

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Desenvolvimento Tecnológico
Graduação em Biotecnologia



Trabalho de Conclusão de Curso

Aspectos gerais da criopreservação de sêmen bovino e seu caráter histórico

Martin Schymiczek Larangeira de Almeida

Pelotas, 2016

Martin Schymiczek Larangeira de Almeida

Aspectos gerais da criopreservação de sêmen bovino e seu caráter histórico

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Tiago Veiras Collares

Pelotas, 2016

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

A314a Almeida, Martin Schymiczek Larangeira de

Aspectos gerais da criopreservação de sêmen bovino e seu caráter histórico / Martin Schymiczek Larangeira de Almeida ; Tiago Veiras Collares, orientador. — Pelotas, 2016.

30 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) — Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2016.

1. Criopreservação. 2. Sêmen bovino. 3. Lesões criogênicas. 4. Exensores. 5. Crioprotetores. I. Collares, Tiago Veiras, orient. II. Título.

CDD : 636.2

Martin Schymiczek Lorangeira de Almeida

Aspectos gerais da criopreservação de sêmen bovino e seu caráter histórico

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 15/12/2016

Banca examinadora:

Prof. Dr. Tiago Veiras Collares, Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Mariana Härter Remião, Mestre em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

William Borges Domingues, Mestre em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Agradecimentos

Agradeço aos meu pai por garantir que eu sempre tivesse estrutura para buscar aquilo que eu desejava e servir como exemplo de esforço e dedicação;

À minha mãe, por me propiciar uma educação diferenciada e me incentivar a sempre buscar aquilo que eu almejo;

Aos meus padrinhos por agirem como segundos pai e mãe para mim, sempre ampliando meu conhecimento;

Às minhas irmãs e primos por nunca negarem auxílio e sempre estarem presentes em momentos de alegria ou de dificuldade;

À Universidade Federal de Pelotas, por ofertar um curso de qualidade para a minha formação;

Ao grupo de professores do curso de Biotecnologia, em especial ao meu orientador, Tiago Veiras Collares, ao coordenador do Curso Luciano da Silva Pinto e à professora Luciana Bicca Dode;

Ao GPO e todo o grupo de estagiários, mestrandos e doutorandos atuais ou que passaram pelo laboratório;

Aos meus amigos, em especial ao Daniel Dâmaso Bertoldi, por ter passado por toda essa caminhada junto a mim.

Obrigado!

Resumo

De Almeida, Martin Schymiczek Larangeira. **Aspectos gerais da criopreservação de sêmen bovino e seu caráter histórico**. 2016. 30f. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

A criopreservação de sêmen bovino é de extrema relevância para a pesquisa científica e aplicação comercial em inseminação e fertilização *in vitro*. Os avanços na área da criobiologia possibilitaram o desenvolvimento das técnicas de inseminação artificial e fertilização *in vitro*. A criopreservação também possibilita a disponibilidade e fácil acesso e comercialização de amostras congeladas de sêmen. Entretanto, os danos induzidos pelos estresses mecânicos oriundos da criopreservação alteram a funcionalidade e estrutura das células espermáticas, afetando a qualidade espermática e capacidade de fertilização dessas células pós-descongelamento. No intuito de se prevenir parte das lesões criogênicas, são adicionados ao sêmen diluentes denominados extensores, que tem a função geral de prolongar a vida das células congeladas e evitar a queda na motilidade e capacidade de fertilização dos espermatozoides, através da proteção contra os estresses mecânicos do congelamento. Dentre os componentes dos extensores, os principais responsáveis pelos mecanismos de ação que geram a proteção contra os danos criogênicos são moléculas denominadas crioprotetores, sendo a mais conhecida o glicerol. Essas moléculas, no entanto, podem ser tóxicas às células, sendo necessária utilização em baixas concentrações. Essa revisão procurou explicar os diferentes eventos e estágios que ocorrem durante a criopreservação de sêmen bovino, bem como apresentar os mecanismos de ação de crioprotetores e a toxicidade que eles podem conferir às células espermáticas.

Palavras-chave: Criopreservação; Sêmen bovino; Lesões criogênicas; Extensores; Crioprotetores; Glicerol.

Abstract

De Almeida, Martin Schymiczek Larangeira. **General aspects of bull semen cryopreservation and its historical character**. 2016. 30f. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

Semen cryopreservation is an extremely important technique for both, scientific research and commercial application in artificial insemination and *in vitro* fertilization. The advances on cryobiology allowed the development of artificial insemination and *in vitro* fertilization. Cryopreservation also allows the availability and easy access and commercialization of frozen sperm samples. However, the injuries caused by mechanic stresses originated from cryopreservation modify sperm cells functionality and structure, affecting sperm quality and fertilization capacity. With the objective of preventing a part of those injuries, solutions, called extenders, are added to the semen, which general function is to extend frozen cell life and avoid decrease in motility and fertilization capacity, through protection against the mechanical stresses from freezing. Between the components of extenders, the main responsables for the protection mechanisms against cryogenic injuries are the so called cryoprotectors, being the main one glycerol. These molecules, however, may be toxic to cells, resulting in a necessity of a low concentration usage. This review seeked to explain the different events and stages within bull semen cryopreservation, and also show the mechanisms by which cryoprotectants prevent damage and inflict toxicity to sperm cells.

Key-words: Cryopreservation; Bull semen; Cryogenic injuries; Extenders; Cryoprotectants; Glycerol.

