Criopreservação do Sêmen Bovino

Bovine Semen Cryopreservation

Patrícia Arakaki Leite[a]*; Guilherme Gonsales Schreder[a]; Camila Lopes Ribeiro de Almeida[a]; Carmem Estefânia Serra Neto Zúccari[a]; Eliane Vianna da Costa e Silva[a]

[a]Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Mato Grosso do Sul, Brasil
*E-mail: pal@terra.com.br
Recebido: 16 de dezembro de 2010; Aceito: 2 de maio de 2011.

Resumo

O processo de criopreservação tem uma contribuição importante no aumento da produção bovina, em rebanhos comerciais e de animais de alto valor zootécnico, nos quais a lucratividade depende da alta eficiência reprodutiva. Com o objetivo de conservar a capacidade fecundante do espermatozóide, a congelação proporciona um estado de quiescência ao mesmo tempo reduzindo seu metabolismo e, consequentemente, diminuindo os gastos energéticos e da produção de catabólitos, contribuindo assim para a preservação celular, além de aumentar o número de fêmeas fecundadas com um único ejaculado. Contudo, o ciclo da congelação/descongelação resulta em diminuição da fertilidade quando comparada àquela do sêmen a fresco. Os fatores que afetam a sobrevivência do sêmen congelado incluem a composição do meio diluidor, crioprotetores, taxas de congelação/descongelação, condições osmóticas e remoção dos crioprotetores. A presente revisão tem como objetivo abordar informações da literatura acerca dos diluentes, crioprotetores e aditivos usados nos protocolos de congelação do sêmen bovino.

Palavras-chave: Congelamento. Espermatozóides. Inseminação Artificial. Bovinos.

Abstract

The cryopreservation process has an important contribution in the increase of the bovine production in commercial herds and high zootechnical value, in which the profitability depends on the high reproductive efficacy. Aiming to conserve the fertilization capacity of the spermatozoa, the freezing process leads the spermatozoa to a quiescent state, at the same time reducing its metabolism and, consequently, decreasing expenses of energy and production of catabolites, contributing, thus, to cellular preservation, besides increasing the number of inseminated females with only one ejaculate. However, the freezing/defrosting cycle results in reduction of fertility when compared to the one of the fresh semen. The factors that affect the survival of the frozen semen include composition of the diluting environment, cryoprotectants, rates of freezing/defrosting, osmotic conditions, and removal of cryoprotectants. The aim of this review was to approach information of literature concerning extenders, cryoprotectants and additives used in the protocols of bovine semen cryopreservation.

Keywords: *Freezing. Spermatozoa. Insemination, Artificial. Cattle.*

1 Introdução

A congelação de sêmen tem sido amplamente utilizada para aumentar o potencial reprodutivo de touros de alto valor genético, sendo ferramenta imprescindível em programas de inseminação artificial, transferência e produção *in vitro* de embriões. O uso do sêmen congelado permite rápido avanço genético dos rebanhos comerciais, permitindo a escolha de reprodutores que melhor atendam às necessidades de produção.

Embora seja um procedimento rotineiro na indústria da inseminação artificial, os protocolos de congelação utilizados ainda resultam em considerável número de espermatozóides que não resistem ao processo, o que compromete a fecundação do ovócito[1]. Durante a criopreservação o espermatozóide passa pelas etapas de resfriamento, congelação e descongelação. Estas são capazes de causar diversos graus de dano celular, reduzindo a fertilidade quando comparada àquela do sêmen a fresco. Esta redução se deve a combinação entre perda da viabilidade espermática e do padrão de motilidade da população sobrevivente[2].

Alguns dos fatores que afetam a sobrevivência do sêmen congelado são: a composição do meio diluidor e crioprotetores, taxas de congelação/descongelação e remoção dos crioprotetores[3]. Mesmo sob as melhores condições de criopreservação, cerca de metade da população inicialmente móvel morre após a descongelação e, naquela que sobrevive podem ocorrer alterações que comprometem a atividade funcional dos espermatozóides descongelados[4].

Se o número total de espermatozóides funcionais à inseminação artificial com sêmen congelado for menor que o número necessário para atingir alta probabilidade de fecundação ($20x10^6$), as chances de sucesso serão reduzidas[2]. É necessária concentração oito vezes maior de espermatozóides congelados para se atingir uma taxa de fecundação equivalente àquela obtida *in vivo*[5], para compensar a perda de gametas. Além disso, o sêmen sujeito à criopreservação é exposto a condições de diluição do plasma seminal e baixas temperaturas. Estas levam à perda e reorganização dos

componentes da membrana plasmática de forma semelhante ao que ocorre durante a capacitação. Tais alterações resultam na diminuição do tempo de sobrevivência do espermatozóide, bem como da sua habilidade de interagir com o ambiente do trato reprodutor feminino[4].

Para minimizar os efeitos deletérios da criopreservação vêm sendo testados, através das décadas, inúmeros diluentes e crioprotetores, além de aditivos para proteger as células e fornecer substratos para sua manutenção durante e após a congelação.

A presente revisão tem como objetivo compilar informações da literatura acerca dos diluentes, crioprotetores e aditivos usados nos protocolos de congelação do sêmen bovino.

2 Desenvolvimento

2.1 Danos espermáticos causados pela criopreservação

O espermatozóide de mamíferos é muito sensível ao resfriamento rápido, ou seja, da temperatura ambiente até próximo ao ponto de congelação da água. O dano causado pela redução da temperatura durante o resfriamento até 4° ou 5°C é denominado choque térmico e ocasiona perda irreversível da viabilidade dos espermatozóides, pela rápida diminuição da motilidade ou surgimento de padrão anormal da mesma, que passa a ser circular ou retrógrada. Há também redução da taxa de glicólise, da respiração celular e da frutólise, aumento dos danos ao DNA e liberação de material intracelular[2, 6].

