19
Considerações Finais .....	25
Referências .....	26
Abstract .....	30

# Conservação de Espermatozóides Bovinos por Liofilização (*freeze-drying*)

---

*Carlos Frederico Martins*

*Margot Nunes Dode*

*Roberto Guimarães Júnior*

*Sônia Nair Bão*

*José Robson Bezerra Sereno*

*Rodolfo Rumpf*

## Introdução

Os métodos convencionais de criopreservação de espermatozóides, tanto animais quanto humanos, dependem do nitrogênio líquido para manter a viabilidade dos gametas, demandando maiores cuidados no armazenamento e transporte, tornando mais caro o processo.

Vários grupos de pesquisa vêm buscando alternativas mais econômicas e simples que permitam a preservação do gameta animal na sua integridade e que facilitem o armazenamento em temperatura ambiente. Inserindo-se nesses propósitos, o processo de liofilização espermática (desidratação a vácuo em baixas temperaturas) tem sido o principal objeto de estudo para a conservação de gameta animal masculino, uma vez que apresenta muitos benefícios.

O estabelecimento da conservação espermática por liofilização ou “freeze-drying sperm” poderá ser útil em diversos campos de atuação, sendo possível citar as seguintes vantagens: (1) facilidade de transporte dentro do país ou entre países, proporcionando importação ou exportação de importantes linhagens genéticas; (2) custo de armazenamento menor, pois não há necessidade de nitrogênio líquido; (3) estudos em biologia molecular e reprodução assistida animal e humana; (4) conservação de linhagens com genética superior, espécies



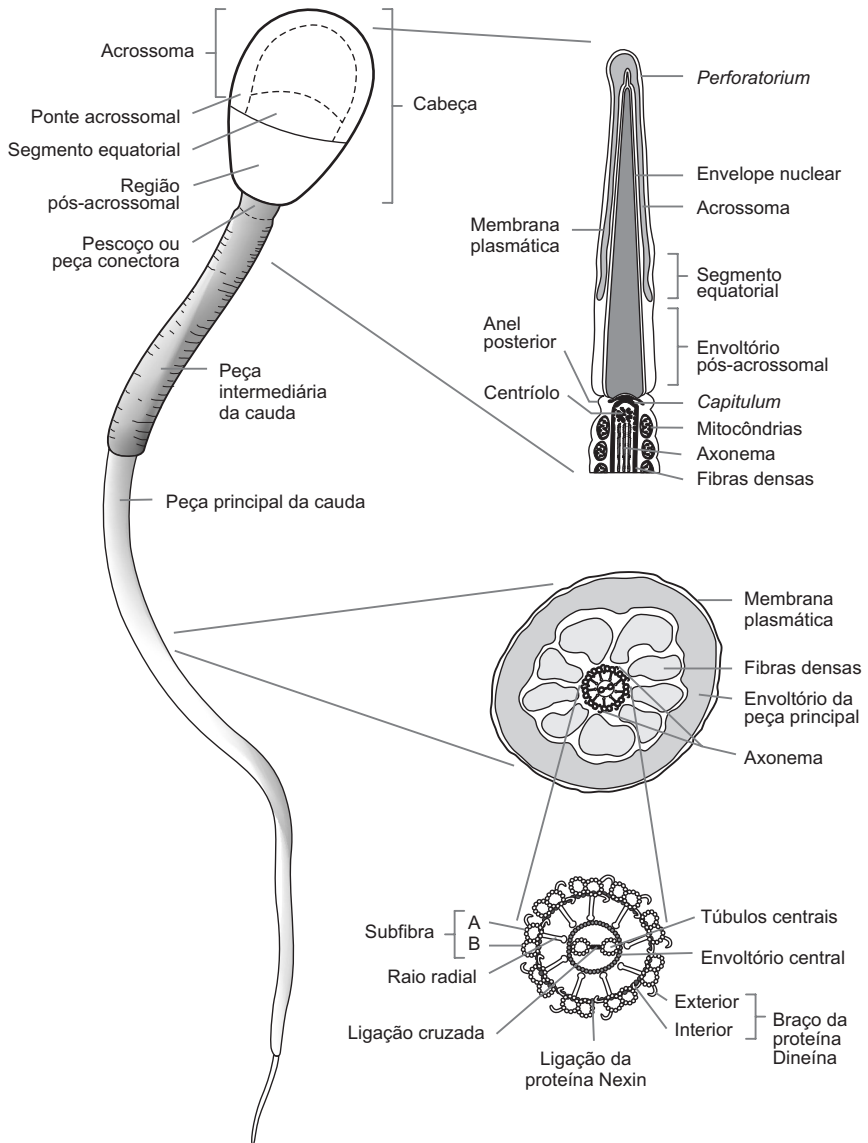
e raças raras ou linhagens transgênicas (estabelecimento de banco de recursos genéticos); (5) estudo de caracterização de espécies-raças por meio de marcadores genéticos.

Apesar do número crescente de pesquisas nessa área, há muito que se avançar, especialmente na espécie bovina. Atualmente, existem estudos com várias espécies, no entanto somente há descendentes nascidos de espermatozóides liofilizados em camundongos e coelhos.

Portanto, este trabalho tem por objetivo fazer uma revisão bibliográfica sobre o processo de liofilização de espermatozóides e trazer informações sobre a situação atual da conservação de espermatozóides por liofilização no mundo e no Brasil, por intermédio dos estudos realizados na Embrapa.