Lista de Figuras

Figura 1	Esquema dos eventos físicos ocorridos na célula durante o congelamento lento.....	15
Figura 2	Esquema dos eventos físicos ocorridos na célula durante o congelamento rápido.....	16
Figura 3	Esquema dos eventos físicos ocorridos na célula durante o congelamento ultra-rápido.....	17
Figura 4	Estrutura química do glicerol.....	21
Figura 5	Estrutura química do Dimetil Sulfóxido.....	22
Figura 6	Estrutura química do Etilenoglicol.....	22

Sumário

1	Introdução.....	9
2	Histórico.....	10
3	Técnica Geral.....	11
3.1	Resfriamento.....	12
3.2	Desidratação Congelamento.....	13
3.2.1	Congelamento Lento.....	13
3.2.2	Congelamento Rápido.....	15
3.2.3	Congelamento Ultra-Rápido.....	16
3.3	Descongelação.....	17
4	Danos à Célula.....	17
5	Criocapacitação.....	19
6	Extensores.....	20
6.1	Crioprotetores Penetrantes.....	20
6.1.1	Glicerol.....	20
6.1.2	Dimetil Sulfóxido.....	21
6.1.3	Etilenoglicol.....	22
6.2	Crioprotetores Não-Penetrantes.....	22
6.2.1	Gema de Ovo.....	23
6.2.2	Leite.....	23
6.3	Açúcares.....	23
6.4	Sais.....	24
6.5	Solução Tamponante.....	24
6.6	Antibióticos.....	24
7	Considerações Finais.....	24
8	Referências.....	26

1. Introdução

A criopreservação é uma importante biotécnica, sendo fundamental, não somente para a pesquisa científica, como para a Indústria. O desenvolvimento da criobiologia auxiliou na otimização de técnicas reprodutivas como a fertilização *in vitro* e a inseminação artificial, trazendo avanços para a pesquisa científica e o desenvolvimento, em especial, da indústria de laticínios (MEDEIROS et al., 2002). A criopreservação pode ser definida como um hiato no metabolismo do sêmen ejaculado (WATSON, 1995), através do congelamento do esperma, com o objetivo de preservar a capacidade fertilizante do sêmen por tempo indefinido (LAYEK et al., 2016).

A descoberta do potencial crioprotetor do glicerol (POLGE; SMITH; PARKES, 1949) é considerado o momento chave da criobiologia moderna, por elevar a atenção da pesquisa científica em torno da criopreservação e do potencial das moléculas crioprotetoras (BROWN, 1997). O desenvolvimento de diversos protocolos de criopreservação levaram à formação de uma base de conhecimento empírica da criobiologia, e a necessidade de compreensão dos danos e alterações causados pela criopreservação resultaram no desenvolvimento do conhecimento acerca dos eventos físicos, químicos e biológicos que ocorrem na célula durante a criopreservação (WALTERS, 2009).

A fim de tentar diminuir as lesões criogênicas que são geradas durante o processo, utiliza-se o advento dos extensores, diluentes contendo moléculas crioprotetoras e soluções que auxiliam no prolongamento da viabilidade do sêmen e na manutenção de suas funções, pós-descongelamento (VISHWANATH; SHANNON, 2000). No entanto, essas substâncias também podem causar danos às células, por apresentarem toxicidade em altas concentrações (GUTHRIE; LIU; CRITSER, 2002).

O objetivo dessa revisão, é trazer um pedaço da história da criopreservação, bem como explicar os diferentes eventos que ocorrem durante o processo de congelamento, que resultam no prolongamento de sua capacidade fertilizante. Também serão apresentados os danos e alterações causadas pelo congelamento de células, voltadas para a espécie bovina. Além disso, buscou-se trazer o mecanismo

de ação das principais moléculas crioprotetoras e entender a citotoxicidade que elas podem apresentar à célula espermática.

2. Histórico

Com o aumento do desenvolvimento das técnicas de inseminação artificial, bem como das indústrias de laticínios nas décadas de 50 e 60, viu-se o surgimento de uma necessidade de estocagem do sêmen bovino à longo prazo, direcionando assim grande parte da atenção científica à técnica de criopreservação. Estudos científicos de criobiologia e criopreservação datam desde o século XVII, porém nessa época pouco avanço era observado (WALTERS, 2009). O marco da criobiologia moderna foi quando o pesquisador Polge e seus colaboradores descobriram acidentalmente o potencial crioprotetor do glicerol, em 1949. Isso ocorreu quando o pesquisador congelou uma amostra de sêmen de aves, em uma garrafa mal rotulada, contendo uma composição não identificada. A solução presente na garrafa fez com que uma parte das células espermáticas resistissem ao congelamento e também ao descongelamento. Após análise química da solução misteriosa aos quais os espermatozoides foram congelados, descobriu-se tratar de uma solução cujo glicerol era um dos componentes.

Na então publicação de Polge, a criopreservação foi chamada por ele de vitrificação. Hoje essa denominação é usada para uma das variações da técnica de criopreservação, e a técnica de congelamento descoberta por Polge, é chamada de criopreservação clássica. Após o achado de Polge, grande parte dos protocolos de congelamento passaram a envolver o glicerol, variando de forma empírica em diversos quesitos que também mostraram afetar a sobrevivência das células espermáticas, como: natureza e concentração do crioprotetor, taxa de resfriamento e aquecimento, temperatura de estocagem e temperatura na qual o crioprotetor é adicionado e removido (BROWN, 1997). A pesquisa empírica da criobiologia proporcionou a formação de uma base teórica, já que se obteve diferentes variáveis, relacionando o sucesso e o fracasso de soluções crioprotetoras. Essas variáveis foram usadas na otimização de protocolos, bem como na análise dos fenômenos biofísicos e bioquímicos que ocorriam nas células durante a criopreservação.

Com isso, deu-se o início da pesquisa fundamentada da criobiologia, que permitiu diversos avanços na área, como o entendimento do mecanismo de ação das moléculas crioprotetoras e o entendimento de como e em quais temperaturas o resfriamento causa o dano celular, desenvolvendo-se assim protocolos fundamentados de criopreservação. Após Bratton e colaboradores comprovarem, em 1955, que espermatozoides bovinos congelados à -79°C em gelo seco, conseguia manter alta fertilidade, começou a investigar-se o motivo pelos quais alguns meios conseguiam preservar, até certo ponto, alta motilidade espermática pós-descongelamento. Para esses meios foi então cunhado o termo “extensores”, usado até hoje. Logo no início do desenvolvimento da pesquisa de extensores, percebeu-se que os lipídios presentes na gema do ovo tinham a capacidade de fazer com que os espermatozoides bovinos, células extremamente sensíveis às baixas temperaturas, conseguissem resistir ao choque térmico. Essa descoberta, aliada à do glicerol, culminou no desenvolvimento do método Tris-Gema de Ovo-Glicerol, protocolo considerado até hoje como padrão para congelamento de sêmen bovino (WALTERS, 2009).