A redução da temperatura leva à fase de transição dos lipídeos da membrana, passando da fase líquida ou fluida para a cristalina ou gel, resultando em uma organização mais rígida da membrana[2]. Se fosse possível eliminar a fase de transição dos lipídeos, ou ao menos diminuir a temperatura na qual a mesma ocorre, as membranas permaneceriam fluidas a baixas temperaturas e os danos subsequentes a ela seriam diminuídos[7].

Outro aspecto a ser considerado é a presença no plasma seminal, dentre outras, das proteínas BSP-A1/-A2, BSP-A3 e BSP-30 kDa, coletivamente denominadas de *bovine seminal proteins* (BSP). Estas constituem um grupo de moléculas que se liga aos fosfolipídeos da membrana espermática e atuam como fatores reguladores da capacitação espermática, estimulando o efluxo de colesterol e lipoproteínas da membrana plasmática. A preservação do plasma seminal à congelação expõe os espermatozóides às BSP e estas, ao promoverem o efluxo de colesterol, tornam os gametas mais suscetíveis à criopreservação. Tal efeito pode ser minimizado pelas lipoproteínas de baixa densidade presentes nos crioprotetores extracelulares como a gema de ovo, pois estas se ligam de forma estável às BSP impedindo sua ação prejudicial sobre a membrana plasmática[8].

Além das mudanças físicas por que passam os fosfolípidos da membrana durante o resfriamento, a regulação do influxo de cálcio também é afetada por ele, com graves consequências em termos de função celular, podendo até ser incompatível com a viabilidade do espermatozóide. O influxo de cálcio durante o resfriamento contribui tanto para o início da capacitação quanto para o início da fusão das membranas plasmática e acrossomal externa, evento denominado de reação do acrossomo[2].

Um passo crítico do processo envolve a adição e remoção do crioprotetor, que causa estresse osmótico à célula espermática e define a proporção de células que sobrevivem à congelação. Este estresse pode ser minimizado se os procedimentos de adição/remoção do crioprotetor forem feitos de forma gradual[2,9].

Em virtude do processo de criopreservação se dá a peroxidação lipídica das membranas espermáticas, com geração de espécies reativas ao oxigênio que contribuem para a ocorrência de danos celulares[10]. Estes eventos serão abordados no tópico relativo aos antioxidantes.

No tocante à curva de congelação, esta pode ser rápida ou lenta. Quando um diluidor com crioprotetor alcança temperatura ao redor de -5°C, a água intra e extracelular permanece em estado de super resfriamento. Entre –5 ºC e –10 ºC inicia-se a formação de cristais de gelo no meio extracelular, mas a água intracelular permanece super resfriada, resultando no aumento da concentração de solutos no fluido remanescente fora da célula, levando à desidratação da mesma[4].

Na curva rápida não haverá tempo para ocorrer a desidratação da célula e a concentração dos meios extra e intracelular serão semelhantes. No resfriamento lento haverá a desidratação do espermatozóide, evitando a formação de gelo intracelular. Porém, a alta concentração de solutos pode causar danos às células. A formação de cristais de gelo leva ao estresse osmótico, visto que quando uma solução é resfriada abaixo da temperatura de congelação, estes são formados, e os solutos se dissolvem no líquido remanescente, aumentando a força osmótica da solução[2]. Mesmo à temperatura de -196 °C, canais de água não congelada persistem, com altas concentrações de soluto, onde ficam os espermatozóides[11]. Assim, a taxa de congelação ideal deve ser lenta o bastante para evitar a formação de gelo intracelular, porém rápida o bastante para evitar os danos causados pela exposição prolongada às altas concentrações de soluto[12].

A descongelação, por outro lado, deve ser realizada de acordo com a taxa de congelação que foi adotada, a fim de não causar danos letais às células. Se o sêmen congelado em taxa lenta for descongelado rapidamente, poderá ocorrer grande influxo de água, que causará o rompimento da membrana plasmática. Por outro lado, se a taxa de congelação for rápida e a descongelação lenta, o gelo intracelular poderá se recristalizar em cristais maiores, provocando a lesão mecânica da membrana[11].

2.2 Diluentes para congelação de sêmen bovino

A composição do diluente é de extrema importância para a sobrevivência do espermatozóide durante a criopreservação. Várias características do meio devem ser consideradas como a concentração de crioprotetor, concentração de sais e inclusão de detergentes[13].

Os componentes básicos dos diluentes de congelação são substâncias iônicas e não-iônicas que mantêm a osmolaridade e tamponam o meio; uma fonte de lipoproteína de alto peso molecular para proteger contra o choque térmico, como a gema de ovo e o leite; açúcares, glicerol, 1,2-propanodiol ou dimetilsulfóxido (DMSO) como crioprotetores; e outros aditivos como enzimas antioxidantes e antibióticos[14].

Um sistema tampão deve ser um dos constituintes do diluidor para neutralizar os íons hidrogênio produzidos pelo metabolismo dos espermatozóides, mantendo o pH da solução próximo à neutralidade (6,8 a 7,1). Os meios tampões mais utilizados nos diluentes para sêmen de bovinos são o citrato, pois suas propriedades tamponantes melhoram a solubilidade das frações protéicas da gema do ovo e o tris-hidroximetil aminometano (TRIS)[15].

Os diluentes mais usados são à base de gema de ovo ou leite, sendo neste último caso necessário atentar para a inativação da lactenina, substância bacteriostática que age como fator tóxico ao espermatozóide[14,16]. A maior desvantagem do uso de diluentes à base de leite é a baixa visibilidade do espermatozóide ao microscópio, tornando as avaliações pós-descongelação mais difíceis. A gema de ovo em combinação com o TRIS e o citrato é a formulação mais utilizada.