## **Estrutura Espermática Bovina**

A principal característica da cabeça do espermatozóide é o núcleo achatado de forma oval, que contém a cromatina altamente compactada. A cromatina condensada compreende um complexo de DNA com uma classe especial de proteínas conhecidas como protaminas. A extremidade anterior do núcleo espermático é recoberta pelo acrossomo, uma fina cobertura com dupla camada de membranas que envolvem intimamente o núcleo durante os últimos estágios de formação do espermatozóide (Fig. 1). Essa estrutura contém enzimas hidrolíticas incluindo pró-acrosina, hialuronidase, esterases e hidrolases ácidas, envolvidas no processo de fecundação. Durante a reação do acrossomo, a membrana externa acrossomal funde-se com o plasmalema, sob o controle intracelular e extracelular do cálcio, determinando a exocitose de todo conteúdo do acrossomo. As principais funções das enzimas acrossomais são a dispersão das células do *Cumulus oophorus* e a lise local da zona pelúcida. A membrana interna do acrossomo é relativamente estável e permanece intacta após a reação do acrossomo ter ocorrido. A penetração da zona pelúcida e fusão com o oolema são eventos mediados por receptores, com áreas específicas da cabeça do espermatozóide se aderindo aos alvos no ovócito (HAFEZ; GARNER, 1995).



**Fig. 1.** Diagrama da ultra-estrutura do espermatozóide bovino. Principais estruturas identificadas por microscopia de campo claro (a); características das ultra-estruturas da cabeça e peça conectora (b); ultra-estruturas da peça principal da cauda (c); detalhes gerais das ultra-estruturas do axonema da cauda (d).

Fonte: Bedford e Hoskins (1996).

A cauda do gameta masculino é composta de colo, peça intermediária, peça principal e terminal (Fig. 1). A região da cauda entre o colo e o *annulus* é a peça intermediária. A parte central da peça intermediária, junto com o comprimento total da cauda, forma o axonema. O axonema é composto de nove pares de microtúbulos periféricos e um par central, onde a proteína dineína é responsável pela transformação da energia química em mecânica. Todo esse conjunto é recoberto, externamente, por numerosas mitocôndrias dispostas em forma de hélice, que geram a energia necessária para a motilidade espermática.

A peça principal, que continua posteriormente do *annulus* e se estende até a parte terminal da cauda, é composta, centralmente, do axonema e de sua associação de fibras. A peça terminal, que é posterior à membrana fibrosa, contém somente o axonema recoberto pela membrana plasmática (HAFEZ; GARNER, 1995).

## Criopreservação Convencional

O espermatozóide é uma célula altamente polarizada e especializada com uma estrutura tripartida em cabeça, peça intermediária e cauda. Esse gameta perde a habilidade de biossíntese, de reparo, de crescimento e de divisão celular durante a fase final da espermatogênese. Dessa forma, a conservação de espermatozóides requer uma redução ou atraso do metabolismo das células espermáticas para gerar um prolongamento de sua vida (YOSHIDA, 2000).

O relativo sucesso alcançado com a criopreservação de sêmen tem permitido avanços significativos no campo da agropecuária, tornando possível a troca internacional de germoplasma de animais geneticamente superiores; da biotecnologia, por permitir uma eficiente estocagem de linhagens de murinos cientificamente importantes; da conservação de espécies em risco de extinção, por meio do banco de recursos genéticos; e da medicina reprodutiva humana (WOODS et al., 2004).

Um dos mais importantes princípios da criopreservação reside na necessidade de se remover o máximo possível de água das células antes de se proceder seu congelamento. Se essa desidratação não ocorrer, grandes cristais de gelo se formarão lesando severamente a estrutura intracelular. No entanto, a remoção demasiada de água das células também pode ser deletéria (SEIDEL, 1986).

Vários aspectos da criopreservação espermática têm sido estudados, tais como a composição química dos diluentes e seus efeitos sobre a membrana plasmática, os limites de tolerância osmótica, a condutividade hídrica e a permeabilidade dos crioprotetores (GILMORE et al., 2000). Esses estudos sugerem que os espermatozóides de cada espécie têm diferentes propriedades criobiológicas, bem como apresentam variação quanto à sensibilidade à manipulação (exemplo: pipetagem, centrifugação), à tolerância osmótica e à sensibilidade ao resfriamento (KATKOV; MAZUR, 1999; PHELPS et al., 1999).

De maneira geral, o sucesso da criopreservação da célula depende da velocidade do congelamento e da composição da solução onde as células são congeladas. Inicialmente, a água extracelular se congela no momento em que a célula se aproxima do ponto de congelamento, resultando em remoção do líquido extracelular, fato que acarreta um aumento de osmolaridade. Com esse desequilíbrio osmótico, a água é retirada da célula para o compartimento extracelular, ocasionando uma diminuição do volume celular. Uma adequada desidratação celular depende da velocidade do congelamento, de forma a não provocar uma lise da célula. No caso de um congelamento muito lento, o equilíbrio permanecerá constante e a célula ficará exposta ao crioprotetor e ao estresse osmótico por tempo prolongado, fato que poderá acarretar a morte celular. Ao contrário, no caso de congelamento muito rápido, a desidratação será insuficiente e causará a formação de gelo intracelular, levando à lise da célula na ocasião do descongelamento (LOPEZ-BEJAR et al., 1994). Para evitar o dano celular, mesmo com uma velocidade de descongelamento controlada, há necessidade do emprego de crioprotetores.

A criopreservação espermática tem sido associada com sucesso às tecnologias reprodutivas humanas e bovinas. A maioria dos protocolos utiliza uma curva lenta de resfriamento inicial (exemplo: 1 °C/min a 5 °C/min), que começa a partir da temperatura corporal ou temperatura ambiente até atingir a temperatura de solidificação. Em seguida, após a formação inicial de gelo, a adoção de uma taxa de resfriamento mais rápida é necessária (exemplo: 100 °C/min a 200 °C/min), na presença de glicerol tamponado com gema de ovo (fonte de fosfolipídios) e citrato de sódio. Com esse procedimento, a taxa de sucesso tem sido satisfatória nessas espécies quando o sêmen congelado é utilizado na inseminação artificial ou fecundação *in vitro* (HOLT, 2000).