3. Técnica Geral

A técnica de criopreservação consiste na preservação de células ou secreções, em um estado viável, a temperaturas extremamente baixas, de -78°C , quando armazenadas em gelo seco, ou -196°C , quando armazenadas em nitrogênio líquido (BARBAS; MASCARENHAS, 2009), sendo o nitrogênio líquido considerado mais apropriado.

O congelamento das amostras em geral é realizado em palhetas de plástico resistente às baixas temperaturas com volumes de 0,25 mL ou 0,5 mL e o equipamento utilizado para a redução da temperatura pode variar de freezers comuns à freezers com taxas de resfriamento programáveis (VISHWANATH; SHANNON, 2000).

O principal desafio das células na criopreservação, não consiste em resistir às baixas temperaturas de armazenamento, mas passar por um intervalo letal de temperatura, por volta de -15°C até -60°C , tanto no congelamento, quanto no descongelamento.

A manutenção da viabilidade se dá devido na temperatura de -196°C não existir energia térmica suficiente para que ocorram reações químicas, pausando o metabolismo de células enquanto nessa condição. Nesse estado a célula é suscetível apenas a eventos fotofísicos, como a radiação, e geração de radicais livres (MAZUR, 1984).

Para realização da criopreservação são necessárias etapas e componentes fundamentais no processo. Apesar de haver diversas variações em protocolos utilizados em diferentes etapas e componentes, de maneira geral a criopreservação trabalha com quatro etapas principais: Resfriamento, Desidratação, Congelamento e Descongelo (MEDEIROS et al., 2002). Os eventos físico-químicos que ocorrem em cada estágio da criopreservação não apenas prolongam a vida da célula, mas também danificam seu funcionamento e estrutura (PARKS; GRAHAM, 1992). Esses eventos também variam, de acordo com a taxa de resfriamento, ou seja, a velocidade com que se diminui a temperatura no processo, medida em diferença de graus Celsius em função do tempo. De acordo com a taxa de resfriamento, pode-se dividir a criopreservação em três velocidades diferentes: Congelamento Lento - também chamado de criopreservação clássica; Congelamento rápido e Congelamento Ultrarrápido - conhecido como Vitrificação (BARBAS; MASCARENHAS, 2009).

Na intenção de se prevenir os danos causados pela criopreservação e garantir o pleno funcionamento, em pelo menos parte das células criopreservadas pós-descongelo, são utilizados os chamados extensores, diluentes contendo diversas substâncias, cada uma com finalidades específicas, mas com a função geral de proteger as células de lesões criogênicas. Dentre os componentes, estão os crioprotetores, as moléculas responsáveis pelos mecanismos que protegem as células dos danos criogênicos. Essas substâncias no entanto, podem apresentar certa toxicidade às células criopreservadas, havendo portanto, um limite na quantidade utilizada (VISHWANATH; SHANNON, 2000). Entretanto, sabe-se que proteger completamente as células de danos criogênicos é impossível. A motilidade é o conceito mais utilizado para se avaliar o sucesso do protocolo de criopreservação, sendo considerado 50% da motilidade pós-descongelo em comparação com a mesma amostra de sêmen fresco, uma criopreservação de sucesso. A quantidade de células necessárias para atingir a fertilização, no entanto, varia de acordo com a

espécie, sendo necessários de 2 a 10 vezes mais sêmen criopreservado em comparação ao sêmen fresco, na espécie bovina (MEDEIROS et al., 2002).

3.1 Resfriamento

O resfriamento consiste primeiramente na redução da temperatura do sêmen fresco, partindo da temperatura corporal, reduzindo até uma temperatura de 4°C. Nessa temperatura ocorre a redução da atividade metabólica da célula. O resfriamento, no entanto, causa o efeito de choque térmico na célula, afetando principalmente a membrana citoplasmática (MEDEIROS et al., 2002). O choque térmico é visto como um estado extremo de estresse constante na célula (WATSON, 2000). Por causa da redução da temperatura, os lipídios da membrana sofrem uma mudança termotrópica de fase, passando de uma fase líquida a uma fase de gel, resultando numa membrana com estrutura mais rígida. Entretanto, os diferentes lipídios da membrana, possuem diferentes temperaturas de transição de fase, levando à mudança de fase em temperaturas diferentes. Essa mudança de fase resulta na migração lateral da membrana, com rearranjo dos componentes da membrana. Essa migração pode levar à formação de microdomínios onde não há disposição de bicamada lipídica, e alterar a estrutura da membrana que circunda as proteínas. Todos esses eventos contribuem para a alteração da permeabilidade da membrana (PARKS; MEACHAM; SAACKE, 1981)(MEDEIROS et al., 2002).

Com a adição de extensores e suas moléculas crioprotetoras, os efeitos do choque térmico podem ser reduzidos. A redução da temperatura da amostra segue ocorrendo de maneira gradual, levando à desidratação e congelamento da célula, processos que ocorrem de maneira semi-conjunta (MAZUR, 1984). Os eventos que ocorrem em cada etapa variam de acordo com a taxa de resfriamento, por isso cabe dividir o que ocorre em cada processo, de acordo com a velocidade da redução de temperatura.