Estudo recente comparou diluentes à base de leite (*Skimmed Milk Egg Yolk* - SMEY*)* e TRIS-gema de ovo (Triladyl®) quanto à preservação da integridade da cromatina espermática. Após a descongelação o Triladyl® mostrou-se superior ao SMEY, apresentando valores de fragmentação do DNA significativamente menores (6,2 vs 8,9%, respectivamente)[17].

Os resultados de testes com TRIS-gema de ovo-frutose (TRIS) e Botu-Bov®, uma inovação nacional na congelação de sêmen bovino, também à base de gema de ovo, indicaram que os mesmos não diferiram quanto à motilidade total e integridade da membrana plasmática. Porém, o Botu-Bov® mostrou-se mais eficaz na preservação da linearidade do movimento espermático após a descongelação, atributo este que por ter possível associação com a fertilidade *in vivo* sugeriu, segundo os autores, sua superioridade como diluente para congelação do sêmen de touros[18].

No entanto, deve-se atentar para o fato de que os diluentes contendo compostos de origem animal são mais difíceis de padronizar, além do risco adicional da contaminação microbiana. Desta forma, foi proposto como alternativa o uso do extrato de soja em substituição à gema de ovo, componente este usado no diluente Biociphos-Plus®. Contudo, pesquisas comparando os diluentes TRIS-citrato-gema e Biociphos-Plus® demonstraram que, considerando fatores como custos com reagentes, preparação do diluente, temperatura de envasamento, dentre outros, o TRIS apresentou resultados superiores de qualidade seminal após a descongelação e de fertilidade a campo[19,20]. Da mesma forma, ao utilizarem diluentes à base de extrato de soja AndroMed® e Biociphos-Plus® e o Biladyl® à base de gema de ovo, os autores encontraram melhores resultados para o Biladyl® quanto à integridade das membranas plasmática e acrossomais[21].

Outros relatos, no entanto, apontam resultados controversos quanto à presença ou não de produtos de origem animal nos diluentes e a qualidade do sêmen congelado.

Utilizando um diluente à base de extrato de soja (AndroMed®) e TRIS-gema de ovo na congelação do sêmen de touros leiteiros, foi observada maior motilidade para o primeiro (73,54% *vs* 59,57% - p<0,01, respectivamente). Já, para a integridade acrossomal, indução da reação acrossômica e capacidade de ligação à zona pelúcida, não foi detectada diferença significativa. Na avaliação da fertilidade, através da taxa de não-retorno ao cio aos 56 dias (TNR-56 d), os resultados foram inferiores para o sêmen congelado com TRIS (67,85% *vs* 70,45% - p<0,0001; respectivamente). Desta forma, os autores concluíram que o uso de diluentes livres de proteína animal pode contornar problemas associados ao uso da gema do ovo, incluindo contaminação bacteriana e variações na composição do meio[22]. Resultados similares foram obtidos ao se comparar um diluente à base de gema e outro livre de produtos de origem animal (Bioxell®), com melhor motilidade (44,3% *vs* 41,8%), maior proporção de espermatozóides não capacitados (68,3% *vs* 63,3%) e menor população de células com reação acrossômica (3,8% *vs* 6,2%), respectivamente, quando usado o Bioxell®[10].

Por outro lado, usando os diluentes Bioxcell® e o Botu-Bov®, constatou-se que a morfologia espermática não diferiu entre diluentes, já para a integridade das membranas plasmática, acrossomal e a função mitocondrial, o diluente Botu-Bov® apresentou melhores resultados. A motilidade espermática após descongelação, determinada pela análise computadorizada, também foi mais bem preservada com o diluente Botu-Bov® (40,1 ± 1,9%) que pelo Bioxcell® (24,1 ± 1,4%; p<0,01), possivelmente, pelas diferenças de densidade dos diluentes ou pela presença de partículas maiores no diluidor Bioxcell®, o que influenciaria na velocidade do movimento dos espermatozóides. Assim, constatou-se a superioridade do diluente Botu-Bov® na preservação da célula espermática de touros expostas ao processo de criopreservação[23].

2.3 Taxas de resfriamento durante o tempo de equilíbrio

Inicialmente, acreditava-se que o tempo de equilíbrio era necessário para a penetração do glicerol no espermatozóide bovino, porém hoje se sabe que esta penetração é rápida. Assim, o tempo de equilíbrio parece ser necessário, em especial, para que as membranas espermáticas se adaptem

às baixas temperaturas mais do que para a penetração do glicerol[21].

O objetivo do tempo de equilíbrio a certas temperaturas é permitir a translocação da água e reduzir o efeito negativo da formação de cristais de gelo durante a congelação e descongelação. A armazenagem do sêmen a 5 °C reduz a atividade metabólica, mas nem todas as mudanças que ocorrem são benéficas ao espermatozóide. Os autores citam como exemplo a atividade da bomba Na^+/K^+ ATPase, que é diminuída a baixas temperaturas, com consequente aumento da concentração intracelular de sódio, o que é prejudicial para o espermatozóide[14].

Foram comparados dois diluentes (TRIS-glicerol-gema de ovo e Bioxcell®) e diferentes tempos de equilíbrio (T0 - 0 h; T2 - 2 h e T4 - 4 h) sobre a função mitocondrial, motilidade espermática e integridade das membranas plasmática e acrossomais do sêmen criopreservado de touros Gir. A função mitocondrial não sofreu qualquer alteração. De acordo com os resultados obtidos, a combinação TRIS e tempo de equilíbrio de 4 horas forneceram as melhores taxas de motilidade e integridade das membranas plasmática e acrossomais[24].