Um protocolo padrão tem sido idealizado para a criopreservação de sêmen de todas as espécies. Entretanto, aqueles destinados à criopreservação de sêmen de mamíferos apresentam limitações e produzem taxas de sucesso que variam entre as espécies e até individualmente dentro da mesma espécie. Em algumas espécies, como a suína, um método apropriado ainda está por ser determinado, enquanto, em outras espécies, como a murina, um método que parece ser apropriado para uma linhagem falha para outra (CRITSER; MOBRAATEN, 2000). Essas informações indicam que o exame das propriedades criobiológicas dos espermatozóides, bem como o exame da exata natureza da crio-injúria espécie-específica, deve ser realizado para se determinar um apropriado protocolo de criopreservação (HOLT, 2000).

## Liofilização Espermática

A criopreservação, como método de conservação de espermatozóides, revolucionou a pecuária, bem como a medicina reprodutiva. Espermatozóides congelados e posteriormente descongelados podem readquirir sua motilidade e serem utilizados para fecundação. Longos períodos de armazenamento em nitrogênio líquido têm sido utilizados rotineiramente para armazenar sêmen humano e animal, o que requer uma constante reposição do nitrogênio líquido, que é de difícil aquisição em muitas circunstâncias e em muitas partes do mundo. Sendo assim,

buscando uma alternativa mais barata e fácil, têm sido realizadas várias tentativas no sentido de possibilitar a estocagem de espermatozóides por tempo indeterminado, em temperatura ambiente (WAKAYAMA et al., 1998).

Polge et al. (1949) foram os primeiros a tentar o congelamento a seco de espermatozóides. Em seu experimento, sêmen de um galináceo foi misturado com igual volume de solução de Ringer contendo 20 % a 30 % de glicerol e submetido a congelamento a seco, removendo 90 % da água da solução. Nas preparações de re-hidratação, 50 % dos espermatozóides readquiriram a sua motilidade, entretanto a fertilidade não foi testada. Subseqüentes tentativas para congelar a seco espermatozóides humanos e de bovinos, para obtenção de células viáveis, falharam (BIALY; SMITH, 1957).

Goto et al. (1990) revolucionaram os sistemas de conservação de gametas masculinos ao sugerirem que não há necessidade que os espermatozóides estejam vivos no sentido convencional para proporcionar um desenvolvimento embrionário normal. Essa teoria foi comprovada, por esses pesquisadores, quando reportaram o nascimento de dois bezerros normais após microinjeção de espermatozóides mortos por congelamento e descongelamento sem crioprotetor.

Da mesma forma, Katayose et al. (1992) mostraram que núcleos de espermatozóides de hamster e humanos congelados a seco retinham sua habilidade para se desenvolver em pró-núcleo e sintetizar DNA, quando microinjetados em ovócitos após seis meses de estocagem. Nesse mesmo trabalho, espermatozóides de camundongo foram depositados em diluidor sem crioprotetor e mergulhados em nitrogênio líquido. Apesar de todas as células terem sido consideradas mortas, utilizando-se corante de exclusão de vivos e mortos, houve desenvolvimento normal após injeção de suas cabeças em ovócitos, ficando comprovado que a viabilidade celular e nuclear não são sinônimos.

Wakayama et al. (1998) demonstraram que a motilidade espermática e a integridade da membrana plasmática, após o congelamento e descongelamento sem crioprotetor, não são essenciais para a fecundação e desenvolvimento de descendentes saudáveis. Nesse caso, uma progênie de camundongo nasceu a partir da microinjeção de espermatozóides, até então chamados de não viáveis, por terem sido considerados mortos.

Wakayama et al. (1998), baseados no conhecimento de que, em camundongos e bovinos, o núcleo espermático é estabilizado por extensivas pontes de dissulfeto durante a maturação epididimal, propuseram que estes gametas resistiriam ao estresse físico de um método de conservação mais agressivo que os atuais. Assim, eles demonstraram que espermatozóides de camundongo podem ser conservados pelo processo de liofilização, sem perder seu potencial genético e reprodutivo. Quando espermatozóides da cauda do epidídimo foram liofilizados e então re-hidratados nenhum estava móvel e muitos apresentaram as cabeças separadas da cauda. Portanto, espermatozóides liofilizados com presença de cauda foram selecionados e a cabeça foi separada da cauda por alguns pulsos piezo-elétricos na região do pescoço. Somente a cabeça do espermatozóide foi microinjetada em ovócito, sendo que a maioria dos ovócitos sobreviveu à operação e foram fertilizados, ocorrendo o desenvolvimento de mórula e blastocistos *in vitro* que, depois de transferidos para animais receptores, proporcionaram vários nascimentos.

Espermatozóides de camundongo liofilizados com EGTA [ethylene glycol-bis( $\beta$ -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid] mantiveram a integridade cromossomal e quase 100 % dos ovócitos microinjetados apresentaram cariótipo normal (KUSAKABE et al., 2001). Dessa forma, a tolerância do núcleo espermático à liofilização tem sido atribuída à condição de ligação das pontes de dissulfeto com as protaminas, que são bem estáveis nos espermatozóides maduros (KANEKO et al., 2003a).

O valor do pH da solução de liofilização parece influenciar também a integridade cromossômica. Assim sendo, Kaneko et al. (2003b), estudando esse parâmetro em camundongos, observaram que a integridade dos cromossomos espermáticos e a habilidade de desenvolvimento são melhores quando os espermatozóides são liofilizados em meio levemente alcalino (pH entre 8 e 8,2).

Keskintepe et al. (2002) liofilizaram espermatozóides bovinos em solução rica em aminoácidos e os microinjetaram dentro de ovócitos bovinos maturados *in vitro* e com subsequente ativação com 10  $\mu\text{M}$  de ionomicina e posterior incubação com 1,9  $\mu\text{M}$  de 6-dimethylaminopurine (6DMAP). Com esses procedimentos, esse grupo observou a formação de embriões com 4 a 8 células (43 %), mórulas (19,7 %) e blastocistos (11,4 %). Esses resultados indicaram que os espermatozóides bovinos suportam o processo de liofilização e também são capazes de gerar um desenvolvimento embrionário normal.