3.2 Desidratação e Congelamento

3.2.1 Congelamento Lento

Denominado criopreservação clássica, o congelamento lento é a principal técnica usada para o congelamento de espermatozóides (BARBAS; MASCARENHAS, 2009). Durante parte do processo de redução de temperatura, as células ficam em um estado de super-resfriamento. Esse estado é definido como um estado instável, entre a temperatura ambiente e o ponto de congelamento/derretimento da solução, em que as células estão suscetíveis à alterações no seu estado físico (BENSON et al., 2012).

Na temperatura de -5°C os meios extra e intracelular, estão líquidos, num estado de super-resfriamento. Entre -5°C e -15°C começa a formação de gelo no meio extracelular(MAZUR, 1984), com a membrana agindo como uma barreira, impedindo o crescimento dos cristais de gelo para dentro da célula. A formação de gelo no meio extracelular acaba confinando as células em pequenos canais de solução não congelada, envoltos pelo restante da solução congelada (PARKS; GRAHAM, 1992). O meio intracelular, no entanto, permanece líquido, no estado de super-resfriamento. A água intracelular no estado de super-resfriamento tem, por definição, um potencial químico maior que a água parcialmente congelada no meio extracelular, gerando uma diferença de potencial. Na tentativa de manutenção do equilíbrio osmótico, começa o processo de difusão da água de dentro para fora da célula, resultando na desidratação da célula, diminuindo o volume de água intracelular disponível para congelamento e assim evitando a formação de cristais de gelo intracelulares (MAZUR, 1984). Entretanto, deve-se evitar a criação de uma condição hiperosmótica, pois essa condição levaria a uma desidratação severa da célula, podendo resultar em desnaturação de macromoléculas e encolhimento extremo da célula, causando o colapso irreversível da membrana plasmática (MAZUR, 1997). A taxa de congelamento ideal, é aquela que leva ao congelamento do meio extracelular, sem levar a formação de cristais de gelo intracelulares, já que esses cristais de gelo causam estresse mecânico, por confinarem o soluto não congelado em espaço extremamente limitado dentro da célula (MEDEIROS et al., 2002). O congelamento lento, está ilustrado na figura 1.

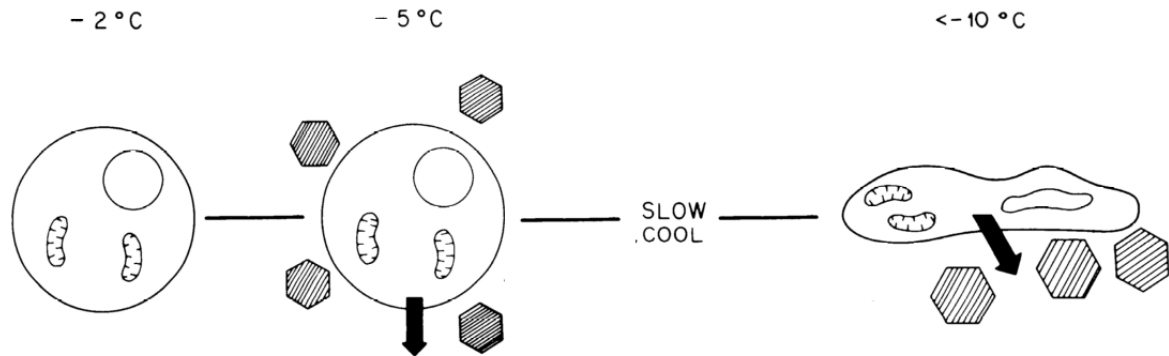


Figura 1 – Esquema dos eventos físicos ocorridos na célula durante o congelamento lento

Fonte: adaptado de MAZUR, 1977, p. 253.

3.2.2 Congelamento Rápido

Caso a taxa de resfriamento seja muito rápida, não há tempo hábil para que ocorra difusão da água para o meio extracelular a fim de manter o equilíbrio osmótico. A célula torna-se cada vez mais gelada e, eventualmente atinge o equilíbrio químico através do congelamento da água intracelular levando a formação de cristais de gelo (MAZUR, 1984). A formação desses cristais de gelo, pode levar a formação espontânea de núcleos de gelo. Esses núcleos são formados apenas quando pequenos cristais de gelo próximos, se juntam ao acaso, formando núcleos cristalizados. Uma vez formado, o núcleo cresce rapidamente em todas as direções. O que resta na célula, é uma fração não-congelada, onde estão confinados todos os solutos. Esse confinamento, resulta num crescimento da concentração de solutos e conseqüentemente um rápido aumento na pressão osmótica da fração não-congelada. Como resultado, ocorre a difusão da água para o meio extracelular, até o ponto em que a pressão osmótica esteja igualmente alta em ambos os meios. Esse processo se repete, até que a viscosidade da fração não-congelada seja tão alta que

não seja possível difusão dela (WOELDERS, 1997). O congelamento rápido está ilustrado figura 2.

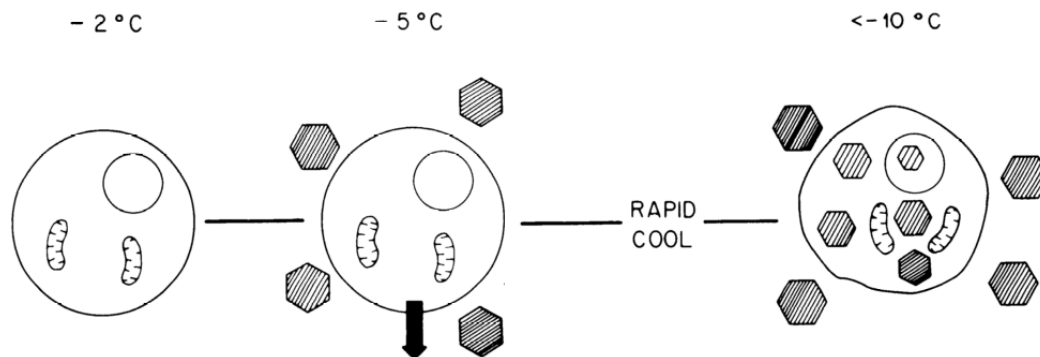


Figura 2 – Esquema dos eventos físicos ocorridos na célula durante o congelamento rápido

Fonte: adaptado de MAZUR, 1977, p. 253.