Ao testar duas taxas de resfriamento, uma rápida de 4,2 °C/ min. e outra lenta de 0,1 °C/ min., usando o diluente Triladyl®, à base de gema de ovo, notou-se que a motilidade avaliada pelo sistema automatizado foi significativamente maior para o sêmen congelado após resfriamento rápido (72,5% *vs* 69,0%). Também houve diferença significativa quanto à cinética do movimento, sendo que quando a taxa de resfriamento foi lenta, os espermatozóides mostraram padrões de hiperativação, um tipo de movimento vigoroso que se caracteriza por ser pouco progressivo e menos linear que é apresentado pelos espermatozóides capacitados, em relação àqueles congelados a taxa rápida de resfriamento. Entretanto, não foi encontrada diferença significativa quanto à motilidade subjetiva, integridade da membrana plasmática, capacitação e integridade acrossomal, bem como na fertilidade avaliada pela TNR – 56 d. Desta forma, concluiu-se que, quando usado o diluente Triladyl®, a taxa de refrigeração lenta é menos benéfica que a rápida, quando são analisados os parâmetros de viabilidade seminal pós-descongelação[25].

2.4 Crioprotetores

Açúcares, proteínas e polímeros sintéticos são crioprotetores extracelulares, ou seja, não conseguem penetrar na célula espermática. Ao agir no meio extracelular, aumentando a pressão osmótica, induzem a desidratação da célula, diminuindo a formação de cristais de gelo intracelular[23]. Os mais comuns são os açúcares, o leite e a gema de ovo. Porém, uma desvantagem do uso da gema de ovo ou leite é o risco de contaminação por patógenos associados aos produtos de origem animal, além da dificuldade de padronizar o meio diluente[19,21]. Assim, surgiram aqueles livres de produtos de origem animal, como os preparados à base de lecitina de soja.

Apesar do mecanismo de proteção conferido pela gema de ovo não estar esclarecido, pesquisas citam que suas proteínas de baixa densidade interagem com proteínas presentes no plasma seminal de touros, como as BSP, sequestrando-as e, desta forma, impede o efluxo de colesterol e fosfolipídeos do plano da membrana[26].

Com base nos estudos que indicam que as proteínas de baixa densidade conferem proteção ao sêmen durante a congelação, foram testados diluentes com gema de ovo integral (Optidyl®) e com proteína de baixa densidade (*low-density lipoprotein* – LDL). Valores de motilidade foram significativamente maiores para o diluente com LDL (54,4% *vs* 30,2%). Em relação à integridade acrossomal e da membrana plasmática, não houve diferença significativa entre os diluentes. Na avaliação da fertilidade, medida através da taxa de clivagem, valores significativamente mais altos ($p<0,05$) foram encontrados para o sêmen congelado com LDL (63,0% *vs* 54,8%), porém não houve diferença entre diluentes para a taxa de blastocisto. Todavia, os autores relatam que estes resultados de fertilidade também podem ter sido influenciados pela distribuição aleatória dos oócitos, os quais foram coletados de folículos de diferentes tamanhos, e sabe-se que o tamanho do folículo está diretamente relacionado com a fertilidade[16].

Estudo recente foi realizado para comparar a atividade crioprotetora da LDL isolada da gema de ovo com a atividade da gema de ovo integral[27]. Foram testadas diferentes concentrações de LDL no diluente, sendo elas de 7, 8, 9 ou 10%, enquanto o grupo controle continha 20% de gema de ovo integral. A motilidade espermática foi significativamente maior para a concentração de 8% de LDL (55,8 ± 12,8%). A gema de ovo a 20% apresentou maiores alterações no padrão de movimentação dos espermatozóides (41,4 ± 15,2%) não diferindo estatisticamente das concentrações de 7 e 10% de LDL.

Os diluentes TRIS glicerol (TG), TRIS-glicerol-gema de ovo (*egg-yolk* TRIS – EYT) e fração lipoprotéica de baixa densidade (LDL) foram comparados a fim de testar a hipótese de que a LDL é o constituinte da gema de ovo responsável por prevenir a ligação das proteínas do plasma seminal à membrana do espermatozóide. Após incubação a 4 °C do sêmen diluído, observou-se ganho gradual de colesterol e colina após 8 horas para os diluidores EYT e LDL, com aumento significativo após 24 horas ($p<0,01$). Em relação à motilidade, após 24 horas de incubação, valores significativamente maiores foram encontrados para LDL ($p<0,05$), em relação ao EYT, que por sua vez foi significativamente superior quando comparado ao TG ($p<0,05$). Tais resultados levaram os autores a concluir que a associação das lipoproteínas de baixa densidade, presentes na gema do ovo, com as proteínas do plasma seminal, protege o sêmen contra o efluxo de colesterol e dos fosfolipídeos[28].

Visando conferir maior proteção ao sêmen bovino durante a criopreservação foi testado o efeito crioprotetor da glutamina em combinação com a LDL[29]. Os autores concluíram que

altas concentrações de glutamina apresentam efeito tóxico para os espermatozóides de touro, provavelmente devido ao aumento da pressão osmótica do meio, que está diretamente relacionada com o aumento da concentração do aminoácido. A associação glicerol, LDL e glutamina na concentração de 10 mM apresentaram efeitos benéficos sobre a motilidade espermática e pode ser utilizada para otimizar a preservação da viabilidade dos gametas masculinos.

O crioprotetor intracelular mais utilizado na congelação do sêmen bovino é o glicerol. Apesar do mecanismo crioprotetor deste agente ainda não estar claro[22], sabe-se que o mesmo exerce efeitos extra e intracelulares. Caracteriza-se como ação extracelular sua participação na desidratação osmótica da célula com consequente diminuição do volume de água intracelular no momento da congelação e efeito intracelular decorre da habilidade de permear a membrana celular e assim reduzir o estresse osmótico intracelular decorrente da desidratação. Isto ocorre pela substituição da água intracelular, necessária para a manutenção do volume celular, interação com íons e macromoléculas e, em especial, pela redução do ponto de congelação da água[4,14].