Utilizando a técnica de injeção intracitoplasmática com espermatozóides liofilizados de suíno, Kwon et al. (2004) demonstraram a possibilidade de ovócitos suínos serem ativados, com subsequente formação do pró-núcleo masculino. Entretanto, nesse caso, o percentual de ativação foi inferior quando comparado com o percentual para espermatozóides não liofilizados e poucos conseguiram atingir a fase de blastocisto. Esse achado permitiu concluir que durante o processo de liofilização ocorreu a destruição ou inativação de fatores ativadores do ovócito, localizados na cabeça espermática, dificultando a ativação e o desenvolvimento embrionário.

Liu et al. (2004) reportaram o nascimento de coelhos por ICSI (Introcytoplasmic Sperm Injection) de espermatozóides liofilizados. Esse fato indicou a possibilidade de adequada conservação e desenvolvimento final a partir de espermatozóides de espécies não roedoras, o que até então não havia ocorrido. No entanto, a eficiência da ICSI em coelhos utilizando espermatozóides liofilizados foi de apenas 0,4 %.



Recentemente foi demonstrado que espermatozóides liofilizados de camundongos e bovinos podem manter totalmente sua capacidade de induzir a oscilação de cálcio no citoplasma de ovócitos em Metáfase II, quando microinjetados com essas gametas. Essa oscilação de cálcio é de fundamental importância para o desenvolvimento normal de ovócitos fecundados (LIU et al., 2005).

## **Substâncias Núcleo-protetoras na Liofilização**

Estudos indicam que um núcleo espermático intacto pode ser a única condição necessária para um desenvolvimento embrionário bem sucedido, mesmo após a motilidade e integridade de membrana dos espermatozóides estarem comprometidas (KUSAKABE et al., 2001). Dessa forma, torna-se importante a identificação e subsequente otimização dos componentes críticos que estão envolvidos na estabilização do núcleo do espermatozóide armazenado (BHOWMICK et al., 2003). A estabilidade da matriz nuclear é fundamental no desenvolvimento do ovócito e conseqüente produção de descendentes e parece ser influenciada pelo meio em que os espermatozóides são desidratados (WARD et al., 1999).

Uns dos primeiros componentes descritos como protetores nucleares, durante a liofilização espermática, foram o soro fetal bovino (SFB) e a albumina sérica bovina (Bovine Serum Albumin, BSA). A presença desses componentes do meio de liofilização pode fornecer alguma proteção ao núcleo espermático (WAKAYAMA et al., 1998).

A água desempenha uma importante função na manutenção da integridade estrutural e funcional das membranas biológicas. A remoção da água por desidratação ou congelamento freqüentemente resulta em vasta alteração estrutural e funcional nas membranas biológicas. No entanto, muitos organismos expostos a essas condições acumulam compostos que previnem alterações deletérias nas membranas durante os estados de água reduzida. Um desses compostos, a trehalose, é um dissacarídeo da glicose, comumente encontrado em altas concentrações em muitos organismos que sofrem completa desidratação. Nesses

organismos, incluem-se as leveduras e fungos esporulados (AISEN et al., 2000). O mecanismo pelo qual a trehalose protege as células submetidas à desidratação e ao congelamento parece envolver efeitos estabilizantes nas proteínas e nas membranas; no entanto, a natureza desse efeito permanece desconhecida (ABOAGLA; TERADA, 2003).

Atualmente, uma solução não fisiológica quelante de cálcio, denominada EGTA, proporciona suficiente proteção ao DNA, adequada para gerar desenvolvimento embrionário a partir de espermatozóides desidratados e ressuspensos (KUSAKABE et al., 2001). A liberação de nucleases endógenas dos espermatozóides, após liofilização ou congelamento sem crioprotetor, é a causa mais provável das aberrações cromossômicas estruturais. Maione et al. (1997) descreveram a existência de endonucleases dependentes de cálcio nos espermatozóides de camundongo. A presença de um agente quelante do cálcio em uma solução livre de cálcio e magnésio e rica em potássio provavelmente contribui para melhorar a estabilidade cromossômica nos espermatozóides liofilizados (KUSAKABE et al., 2001).

Ademais, Kaneko et al. (2003b), estudando a liofilização de espermatozóides de camundongo com EGTA, acreditaram que um alto pH pode prevenir ou diminuir a ação de substâncias como as endonucleases. Por exemplo, o pH ótimo para a DNase I é 7,0 e a enzima é estável em um pH entre 5,0 e 6,0 (KUNITZ, 1950). Como cátions bivalentes são essenciais para a atividade da DNase, agentes quelantes de cálcio como EDTA e EGTA suprimem sua atividade. A combinação de EGTA e um pH alcalino pode suprimir, de forma sinérgica, a atividade de DNase quando espermatozóides são liofilizados e suas membranas são rompidas (KANEKO et al., 2003b).

## **Estudos de Conservação de Espermatozóides Bovinos por Liofilização no Brasil**

A estabilização das células por liofilização tem sido um dos maiores objetivos da criobiologia por muitas décadas, mas o sucesso dessa técnica tem sido limitado (CROWE et al., 2001). No entanto, o

conhecimento obtido a partir do estudo da biologia molecular tem mudado esse contexto. Dentro dessa nova realidade, células somáticas, como os fibroblastos, já foram conservadas adequadamente por liofilização por algumas semanas (CHEN et al., 2001). Ademais, espermatozóides de camundongos, ratos e coelhos também já foram conservados por liofilização, e descendentes foram produzidos por intermédio da reprodução assistida.

Alguns grupos têm tentado conservar espermatozóides bovinos por meio de liofilização, em virtude da grande praticidade e economia que essa tecnologia poderia trazer para a reprodução dessa espécie de grande interesse mundial. Desde a década de 1950, a liofilização espermática tem sido testada para conservar espermatozóides de bovinos e humanos (SHERMANN, 1954, 1957). No entanto, somente em 2002, surgiu um único trabalho descrevendo a viabilidade de espermatozóides liofilizados bovinos para produzir embriões.