3.2.3 Congelamento Ultra-Rápido

Conhecido como vitrificação, o congelamento ultra-rápido visa congelar o interior da célula de maneira extremamente rápida, evitando a desidratação. Isso significa ter a formação de cristais de gelo intracelulares, entretanto em tamanho bem menor do que aqueles formados no congelamento rápido, ou seja, cristais com pequena quantidade de água, sendo denominados microcristais. Esse processo, apesar de não requisitar de equipamentos caros, demanda uma utilização de altas concentrações de moléculas crioprotetoras – de 30% a 50% em comparação com 5% a 7% utilizados a criopreservação clássica. Essa técnica portanto, é vista como altamente inadequada para a criopreservação de sêmen, visto que as células espermáticas são extremamente sensíveis à alta concentração de crioprotetores (BARBAS; MASCARENHAS, 2009). O congelamento ultra-rápido está ilustrado na figura 3.

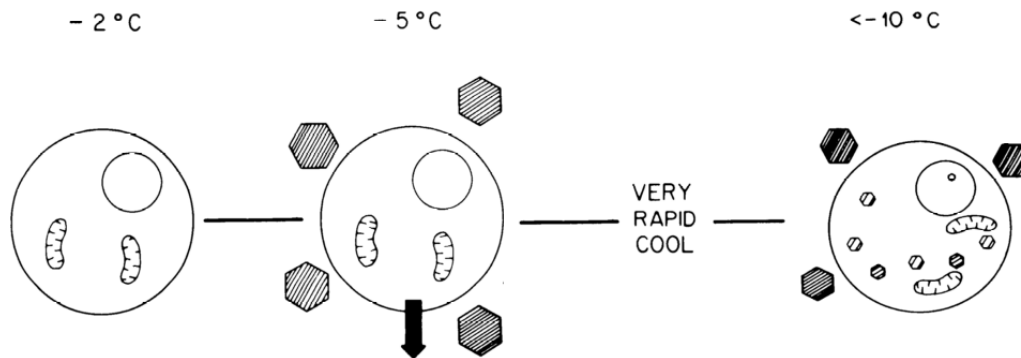


Figura 3 – Esquema dos eventos físicos ocorridos na célula durante o congelamento ultra-rápido

Fonte: adaptado de MAZUR, 1977, p. 253.

3.3 Descongelamento

O descongelamento é realizado para se ter acesso às células criopreservadas. O descongelamento também pode causar danos às células, devido à elevação súbita de temperatura à qual elas são expostas, em geral de -196°C até 38°C . Essa variação leva a transição rápida de estado sólido para líquido (CHATTERJEE; GAGNON, 2001). Entretanto para o descongelamento de espermatozóides, considera-se que taxas de descongelamento rápidas são melhores para a recuperação dessas células (HOLT, 2000).

4. Danos à célula

A criopreservação pode causar diferentes lesões criogênicas às células espermáticas, geradas pelo grande estresse mecânico induzido pelas mudanças de temperatura, reduzindo sua funcionalidade e danificando sua estrutura. A membrana plasmática é a principal estrutura afetada pela criopreservação (HAMMERSTEDT; GRAHAM; NOLAN, 1990). Os grupamentos sulfidríla, presentes em proteínas na

membrana da célula, mostraram ter sua quantidade e padrão de distribuição alterado pós-congelamento e descongelamento. Essas alterações podem estar ligadas à redução da habilidade de fertilização dos espermatozóides na criopreservação (CHATTERJEE; DE LAMIRANDE; GAGNON, 2001).

A mudança de fase na camada lipídica da membrana, leva à migração lateral dos lipídios e à formação de microdomínios onde não há bicamada lipídica (MEDEIROS et al., 2002). Entretanto, não apenas os lipídios são afetados pela mudança sua mudança de fase. Como as proteínas integrais de membrana estão ancoradas na bicamada lipídica, a migração lateral pode alterar a função dessas proteínas, principalmente daquelas que dependem de modulação estrutural para exercer sua função, como proteínas canais de íons (WATSON, 2000).

O encolhimento e expansão da célula, causados pela desidratação, também danificam a membrana, podendo levar ao rompimento da membrana e vazamento do interior da célula espermática (HINKOVSKA-GALCHEVA; PETKOVA; KOUMANOV, 1989). O confinamento das células em canais de meio não congelados, formados pelo meio extracelular congelado em sua volta, também podem causar lesões criogênicas nas células, caso esses canais fiquem muito estreitos ou agrupem muitas células em um mesmo locus, deformando suas estruturas (PARKS; GRAHAM, 1992).

Os estresses causados pela redução de temperatura no congelamento, elevam o estresse oxidativo na célula, através da produção de espécies reativas de oxigênio(ROS). O excesso de ROS levam à peroxidação lipídica, indicando maior rigidez da membrana. A elevação súbita de temperatura no descongelamento, também leva a uma alteração no perfil de geração de ROS (CHATTERJEE; GAGNON, 2001).

O citoesqueleto também é afetado durante a criopreservação. O congelamento leva a depolimerização dos filamentos de Actina-F, alterando as redes formadas pela proteína. Esse processo no entanto, pode vir a ser revertido durante o descongelamento (PÉREZ et al., 2012).

Estresses mecânicos associados a formação de cristais de gelo extracelulares, também mostraram induzir dano celular durante a criopreservação (BENSON et al., 2012). Além disso, a criopreservação, estimula a ligação de proteínas BSP em volta do espermatozóide. Apesar dessas proteínas serem essenciais para a ligação do

espermatozóide no oviduto, o aumento dessas proteínas no esperma, pode exercer um efeito negativo na capacidade de fertilização (ARDON; SUAREZ, 2013).