Outros crioprotetores intracelulares utilizados em menor escala são o dimetilsulfóxido, 1,2-propanodiol e o etilenoglicol. A substituição do glicerol por crioprotetor de menor toxicidade aumenta a sobrevivência dos espermatozóides sem reduzir sua capacidade fecundante após a descongelação. Vários açúcares agem como crioprotetores extracelulares e podem prevenir danos às células por desidratá-las antes da congelação, inibindo a formação de gelo intracelular, porém os resultados são contraditórios.

Para avaliar o efeito da presença de açúcar foram utilizados ejaculados de touros de raça leiteira para a congelação com diluente à base de leite integral, acrescido ou não de frutose como crioprotetor extracelular. Os melhores resultados de motilidade ($p<0,01$) foram obtidos para o sêmen congelado com diluente contendo frutose em sua composição (46,0% *vs* 44,2%)[30]. Já, o uso da sacarose em lugar do glicerol também poderia beneficiar a sobrevivência dos espermatozóides descongelados, particularmente nas espécies mais sensíveis ao choque osmótico como a ovina e bovina. No entanto, ao testar ambos como crioprotetores, observou-se que quando usada apenas a sacarose, a motilidade não foi mantida após a descongelação, sendo o contrário obtido para o glicerol ($p<0,05$)[31]. Portanto, verifica-se que a associação entre eles é que resulta em maior proteção aos espermatozóides.

Diluentes contendo vários agentes crioprotetores foram divididos nos seguintes grupos: crioprotetores intracelulares (glicerol e 1,2-propanodiol); crioprotetores extracelulares (polivinilpirrolidona – PVP e sacarose); e agentes estabilizadores de membrana (gema de ovo, vesículas lipídicas e albumina sérica bovina – BSA), em diferentes concentrações. Para a integridade da membrana plasmática não foi detectada diferença significativa quanto à porcentagem de células intactas nas concentrações de 0 a 8% de glicerol e foi observada alta percentagem de espermatozóides lesados quando usado o 1,2-propanodiol (59,0% *vs* 35,0%). Dentre os crioprotetores extracelulares o PVP apresentou menor taxa de espermatozóides lesados quando comparado ao glicerol a 6% (32,0% *vs* 56,0%), enquanto a sacarose não diferiu do glicerol e, diluentes contendo gema de ovo apresentaram melhores resultados para viabilidade. Os pesquisadores concluíram que a redução da concentração de glicerol não afeta negativamente a integridade da membrana plasmática, pois não encontraram diferença significativa para concentrações de 0 a 8% de glicerol, para taxas iguais de resfriamento, porém recomendam mais estudos para verificar a necessidade da adição deste crioprotetor[32].

Testando os crioprotetores glicerol, etilenoglicol e dimetilformamida, usando diluente à base de gema de ovo, foram encontrados melhores resultados ($p<0,05$) para o glicerol, respectivamente, quanto à motilidade (30,67% *vs* 21,17% e 8,33%), vigor (2,52 *vs* 1,70 e 1,68) e integridade das membranas plasmática (15,58% *vs* 9,70% e 5,33%), acrossomais (52,1% *vs* 32,52% e 29,23%) e mitocondrial (18,07% *vs* 11,55% e 6,70%)[33].

Uma substância pouco utilizada na criopreservação é o iodixanol, originalmente desenvolvida como agente de contraste radiológico, mas atualmente, devido as suas propriedades físico-químicas, foi adotado como gradiente de densidade durante a centrifugação para seleção de células viáveis e, em trabalho recente, esta substância (OptiPrep®) também foi testada como opção de crioprotetor[34]. No estudo foi utilizado o diluente Andromed®, acrescido de 0% (controle); 1,25%; 2,5% e 5% de OptiPrep®. Os resultados mostraram que o iodixanol a 2,5% preservou a integridade e funcionalidade da membrana plasmática durante o processo de criopreservação, além de manter a motilidade espermática, enquanto a concentração de 5% foi prejudicial às células, mesmo a fresco.

2.5 Outros aditivos

2.5.1 Antioxidantes

Os efeitos da criopreservação sobre a função espermática são similares àqueles da capacitação espermática e ambos levam ao aumento da permeabilidade da membrana e à geração de espécies reativas ao oxigênio (ROS)[4]. Os autores acreditam que a adição de colesterol ao sêmen visando melhorar a estabilidade das membranas e o uso de antioxidantes para minimizar os efeitos deletérios dos radicais livres, podem melhorar a qualidade do sêmen congelado.

O evento deletério da peroxidação lipídica das membranas ocorre devido ao estresse oxidativo causado pela produção excessiva de radicais livres gerados pelo choque térmico e congelação. Seus efeitos incluem depleção de adenosina-trifosfato (ATP), com perda irreversível da motilidade, danos ao DNA e redução da fusão com o ovócito[10]. Os autores

mencionam que no sêmen há um delicado equilíbrio entre o potencial antioxidante do plasma seminal e espermatozóides, sendo que as atividades pró-oxidantes do metabolismo espermático, especialmente ativo em condições não fisiológicas como a manipulação *in vitro*, determinam à taxa média de peroxidação lipídica.