Em virtude das informações limitadas da liofilização espermática nos bovinos, de forma pioneira, por meio dos estudos de doutorado do Pesquisador da Embrapa Cerrados, Carlos Frederico Martins, procurou-se avaliar o impacto dessa tecnologia na viabilidade estrutural e funcional dos espermatozóides bovinos conservados com diferentes soluções protetoras. Dessa forma, foram testadas as soluções potenciais utilizadas em camundongo, compostas de soro fetal e com a solução de EGTA. Ademais, uma nova solução composta de trehalose 0,2 M foi testada para essa finalidade de proteção durante a liofilização. Esse açúcar desperta interesse, pois tem sido utilizado, com sucesso, para a liofilização de fibroblastos e para o congelamento de espermatozóides de várias espécies.

Neste estudo, foram utilizados espermatozóides frescos de touros Nelore que tivessem apresentando acima de 80 % de motilidade e menos de 10 % de anormalidades espermáticas. Cada ejaculado foi dividido em duas porções: uma porção foi criopreservada com o diluidor Tris gema glicerol e foi utilizada para o controle do experimento; a outra porção foi distribuída nos tratamentos de liofilização (1- TCM Hank's com 10 % de soro fetal bovino; 2- TCM Hank's com 0,2 M de

trehalose; e 3- Solução de EGTA). Então, as amostras foram resfriadas ao vapor de nitrogênio (aproximadamente  $-80^{\circ}\text{C}$  por 1 hora) e, em seguida, mergulhadas em nitrogênio líquido. As amostras congeladas foram inseridas imediatamente no liofilizador (Thermo Savant, Holbrook, NY, USA), previamente estabilizado a  $-40^{\circ}\text{C}$  e  $350 \times 10^{-3}$  Mbar de pressão. Após 12 a 16 horas de liofilização, os tubos, contendo as amostras, foram lacrados, protegidos da luz e estocados por três meses. Depois deste período, uma bateria de avaliações de microscopia eletrônica, de microscopia de fluorescência e ICSI foram realizadas para determinar o efeito da liofilização sobre os espermatozóides nos diferentes tratamentos.

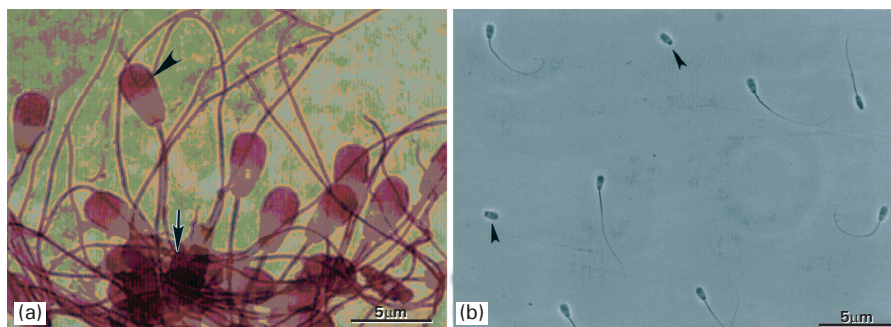
Os conhecimentos gerados a partir dessas análises e publicados por Martins et al. (2007a,b) confirmam que a liofilização ainda é uma metodologia agressiva para algumas organelas espermáticas, inviabilizando a manutenção do movimento espermático. Porém, ficou claro que é possível preservar a integridade nuclear, sendo a melhor eficiência ligada ao tipo de meio protetor utilizado.

Apesar dos meios utilizados não se mostrarem totalmente eficientes para preservar a integridade total da célula espermática, foi possível preservar o acrossoma (Fig. 2 a), uma estrutura fundamental para fecundação. Esses achados somente corroboram as informações de Hirabayashi et al. (2005), que registraram a manutenção da estrutura acrossomal dos espermatozóides liofilizados de ratos. Outros autores descrevem total comprometimento dessa estrutura em camundongos. Em bovinos, não há descrição da avaliação dessa estrutura após o processo de liofilização.

A cauda espermática é outra estrutura que tem se separado da cabeça durante a liofilização de espermatozóides em outras espécies (WAKAYAMA; YANAGIMACHI, 1998; KWON et al., 2004; LIU et al., 2004), porém neste estudo não houve um destacamento (Fig. 2 b) maior que 8 %, não havendo diferenças significativas entre os tratamentos. Esse fato está ligado a proteção oferecida pelas soluções e também diretamente relacionado com a estrutura do espermatozoide bovino, que deve ter uma maior resistência nessa região de ligação entre cabeça e cauda.

Em todos os outros trabalhos de liofilização espermática, não há a descrição da integridade das mitocôndrias, porém os resultados dessa tese demonstraram que as mitocôndrias foram estruturalmente preservadas em todos os tratamentos, indicando que o procedimento de liofilização utilizado foi adequado e todos os meios ofereceram suficiente proteção.

Os microtúbulos foram estruturas que se alteraram nos tratamentos com EGTA e trehalose, porém se mantiveram normais no tratamento com soro fetal bovino e TCM 199. A literatura não faz descrições dessa estrutura em relação ao processo de liofilização, porém uma possível explicação estaria relacionada com uma maior sensibilidade dos microtúbulos às soluções protetoras. As soluções contendo trehalose e EGTA são hipertônicas e com pH alcalino, e essas características podem ter afetado esta estrutura.



Fotos: Carlos Frederico Martins

**Fig. 2.** Espermatozóides liofilizados com meio contendo EGTA, onde as setas indicam a retenção da estrutura acrossomal e uma aglomeração espermática típica dessa solução de proteção (a); espermatozóides liofilizados com meio contendo trehalose, onde as setas indicam a separação da cauda de alguns espermatozóides (b).