Todos esses danos causado à célula, pelos estresses gerados com a variação de temperatura, contribuem para a morte celular, redução da motilidade espermática e redução da capacidade de fertilização após a criopreservação. Com o objetivo de se reduzir esses efeitos, utiliza-se diluentes que visam proteger os espermatozóides de lesões criogênicas. Esses diluentes são denominados extensores.

5. Criocapacitação

Um dos mecanismos mais importantes para as células espermáticas, a capacitação, também é afetada pela criopreservação. Uma parte das células criopreservadas demonstra ter alguns padrões semelhantes àqueles de células capacitadas, como o padrão de ligação de clortetraciclina(CTC) (CORMIER; SIRARD; BAILEY, 1997).

Isso também é demonstrado, pela alteração na habilidade de regular a entrada de cálcio em células criopreservadas. Células que passaram pelo processo de congelamento e descongelamento, apresentam maior concentração de cálcio citosólico e presença de cálcio armazenado internamente, ausente no espermatozóide fresco. A presença de cálcio armazenado internamente está correlacionada à capacitação, enquanto o aumento na concentração citosólica de cálcio está relacionado à reação acrossômica (PONS-REJRAJI; BAILEY; LECLERC, 2009). As células espermáticas também demonstraram necessitar de menor tempo de exposição à agentes capacitantes para penetrar oócitos com sucesso durante a fertilização *in vitro*(WATSON, 1995). Esses eventos, evidenciam que a criopreservação altera mecanismos de regulação da capacitação e da reação acrossômica, processos necessários para que o espermatozóide possa atingir a fertilização. (PONS-REJRAJI; BAILEY; LECLERC, 2009). Entretanto, a expectativa de vida de células capacitadas e de células com o acrossomo fundido é reduzida, podendo levar à morte prematura de espermatozóides e conseqüente redução na taxa de fertilidade de sêmen criopreservado. Portanto, a taxa de fertilidade é dependente

da proporção de espermatozoides que realizam os processos de capacitação e reação acrossômica no momento certo (THUNDATHIL et al., 1999).

6. Extensores

Os extensores, são diluentes adicionados ao sêmen ainda fresco, que será posteriormente criopreservado. O objetivo da adição de extensores é estender a viabilidade do sêmen congelado (LAYEK et al., 2016). Para isso, os extensores, devem cumprir uma série de requisitos: ter pH e osmolaridade adequados, possuir capacidade tamponante e principalmente proteger as células de lesões e alterações criogênicas que ocorrem durante as diferentes etapas do processo de criopreservação (BARBAS; MASCARENHAS, 2009). A composição de extensores geralmente inclui: crioprotetores penetrantes; crioprotetores não-penetrantes; açúcares; sais; substâncias tamponantes e antibióticos. Cada uma dessas substâncias exerce uma função específica no prolongamento da vida dos espermatozoides (VISHWANATH; SHANNON, 2000).

6.1 Crioprotetores Penetrantes

Crioprotetores penetrantes são aqueles agentes que conseguem permear pela membrana das células, exercendo seu potencial crioprotetor de maneira intracelular. Dentre suas principais funções está dificultar a formação intracelular de cristais de gelo (HOLT, 2000). Entre os principais agentes crioprotetores penetrantes estão o glicerol, o dimetil sulfóxido(DMSO) e o etilenoglicol.

6.1.1 Glicerol

O glicerol é um poliol que teve sua ação crioprotetora descoberta em 1949 (POLGE; SMITH; PARKES, 1949). É o agente crioprotetor mais conhecido e utilizado na criopreservação de sêmen bovino (VISHWANATH; SHANNON, 2000).

Acredita-se que ele age em diversos aspectos, protegendo a célula de lesões criogênicas. Foi proposto que ele age deprimindo o ponto de congelamento das soluções, resultando numa diminuição da concentração de solutos na fração não-congelada (LOVELOCK; POLGE, 1954). Estima-se também que o glicerol se ligue à membrana plasmática através de pontes de hidrogênio entre as hidroxilas do crioprotetor e os grupamentos fosfato da membrana, promovendo a estabilidade dessa estrutura (KUNDU et al., 2000). Além disso, o glicerol pode ser metabolizado pela célula, sendo convertido em uma fonte de energia alternativa para os espermatozóides (MOHRI, 1966).

Por ser um poliol, acredita-se ainda que ele possa substituir a água em condições de desidratação intensa (WOELDERS, 1997). Entretanto o glicerol possui atividade citotóxica, sendo necessário regular a concentração utilizada desse crioprotetor, variando entre 2,25 e 9% (VISHWANATH; SHANNON, 2000). Além disso, por ter alto peso molecular, passa vagarosamente pela membrana, podendo causar dano osmótico na célula (GUTHRIE; LIU; CRITSER, 2002). A estrutura química do glicerol está representada na figura 4.

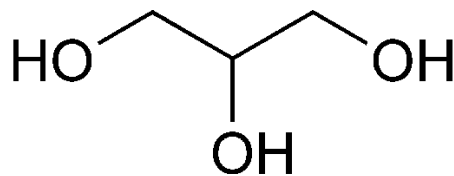


Figura 4 – Estrutura química do glicerol

6.1.2 Dimetil Sulfóxido

A literatura descreve o DMSO como um dos crioprotetores mais utilizados na criopreservação de gametas e embriões. Entretanto, para espermatozóides encontra-

se que apenas em algumas espécies, como coelhos e elefantes, sua ação crioprotetora é comparável com a do glicerol (WATSON, 1995). O DMSO pode reduzir a rigidez da membrana plasmática, aumentando sua fluidez. Em concentrações muito altas entretanto, pode destruir a bicamada lipídica da membrana (BEST, 2014). A estrutura química do DMSO está representada na figura 5.