Ao analisarem algumas enzimas antioxidantes no sêmen de touros de corte, e a extensão do estresse oxidativo[35] os autores encontraram alta correlação negativa entre peroxidação lipídica e motilidade (r = -0,90) e viabilidade (r = -0,93) espermáticas, o que indica declínio destes parâmetros com o aumento da peroxidação. Também encontraram alta correlação entre a presença de enzimas antioxidantes e motilidade (r = 0,93 a 0,98) e viabilidade (r = 0,94 a 0,98).

Estudo recente indica que a enzima hidroperóxido glutationa peroxidase fosfolipídeo (PHGPx) confere proteção ao espermatozóide contra o estresse oxidativo e, os resultados revelaram que amostras com atividade enzimática superior a 130 mU/mg obtiveram maior motilidade progressiva (61,6 ± 8,1%) e menor percentual de anormalidades espermáticas totais (19,0 ± 12,6%), quando comparadas àquelas contendo espermatozóides com atividade enzimática menor (30,0 ± 15,1% e 39,4 ± 21,3%, respectivamente; p<0,01). Assim, a avaliação da atividade da enzima PHGPx é um método alternativo para a determinação mais acurada da viabilidade potencial dos espermatozóides[36].

Mecanismos enzimáticos de defesa contra a peroxidação lipídica incluem a superóxido dismutase (SOD), catalase e glutationa redutase e peroxidase. Já, entre os antioxidantes não enzimáticos estão o urato, ácido ascórbico, vitamina E, taurina, hipotaurina, carotenóides e piruvato[10].

A enzima glutationa (GSH) é um peptídeo distribuído ubiquamente nas células vivas, exercendo papel importante no mecanismo intracelular de proteção contra o estresse oxidativo. Pode reagir com muitas espécies reativas ao oxigênio ou agir como co-fator para a enzima glutationa peroxidase, que catalisa a redução de H_2O_2 tóxica e hidroperóxidos[37].

Pesquisando a concentração de GSH em dois diluidores, à base de gema de ovo e sem produtos de origem animal (Bioxell®), foi observado decréscimo na concentração de GSH para o diluente à base de gema de ovo. O Bioxell® manteve os níveis do peptídeo após a diluição, resfriamento e congelação do sêmen (p<0,05). De fato, ao analisarem a concentração do peptídeo nos dois diluentes, foi detectada concentração de 450 µM no Bioxell® e 40 µM no diluente com gema de ovo[10].

Ao testar a adição de antioxidantes ao sêmen sexado foi observado que, após 24 e 48 horas sob refrigeração a 15 °C, houve redução significativa (p<0,05) da motilidade para os grupos catalase + piruvato de sódio (Gr1) e catalase + piruvato de sódio + albumina sérica bovina (Gr2) em relação ao controle (56,7% e 58,9% *vs* 63,9%, respectivamente). Também não houve diferença significativa entre grupos para a taxa de prenhez. No entanto, a percentagem de espermatozóides com acrossomo lesado foi menor (p<0,05) para o Gr2 (3,2%) quando comparado ao controle (8,0%). Assim, concluiu-se que, por ser o sêmen sexado mais propenso à lesão peroxidativa, a adição de antioxidantes pode ser benéfica à preservação dos espermatozóides[38].

A diferença entre as concentrações ROS e antioxidantes presentes no plasma seminal leva ao estresse oxidativo, com consequente lesão da membrana do espermatozóide.

O manganês adicionado aos diluidores durante a criopreservação tem efeito antioxidante devido à sua capacidade de sequestrar radicais peroxil conforme a reação: $R\text{-}OO + Mn^{++} + H^{(+)} \rightarrow ROOH^{+} + Mn$. O efeito antioxidante do manganês foi testado mediante sua adição ao diluidor à base de gema de ovo-citrato-glicerol, em diferentes concentrações de $MnCl_2$. Após a descongelação os maiores percentuais de motilidade espermática e integridade da membrana plasmática foram obtidos para a concentração de 150 µM que diferiu (p<0,05) das concentrações de 0, 100 e 200 µM[39].

2.5.2 Inibidores da capacitação espermática prematura

Os espermatozóides submetidos à criopreservação estão no início do processo de capacitação e, ao serem descongelados, apresentam características típicas de estágios avançados da capacitação[4]. Um dos passos iniciais desta é a perda de colesterol da membrana plasmática, desestabilizando-a e aumentando a capacidade de fusão com a membrana acrossomal externa[40].

Verificando se diluidores à base de gema de ovo levam à capacitação prematura, pesquisadores testaram diferentes curvas de resfriamento do sêmen até 4 °C e posterior congelação, em um meio contendo gema de ovo e outro não capacitante (Tyrode's modificado + PVA). Foi feita a incubação do sêmen por 6 horas, em meio capacitante contendo heparina, a fim de mimetizar as condições encontradas no trato reprodutivo feminino. Os resultados mostraram valores três vezes maiores de espermatozóides capacitados no sêmen congelado (p<0,05). Após 3 e 6 horas de incubação não houve diferença entre os tratamentos que utilizaram gema de ovo, entretanto após 6 horas todos os grupos apresentaram aumento significativo no número de células capacitadas (p<0,05). Assim, concluiu-se que diluidor à base de gema de ovo não apresentou boa capacidade de inibir a capacitação prematura do sêmen criopreservado[41].

Posteriormente, ao testarem a glicose como inibidor da capacitação induzida pela congelação, não encontraram diferença significativa para o número de espermatozóides capacitados nem para viabilidade espermática entre o diluidor contendo glicose e aquele contendo frutose[42].