O núcleo espermático foi mais bem conservado quando as soluções com trehalose e EGTA foram utilizadas. A conservação dos espermatozóides bovinos com a presença de 0,2 M de trehalose demonstrou que 95 % dos espermatozóides apresentaram o DNA intacto. Tem sido proposto que a trehalose pode proteger os sistemas biológicos durante a desidratação por formar uma matriz inerte e

estável, que protege as proteínas e lipídeos, pois previne a fase de transição ou cristalização. A trehalose pode também se ligar ao hidrogênio na porção polar das proteínas e lipídeos, evitando a ocorrência da fusão ou desnaturação. Neste trabalho, a solução protetora com 0,2 M de trehalose não evitou os danos na membrana plasmática, no entanto garantiram a estabilidade nuclear por proteger as proteínas nucleares, especialmente as protaminas da cromatina.

A solução de EGTA tem sido preferida para liofilização de espermatozóides de camundongos (SZCZYGIEL et al., 2002). Os resultados dessa tese com a solução de EGTA e a solução de trehalose são inéditos para bovinos, sendo agora indicadas para a conservação nuclear dos espermatozóides dessa espécie. Os resultados obtidos com a solução de EGTA em espermatozóides bovinos confirmam os resultados obtidos em camundongos (KANEKO et al., 2003b; KUSAKABE; KAMIGUCHI, 2004). Essa solução tem sido adequada para manutenção da integridade nuclear, pois confere proteção ao espermatozóide durante o processo de liofilização e especialmente após, pois tem importante função na inibição das endonucleases (SZCZYGIEL et al., 2002; KUSAKABE; KAMIGUCHI, 2004), evitando assim a morte celular.

Com a perda de motilidade dos espermatozóides durante o processo de liofilização, a utilização destes para a produção de embriões depende da ICSI. Dessa forma, a única exigência para a realização da ICSI é a presença de um núcleo intacto. Portanto, é imprescindível a utilização de ferramentas que possam avaliar adequadamente o status nuclear após a liofilização. Nesta tese foi observado que a técnica de Tdt-mediated deoxyuridine triphosphate nick end labeling (Tunel) é extremamente mais sensível e confiável que *Acridine Orange Test* (AOT) para essa finalidade (MARTINS et al., 2007a). Essas informações estão de acordo com Young et al. (2003), que confirmam a técnica de Tunel como um método de eleição para avaliar danos ao DNA espermático.

A técnica de ICSI é uma técnica em desenvolvimento na espécie bovina, necessitando de avanços para a produção de descendentes.

O sistema de ICSI convencional (Fig. 3), o qual foi utilizado neste trabalho, lesiona mais os ovócitos e dificulta a descondensação da cabeça espermática, que acaba sendo envolvida pela membrana plasmática rompida, que é depositada no citoplasma do ovócito (OCK et al., 2003). Apesar dessas dificuldades, este trabalho comprovou que os espermatozóides liofilizados bovinos apresentam o potencial de liberar seu material genético no citoplasma do ovócito e gerar desenvolvimento embrionário (Fig. 4 a, b). Essas informações corroboram os dados obtidos por Keskintepe et al. (2002), que demonstraram o potencial dos espermatozóides liofilizados bovinos em gerar desenvolvimento embrionário. Os tratamentos com trehalose e EGTA foram os que apresentaram as menores porcentagens de espermatozóides com fragmentação de DNA, e conseqüentemente apresentaram as melhores taxas de descondensação de cabeça no citoplasma do ovócito e de formação de blastocistos. Por sua vez, os espermatozóides do tratamento com SFB e TCM 199 apresentaram as maiores taxas de fragmentação de DNA e o pior potencial de fecundação e desenvolvimento embrionário. Esses resultados confirmam os achados da avaliação de Tunel realizada por Martins et al. (2007a), indicando que ela é uma técnica fundamental e indicada antes da ICSI para determinar o status do DNA espermático.

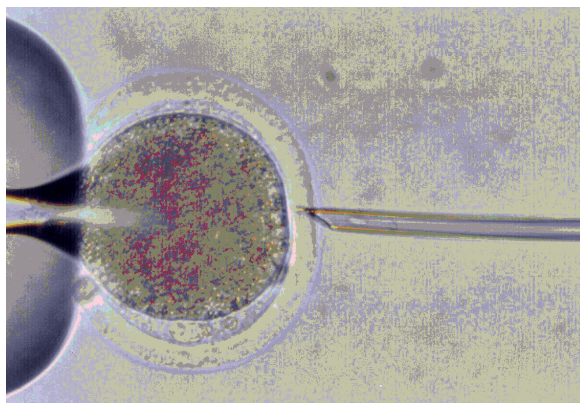
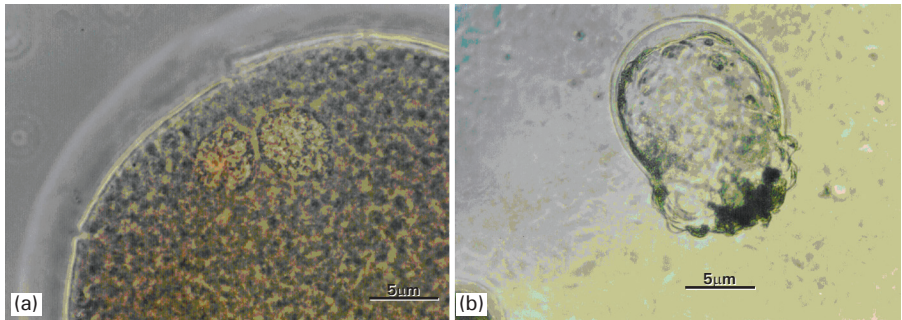


Foto: Carlos Frederico Martins

**Fig. 3.** Representação do processo de injeção intracitoplasmática com espermatozóide liofilizado.





Fotos : Carlos Frederico Martins

**Fig. 4.** Formação de pró-núcleos (a); formação embrionária após a Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI) com espermatozóide liofilizado (b).

## Considerações Finais

Importantes informações foram conquistadas nos trabalhos desenvolvidos na Embrapa com a liofilização espermática, permitindo concluir que o método de liofilização de espermatozóides bovinos ainda permanece agressivo para algumas estruturas, porém mitocôndrias, acrossoma e núcleo podem ser conservados. A preservação dessas estruturas, não preservadas em trabalhos anteriores, indica importantes conquistas na busca da preservação completa da estrutura e função dos espermatozóides.