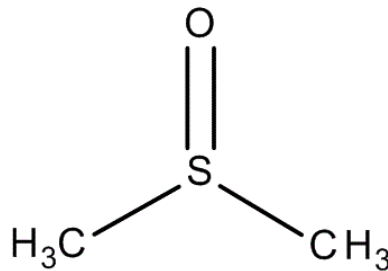


Figura 5 – Estrutura química do Dimetil Sulfóxido

6.1.3 Etilenoglicol

Assim como o DMSO, o etilenoglicol não apresenta ser um crioprotetor, tão eficiente quanto o glicerol. Entretanto, por ter dois grupos hidroxila em sua estrutura, o etilenoglicol pode vir a realizar ligações com a membrana da célula, através de pontes de hidrogênio, oferecendo proteção semelhante a do glicerol (KUNDU et al., 2000). O etilenoglicol também demonstra prevenir a reação acrossômica durante a criopreservação (ORTLOFF et al., 2006), além de penetrar a célula mais facilmente que o glicerol (MOORE et al., 2006). A estrutura química do etilenoglicol está representada na figura 6.

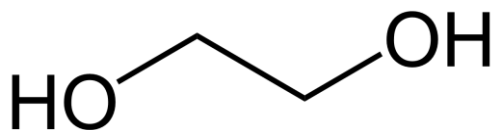


Figura 6 – Estrutura química do Etilenoglicol

6.2 Crioprotetores não-penetrantes

Crioprotetores não-penetrantes agem exercendo um efeito extracelular, agindo, de maneira geral, através da estimulação osmótica e desidratação celular (MEDEIROS et al., 2002). Crioprotetores não-penetrantes podem interagir com a membrana plasmática ou agir como soluto, deprimindo o ponto de congelamento do meio extracelular e diminuindo a formação de cristais de gelo no meio. Os principais crioprotetores não-penetrantes utilizados são a gema de ovo e o leite.

6.2.1 Gema de Ovo

Crioprotetor não-penetrante mais utilizado, a singularidade da gema de ovo como crioprotetor, está na proteção contra o choque térmico (MEDEIROS et al., 2002). Essa proteção se dá devido à fração fosfolipídica de uma lipoproteína de baixa densidade presente na gema do ovo. A fração carregada dessa lipoproteína se liga à membrana celular durante os intervalos críticos de temperatura, enquanto a fração fosfolipídica, denominada lecitina, age como um isolante térmico, evitando danos maiores provenientes do choque térmico. A quantidade de gema de ovo utilizada varia de 15 a 30%. (VISHWANATH; SHANNON, 2000)

6.2.2 Leite:

O leite surgiu como alternativa à gema de ovo como crioprotetor não-penetrante. Seu mecanismo de ação é semelhante ao da gema de ovo, sendo as caseínas as macromoléculas responsáveis pela ação crioprotetora. Entretanto, o leite apresenta como desvantagem a baixa visibilidade do sêmen em microscópios, dificultando avaliação espermática pós-descongelamento (VISHWANATH; SHANNON, 2000).

6.3 Açúcares

A utilização de açúcares na suplementação de extensores serve como propósito de fonte de energia para os espermatozóides diluídos (BARBAS; MASCARENHAS, 2009). Entretanto alguns açúcares podem auxiliar na proteção contra estresses mecânicos. A Trealose é um dissacarídeo não-redutível que possui a capacidade de proteger a célula de estresses oriundos da variação de temperatura, desidratação e oxidação (CHEN et al., 1993). Os açúcares mais utilizados são Glicose, Rafinose, Sacarose, Frutose e Trealose (BARBAS; MASCARENHAS, 2009).

6.4 Sais

A adição de sais tem como função ajustar o pH e a osmolaridade do meio. Os principais sais utilizados são o citrato de sódio e o ácido cítrico (LAYEK et al., 2016).

6.5 Solução Tamponante

As soluções tamponantes são adicionadas genericamente, visando a manutenção do pH do meio, sendo utilizado principalmente o Tris (Hidróximetilaminometano) (VISHWANATH; SHANNON, 2000).

6.6 Antibióticos

Os antibióticos são adicionados genericamente para controle bacteriano e garantia de qualidade espermática. Os mais utilizados são Streptomina e penicilina (AKHTER et al., 2008).

7. Considerações finais

A criobiologia é uma área multidisciplinar, envolvendo grandes áreas como biologia celular e molecular, física, química, matemática, engenharia e medicina veterinária e humana (BENSON et al., 2012). A descoberta do glicerol e o desenvolvimento da técnica de criopreservação possibilitou o desenvolvimento concomitante das técnicas reprodutivas de inseminação artificial e fertilização *in vitro* e consequente crescimento da indústria de laticínios e da pesquisa científica voltada para a embriologia animal e humana (MEDEIROS et al., 2002).

No entanto, apesar de muito promissora, a criopreservação induz uma série de estresses mecânicos às células, devido aos eventos físico-químicos que ocorrem com a variação de temperatura, danificando e alterando o funcionamento e estrutura da célula criopreservada (WATSON, 2000). A principal estrutura afetada pelo congelamento é a membrana plasmática (HAMMERSTEDT; AND; NOLAN, 1990). A criopreservação ainda pode induzir a capacitação prematura de uma parte das células espermáticas, reduzindo a expectativa de vida dos espermatozoides (THUNDATHIL et al., 1999).

Na tentativa de se reduzir os estresses causados pela criopreservação, são utilizados extensores, diluentes que fornecem proteção contra lesões criogênicas através de moléculas crioprotetoras, como o glicerol (BARBAS; MASCARENHAS, 2009). O extensor mais comumente utilizado é o EYTG(egg yolk – tris – glycerol/gema de ovo – tris - glicerol) (WALTERS, 2009). O mecanismo de ação dessas moléculas crioprotetoras ainda não é completamente elucidado . Além disso, os crioprotetores apresentam citotoxicidade se utilizados em grandes quantidades, cabendo ainda mais investigações acerca dessas moléculas para otimização dos protocolos de criopreservação.

8. Referências

AKHTER, S. et al. Effect of antibiotics in extender on bacterial and spermatozoal quality of cooled buffalo (*Bubalus bubalis*) bull semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, n. 3, p. 272–278, 2008.