Partindo da premissa de que o colesterol desempenha papel importante na estabilização das membranas espermáticas[7], foi avaliado o tratamento do sêmen bovino com o complexo ciclodextrina-colesterol (CLC). Utilizando como diluentes o TRIS-gema de ovo e outro composto de citrato de sódio, foi

encontrado aumento significativo (p<0,05) da motilidade para o TRIS com CLC (60,0% *vs* 42,0%). Para o diluidor composto de citrato de sódio não houve efeito da adição do CLC. Quanto à viabilidade, analisada pela coloração fluorescente SYBR-14/PI, a adição de 1,5, 3,0 e 4,5 mg de CLC / ml ao TRIS, ocasionou aumento significativo (p<0,05) no número de espermatozóides viáveis. Desta forma, concluíram ser benéfica aos espermatozóides a incubação do sêmen com CLC antes da criopreservação.

2.5.3 Proteínas anticongelantes

Em 1969 foi descoberto que algumas espécies de peixes antárticos podem resistir à congelação, característica esta atribuída à presença de proteínas específicas que posteriormente foram denominadas de proteínas anticongelantes. No sentido de estudar a ação dessas proteínas anticongelantes na prevenção da formação de cristais de gelo, foi testada a adição de três delas (AFPI, AFPIII e AFGP) ao sêmen diluído em TRIS-gema de ovo. Não foi encontrada diferença significativa para viabilidade espermática e percentagem de acrossomos íntegros. Quanto à resistência osmótica, um indicador do grau de estabilidade da membrana, a proteína AFPI aumentou significativamente a proporção de células viáveis, quando adicionada nas concentrações de 0,1, 1,0 e 10 µg/ml (p<0,01). Ao examinar a ação das proteínas na formação de cristais de gelo, somente o AFPI promoveu alteração na estrutura dos cristais. Assim, concluiu-se que a AFPI é a proteína mais importante relacionada com fatores anticongelantes e, está mais relacionada às alterações na estrutura dos cristais de gelo do que na interação com a membrana plamática[43].

3 Conclusão

Vários compostos são adicionados aos meios diluidores de sêmen buscando conferir maior crioresistência aos espermatozóides durante o ciclo de congelação/descongelação. Porém, apesar das inúmeras pesquisas na área e mesmo sendo a espécie bovina a mais bem sucedida na criopreservação do sêmen, cerca de 50% das células ainda se tornam inviáveis após o processo. Dentre os diversos diluentes utilizados na criopreservação do sêmen bovino, nota-se que aqueles à base de gema de ovo são os mais comuns, o que não é surpresa, visto que na maioria dos experimentos, a gema de ovo apresenta melhores resultados. Porém, existe uma preocupação crescente acerca do uso de componentes de origem animal nos meios diluidores, os quais podem acarretar riscos à biossegurança por possibilitarem eventual transmissão de patógenos, através do sêmen congelado, quando este é enviado a diferentes países. Como alternativa vêm sendo utilizados diluentes livres de proteínas de origem animal. Outros aditivos também têm sido acrescidos buscando aumentar a qualidade e a fertilidade do sêmen congelado como os agentes antioxidantes inibidores da capacitação espermática prematura e proteínas anticongelantes. Assim, apesar dos grandes avanços obtidos desde a descoberta do glicerol, estudos sobre crioprotetores e demais aditivos se fazem necessários a fim de melhorar a criorresistência dos gametas e, desta forma, aumentar o rendimento de doses / ejaculado e as taxas de prenhez.

Referências

1. Nagy S, Hallap T, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H. Changes in plasma membrane and acrosome integrity of frozen-thawed bovine spermatozoa during a 4 h incubation as measured by multicolor flow cytometry. Anim Reprod Sci 2004;80:225-35.
2. Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. Anim Reprod Sci 2000;60-61:481-92.
3. Liu Z, Foote RH, Brockett C. Survival of bull sperm frozen at different rates in media varying in osmolarity. Cryobiology 1998;37:219-30.
4. Medeiros CMO, Forell F, Oliveira ATD, Rodriguez JL. Current status of sperm cryopreservation: why isn't better? Theriogenology 2002;57:327-34.
5. Shannon P, Vishnawath R. The effect of optimal and suboptimal concentrations of sperm on the fertility of fresh and frozen bovine semen and a theorical model to explain the fertility differences. Anim Reprod Sci 1995;30:1-10.
6. Holt WV. Basic aspects of frozen storage of semen. Anim Reprod Sci 2000;62:3-22.
7. Purdy PH, Graham JK. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. Cryobiology 2004;48:36-45.
8. Manjunath P, Nauc V, Bergeron A, Ménard M. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. Biol Reprod 2002;67:1250-8.
9. Guthrie HD, Liu J, Crister JK. Osmotic tolerance limits and effects os cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa. Biol Reprod 2002;67:1811-6.
10. Stradaioli G, Noro T, Sylla L, Monaci M. Decrease in glutathione (GSM) content in bovine sperm after cryopreservation: comparison between two extenders. Theriogenology 2007;67:1249-55.
11. Squires EL, Pickett BW, Graham JK, Vanderwall DK, McCue PM, Bruemmer JE. Cooled and frozen stallion semen. Colorado: Colorado State University. Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory; 1999.
12. Holt WV. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. Theriogenology 2000;53:47-58.
13. Chaveiro A, Machado L, Frijters A, Engel B, Woelders H. Improvement of parameters of freezing medium and freezing protocol for bull sperm using two osmotic supports. Theriogenology 2006;65:1875-90.
14. Vishwanath R, Shannon P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. Anim Reprod Sci 2000;62:23-53.
15. Borges, J.C. Utilização de antioxidantes associados ou não a emulsificante na criopreservação de sêmen bovino. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; 2003.
16. Amirat L, Tainturier D, Jeanneau L, Thorin C, Gérard O, Courtens JL, Anton M. Bull semen *in vitro* fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl®, a commercial egg yolk extender. Theriogenology 2004;61:895-907.
17. Waterhouse KE, Gjeldnes A, Tverdal A, De Angelis PM, Farstad W, Haard M, Kommisrud E. Alterations of sperm DNA integrity during cryopreservation procedure and *in vitro* incubation of bull semen. Anim Reprod Sci 2010;117:34-42.