Ademais, as melhores soluções para proteção nuclear são os compostos pela trehalose e EGTA. Os espermatozóides liofilizados bovinos podem participar do processo de fecundação e da formação embrionária, sendo que as melhores taxas foram encontradas quando os espermatozóides liofilizados com trehalose e EGTA foram utilizados em ICSI.

No entanto, outros estudos ainda devem ser realizados, e a melhoria da técnica de liofilização espermática passa necessariamente pelos avanços nos meios de liofilização e da técnica de ICSI. Uma importante estratégia pode ser a associação da trehalose e EGTA para a liofilização dos espermatozóides e a utilização destes espermatozóides pela ICSI



com o sistema *piezo-drive*, pois por intermédio das vibrações piezo-elétricas o espermatozóide liofilizado pode ser inserido no ovócito sem provocar lesões neste.

## Referências

- ABOAGLA, E. M.; TERADA, T. Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 69, p. 1245-1250, 2003.
- AISEN, E. G.; ALVAREZ, H. L.; VENTURINO, A.; GARDE, J. J. Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. **Theriogenology**, New York, v. 53, p. 1053-1061, 2000.
- BEDFORD, J. M.; HOSKINS, D. D. Normal reproduction in male animals. In: ARTHUR, G. H.; NOAKES, D. E.; PEARSON, H.; PARKINSON, T. J. **Veterinary reproduction and obstetrics**. 6. ed. London: WB Saunders, 1996. p. 551-571.
- BHOWMICK, S.; ZHU, L.; MCGINNIS, L.; LAWITTS, J.; NATH, B. D.; TONER, M.; BIGGERS, J. Desiccation tolerance of spermatozoa dried at ambient temperature: production of fetal mice. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 68, p. 1779-1786, 2003.
- BIALY, G.; SMITH, V. R. Freezing and freeze-drying of human spermatozoa. **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 40, p. 357-371, 1957.
- CHEN, T.; ACKER, J. P.; EROGLU, A.; CHELEY, S.; BAYLEY, H.; FOWLER, A.; TONER, M. Beneficial effect of intracellular trehalose on the membrane integrity of dried mammalian cells. **Cryobiology**, New York, v. 43, p. 168-181, 2001.
- CRITSER, J. K.; MOBRAATEN, L. E. Cryopreservation of murine spermatozoa. **Ilar Journal**, Washington, v. 41, p. 197-206, 2000.
- CROWE, J. H.; CROWE, L. M.; OLIVER, A. E.; TSVETKOVA, N.; TABLIN, F. The trehalose myth revisited: introduction to a symposium on stabilization of cells in the dry state. **Cryobiology**, New York, v. 43, p. 89-105, 2001.
- GILMORE, J. A.; LIU, J.; WOODS, E. J.; PETER, A. T.; CRITSER, J. K. Cryoprotective agent and temperature effects on human sperm membrane permeabilities: convergence of theoretical and empirical approaches for optimal cryopreservation methods. **Human Reproduction**, Oxford, v. 15, p. 335-343, 2000.
- GOTO, K.; KINOSHITA, A.; TAKUMA, Y.; OGAWA, K. Fertilisation of bovine oocytes by the injection of immobilised, killed spermatozoa. **Veterinary Record**, London, v. 127, p. 517-520, 1990.

HAFEZ, E. S. E.; GARNER, D. L. Espermatozóide e plasma seminal. In: HAZEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. 6. ed. São Paulo: Manole, 1995. p. 167-190.

HIRABAYASHI, M.; KATO, M.; ITO, J.; HOCHI, S. Viable rat offspring derived from oocytes intracytoplasmically injected with freeze-dried sperm heads. **Zygote**, v. 13, p. 79-85, 2005.

HOLT, W. V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. **Theriogenology**, New York, v. 53, p. 47-58, 2000.

KANEKO, T.; WHITTINGHAM, D. G.; OVERSTREET, J. W.; YANAGIMACHI, R. Tolerance of the mouse sperm nuclei to freeze-drying depends on their disulfide status. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 69, p. 1859-1862, 2003a.

KANEKO, T.; WHITTINGHAM, D. G.; YANAGIMACHI, R. Effect of pH value of freeze-drying solution on the chromosome integrity and developmental ability of mouse spermatozoa. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 68, p. 136-139, 2003b.

KATAYOSE, H.; MATSUDA, J.; YANAGIMACHI, R. The viability of dehydrated hamster and human sperm nuclei to develop into pronuclei. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 47, p. 277-284, 1992.

KATKOV, I. I.; MAZUR, P. Factors affecting yield and survival of cells when suspensions are subjected to centrifugation: influence of centrifugal acceleration, time of centrifugation, and length of the suspension column in quasi-homogeneous centrifugal fields. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 31, p. 231-245, 1999.

KESKINTEPE, L.; PACHOLCZYK, G.; MACHNICKA, A.; NORRIS, K.; CURUK, M. A.; KHAN, I.; BRACKETT, B. G. Bovine blastocyst development from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 67, p. 409-415, 2002.

KUNITZ, M. Crystalline desoxyribonuclease; digestion of thymus nucleic acid; the kinetics of the reaction. **Journal of General Physiology**, New York, v. 33, p. 363-377, 1950.

KUSAKABE, H.; KAMIGUCHI, Y. Chromosomal integrity of freeze-dried mouse spermatozoa after <sup>137</sup>Cs gamma-ray irradiation. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 556, p. 163-168, 2004.

KUSAKABE, H.; SZCZYGIEL, M. A.; WHITTINGHAM, D. G.; YANAGIMACHI, R. Maintenance of genetic integrity in frozen and freeze-dried mouse spermatozoa. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 98, p. 13501-13506, 2001.

KWON, I. K.; PARK, K. E.; NIWA, K. Activation, pronuclear formation, and development in vitro of pig oocytes following intracytoplasmic injection of freeze-dried spermatozoa. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 71, p. 1430-1436, 2004.