ARDON, F.; SUAREZ, S. S. Cryopreservation increases coating of bull sperm by seminal plasma binder of sperm proteins BSP1, BSP3, and BSP5. **Reproduction**, v. 146, n. 2, p. 111–117, 2013.

BARBAS, J. P.; MASCARENHAS, R. D. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. **Cell and Tissue Banking**, v. 10, n. 1, p. 49–62, 2009.

BENSON, J. D. et al. The cryobiology of spermatozoa. **Theriogenology**, v. 78, n. 8, p. 1682–1699, 2012.

BEST, B. P.; Extension, L. CRYOPROTECTANT TOXICITY : FACTS , ISSUES , AND QUESTIONS. p. 1–58, [s.d.].

BROWN, S. R. The History and Principles of Q Methodology. v. 20, n. 1, p. 1–21, 1997.

CHATTERJEE, S.; DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Cryopreservation alters membrane sulfhydryl status of bull spermatozoa: Protection by oxidized glutathione.

Molecular Reproduction and Development, v. 60, n. 4, p. 498–506, 2001.

CHATTERJEE, S.; GAGNON, C. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. **Molecular Reproduction and Development**, v. 59, n. 4, p. 451–458, 2001.

CHEN, Y. et al. Survival of bull spermatozoa seeded and frozen at different rates in egg yolk-tris and whole milk extenders. **Journal of dairy science**, v. 76, n. 4, p. 1028–34, 1993.

CORMIER, N.; SIRARD, M.-A.; BAILEY, J. L. Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. **Journal of andrology**, v. 18, n. 4, p. 461–468, 1997.

PÉREZ, Y. E. et al. Cytoskeletal proteins F-actin and α -dystrobrevin are altered by the cryopreservation process in bull sperm. **Cryobiology**, v. 64, n. 2, p. 103–109, 2012.

GUTHRIE, H. D.; LIU, J.; CRITSER, J. K. Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa. **Biology of reproduction**, v. 67, n. 6, p. 1811–1816, 2002.

HAMMERSTEDT, R. H.; GRAHAM, J. K. G.; NOLAN, J. P. Cryopreservation of Mammalian Sperm: What We Ask Them to Survive. **Journal of Andrology**, v. 11, n. 1, 1990.

HINKOVSKA-GALCHEVA, V.; PETKOVA, D.; KOUMANOV, K. Changes in the phospholipid composition and phospholipid asymmetry of ram sperm plasma membranes after cryopreservation. **Cryobiology**, v. 26, n. 1, p. 70–75, 1989.

HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, n. 1–3, p. 3–22, 2000.

KUNDU, C. N. et al. Development of a simple sperm cryopreservation model using a chemically defined medium and goat cauda epididymal spermatozoa. **Cryobiology**, v. 40, n. 2, p. 117–125, 2000.

LAYEK, S. S. et al. Cryopreservation of bull semen: Evolution from egg yolk based to soybean based extenders. **Animal Reproduction Science**, v. 172, p. 1–9, 2016.

LOVELOCK, J. E.; POLGE, C. The immobilization of spermatozoa by freezing and thawing and the protective action of glycerol. **The Biochemical journal**, v. 58, n. 4, p. 618–622, 1954.

MAZUR, P. *Fundamental Cryobiology of Mammalian Spermatozoa*, 1997.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **The American journal of physiology**, v. 247, n. 3 Pt 1, p. C125–C142, 1984.

MEDEIROS, C. M. O. et al. Current status of sperm cryopreservation: Why isn't it better? **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 327–344, 2002.

MOHRI, H. GLYCEROKINASE AND ITS POSSIBLE ROLE IN GLYCEROL METABOLISM OF BULL SPERMATOZOA. ^{â€™}™ Biological Institute , College of General Education , University of Tokyo , Tokyo , and National Institute of Animal Industry , Chiba , Japan other animals , fowl and ram spe. 1966.

MOORE, A. I. et al. Effect of cooling rate and cryoprotectant on the cryosurvival of equine spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 26, n. 5, p. 215–218, 2006.

ORTLOFF, C. et al. A new technique to evaluate the ability of cryoprotectors to prevent premature acrosome reaction in human spermatozoa. **Andrologia**, v. 38, n. 6, p. 230–232, 2006.

PARKS, J. E.; GRAHAM, J. K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v. 38, n. 2, p. 209–222, 1992.

PARKS, J. E.; MEACHAM, T. N.; SAACKE, R. G. Cholesterol and phospholipids of bovine spermatozoa. II. Effect of liposomes prepared from egg phosphatidylcholine and cholesterol on sperm cholesterol, phospholipids, and viability at 4 degrees C and 37 degrees C. **Biology of reproduction**, v. 24, p. 399–404, 1981.

POLGE, C.; SMITH, A U.; PARKES, A. S. **Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures.** *Nature*, 1949. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18143360>%5Cn<http://www.nature.com/doi/10.1038/164666a0>>

PONS-REJRAJI, H.; BAILEY, J. L.; LECLERC, P. Cryopreservation affects bovine sperm intracellular parameters associated with capacitation and acrosome exocytosis. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 21, n. 4, p. 525–537, 2009.

THUNDATHIL, J. et al. Relationship between the proportion of capacitated spermatozoa present in frozen-thawed bull semen and fertility with artificial insemination. **International Journal of Andrology**, v. 22, n. 6, p. 366–373, 1999.

VISHWANATH, R.; SHANNON, P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. **Animal Reproduction Science**, v. 62, n. 1–3, p. 23–53, 2000.

WALTERS, E. M. E. A. The history of sperm cryopreservation. **Cambridge University Press**, v. 1, p. 1–10, 2009.

WATSON, P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 7, n. 4, p. 871–891, 1995.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60–61, p. 481–492, 2000.

WOELDERS, H. Fundamentals and recent development in cryopreservation of bull and boar semen. **The Veterinary quarterly**, v. 19, n. 3, p. 135–8, 1997.