18. Crespilho AM, Papa FO, Alberti K, Filho ERS, Martins Junior A, Novaes JLC et al. Eficiência comparativa entre dois diluidores para a congelação de sêmen bovino sobre os padrões de motilidade e integridade de membrana plasmática. Ars Vet 2006;22(3):229-35.
19. Thun R, Hurtado M, Janett F. Comparison of Biociphos-Plus® and TRIS egg-yolk extender for cryopreservation of bull semen. Theriogenology 2002;57:1087-94.
20. De Leeuw AMVW, Haring RM, Kaal-Lansbergen LMTE, Den Daas JHG. Fertility results using bovine semen cryopreserved with extenders based on egg yolk and soybean extract. Theriogenology 2000;54:57-67.
21. Muiño R, Fernandez M, Peña AI. Post-thaw survival and longevity of Bull spermatozoa frozen with na egg yolk-based or two egg yolk-free extenders after an equilibration period of 18h. Reprod Domes Anim 2007;42:305-11.
22. Aires VA, Hinsch KD, Mueller-Schloesser F, Bogner K, Mueller-Schloesser S, Hinsch E. In vitro and in vivo comparison of egg-yolk based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. Theriogenology 2003;60:269-79.
23. Celeghini ECC, Arruda RP, Andrade AFC, Nascimento J, Raphael CF, Rodrigues PHM. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. Anim Reprod Sci. 2008;104:119-31.
24. Leite TG, Filho VRV, Arruda RP, Andrade AFC, Emerick LL, Zaffalon FG, Martins JAM, Andrade VJ. Effects of extender and equilibration time on post-thaw motility and membrane integrity of cryopreserved Gyr bull semen evaluated by CASA and flow cytometry. Anim Reprod Sci 2010;120:31-38.
25. Januskauskas A, Gil J, Soderquist L, Haard MGM, Haard MCH, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H. Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility of dairy semen used for artificial insemination in Sweden. Theriogenology 1999;52:641-58.
26. Bergeron A, Crête MH, Brindle Y, Manjunath P. Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. Biol Reprod 2004;70:708-17.
27. Hu JH, Li QW, Zan LS, Jiang ZL, An JH, Wang LQ, Jia YH. The cryoprotective effect of low-density lipoproteins in extenders on bull spermatozoa following freezing-thawing. Anim Reprod Sci 2010;117:11-7.
28. Bergeron A, Crête MH, Brindle Y, Manjunath P. Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. Biol Reprod 2004;70:708-17.
29. Briand LA, Bencharif D, Munoz OV, Ali HBH, Destrumelle S, Desherces S, Schmidt S, Anton M, Tainturier D. Effect of glutamine on post-thaw motility of bull spermatozoa after association with LDL (low density lipoproteins) extender: Preliminary results. Theriogenology 2009;71:1209-14.
30. Foote RH, Kaproth MT. Large batch freezing of bull semen: effect of time of freezing and fructose on fertility. J Dairy Sci 2001;85:453-56.
31. Awad MM, Graham JK. A new pellet technique for cryopreserving ram and bull spermatozoa using the cold surface of cattle fat. Anim Reprod Sci 2004;84:83-92.
32. De Leeuw FE, De Leeuw AM, Den Daas JHG, Colenbrander B, Verkleij AJ. Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. Cryobiology 1993;30:32-44.
33. Gonzalez RAF. Efeito da criopreservação usando diferentes técnicas de congelação e crioprotetores sobre parâmetros espermáticos e a integridade das membranas do espermatozóide bovino. Pirassununga: Universidade de São Paulo; 2004.
34. Saragusty J, Gacitua H, Rozenboim I, Arav A. Protective effects of iodixanol during bovine sperm cryopreservation. Theriogenology 2009;71:1425-32.
35. Nair SJ, Brar AS, Ahuja CS, Sangha SPS, Chaudhary KC. A comparative study on lipid peroxidation, activities of antioxidant enzymes and viability of cattle and buffalo bull spermatozoa during storage at refrigeration temperature. Anim Reprod Sci 2006;96:19-21.
36. Stradaioli G, Sylla L, Monaci M, Maiorino M. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in bull spermatozoa provides a unique marker in the quest for semen quality analysis. Theriogenology 2009;72:91-98.
37. Bilodeau JF, Blanchette S, Gagnon C, Sirard MA. Thiols prevent H_2O_2-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. Theriogenology 2001;56:275-86.
38. Klinc P, Frese D, Osners H, Rath D. Insemination with sex sorted fresh bovine spermatozoa processed in the presence of antioxidant substances. Reprod Domes Anim 2007;42:58-62.
39. Cheema RS, Bansal AK, Bilaspuri GS. Manganese provides antioxidant protection for sperm cryopreservation that may offer new consideration for clinical fertility. Oxid Med Cell Long 2009;2-3:152-9.
40. Li G, Saenz J, Godke RA, Devireddy RV. Effect of glycerol and cholesterol-loaded cyclodextrin on freezing-induced water loss in bovine spermatozoa. Reproduction 2006;131:875-86.
41. Cormier N, Sirard MA, Bailey JL. Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. J Androl 1997;18:461-8.
42. Cormier N, Bailey JL. A differential mechanism is involved during heparin- and cryopreservation- induced capacitation of bovine spermatozoa. Biol Reprod 2003;69:177-85.
43. Prathalingam NS, Holt WV, Revell SG, Mirczuk S, Fleck RA, Watson PF. Impact of antifreeze proteins and antifreezes glycoproteins on bovine sperm during freeze-thaw. Theriogenology 2006;66:1894-900.