LIU, J. L.; KUSAKABE, H.; CHANG, C. C.; SUZUKI, H.; SCHMIDT, D. W.; JULIAN, M.; PFEFFER, R.; BORMANN, C. L.; TIAN, X. C.; YANAGIMACHI, R.; YANG, X. Freeze-dried sperm fertilization leads to full-term development in rabbits. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 70, p. 1776-1781, 2004.

LIU, Q. C.; CHEN, T. E.; HUANG, X. Y.; SUN, F. Z. Mammalian freeze-dried sperm can maintain their calcium oscillation-inducing ability when microinjected into mouse eggs. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 328, p. 824-830, 2005.

LOPEZ-BEJAR, M.; LOPEZ-GATIUS, F.; CAMON, J.; RUTLLANT, J.; LABERNIA, J. Development in vitro of rabbit embryos after freezing by two-step or ultra-rapid cooling methods. **Zentralbl Veterinarmed A**, v. 41, p. 780-790, 1994.

MAIONE, B.; PITTOGGI, C.; ACHENE, L.; LORENZINI, R.; SPADAFORA, C. Activation of endogenous nucleases in mature sperm cells upon interaction with exogenous DNA. **DNA Cell Biology**, New York, v. 16, p. 1087-1097, 1997.

MARTINS, C. F.; DODE, M. N.; BÁO, S. N.; RUMPF, R. The use of the acridine orange test and the TUNEL assay to assess the integrity of freeze-dried bovine spermatozoa DNA. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 6, n. 1, p. 94-104, 2007a.

MARTINS, C. F.; BÁO, S. N.; DODE, M. N.; CORREA, G. A.; RUMPF, R. Effects of freeze-drying on cytology, ultrastructure, DNA fragmentation, and fertilizing ability of bovine sperm. **Theriogenology**, Atlanta, v. 67, n. 8, p.1307-1315, 2007b.

OCK, S. A.; BHAK, J. S.; BALASUBRAMANIAN, S.; LEE, H. J.; CHOE, S. Y.; RHO, G. J. Different activation treatments for successful development of bovine oocytes following intracytoplasmic sperm injection. **Zygote**, v. 11, p. 69-76, 2003.

PHELPS, M. J.; LIU, J.; BENSON, J. D.; WILLOUGHBY, C. E.; GILMORE, J. A.; CRITSER, J. K. Effects of Percoll separation, cryoprotective agents, and temperature on plasma membrane permeability characteristics of murine spermatozoa and their relevance to cryopreservation. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 61, p. 1031-1041, 1999.

POLGE, C.; SMITH, A. U.; PARKES, A. S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature. **Nature**, London, v. 164, p. 666-667, 1949.

SEIDEL, G. E. Principles of cryopreservation of mammalian embryos. In: TECHNIQUES FOR FREEZING MAMMALIAN EMBRYOS, 1996, Fort Collins. **Proceedings...** Fort Collins: Colorado State University, 1986. p. 6-12.

SHERMANN, J. K. Freezing and freeze-drying of bull spermatozoa. **Fertility and Sterility**, Alabama, v. 190, p. 281-296, 1957.

SHERMANN, J. K. Freezing and freeze-drying of human spermatozoa. **Fertility Sterility**, Alabama, v. 5, p. 357-371, 1954.

SZCZYGIEL, M. A.; MOISYADI, S.; WARD, W. S. Expression of foreign DNA is associated with paternal chromosome degradation in intracytoplasmic sperm injection-mediated transgenesis in the mouse. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 68, p. 1903-1910, 2002.

WAKAYAMA, T. D.; WHITTINGHAM, G.; YANAGIMACHI, R. Production of normal offspring from mouse oocytes injected with spermatozoa cryopreserved with or without cryoprotection. **Journal Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 112, p. 11-17, 1998.

WAKAYAMA, T.; YANAGIMACHI, R. Development of normal mice from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. **Nature Biotechnology**, New York, v. 16, p. 639-641, 1998.

WARD, W. S.; KIMURA, Y.; YANAGIMACHI R. An intact sperm nuclear matrix may be necessary for the mouse paternal genome to participate in embryonic development. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 60, p. 702-706, 1999.

WOODS, E. J.; BENSON, J. D.; AGCA, Y.; CRITSER, J. K. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. **Cryobiology**, New York, v. 48, p. 146-156, 2004.

YOSHIDA, M. Conservation of sperms: current status and new trends. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 61, p. 349-355, 2000.

YOUNG, K. E.; ROBBINS, W. A.; XUN, L.; ELASHOFF, D. Evaluation of chromosome breakage and DNA integrity in sperm: an investigation of remote semen collection conditions. **Journal of Andrology**, v. 24, p. 853-861, 2003.

## Bovine Sperm Conservation by *Freeze-drying*

---

### Abstract

*Animal germplasm conservation is conventionally performed by cryopreservation methods, which use liquid nitrogen to keep gamete viability. The sperm preservation by lyophilization (freeze-drying) is an interesting alternative to the conventional method, because it offers conditions to store the sample for an indefinite period of time at room temperature or 4 °C, facilitates the germplasm exchange and the storage of the samples, as it doesn't request great spaces for these purposes. The bovine sperm tolerates the lyophilization process and is able to generate embryo with normal development. However, the success in maintaining the integrity and stability of freeze-dried sperm chromosomes depends on several factors, such as pH of the lyophilization solution, the presence of calcium chelator substances and molecules that protector nucleus it self. The loss of sperm motility during lyophilization involves the use of Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI) for the embryo production. Therefore, the requirement to perform ICSI is the presence of an intact nucleus, which should preferably be evaluated by the Tunel technique. Tunel technique is more suitable for this purpose, due to its greater sensitivity and reliability in relation to Acridine Orange Test (AOT). New studies about the lyophilization media and improvement the bovine ICSI technique will be essential to improve the sperm freeze-drying process.*

*Index terms: DNA, germplasm, ICSI, freeze-drying solution.*