



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR**

**LIOFILIZAÇÃO DE ESPERMATOZÓIDES BOVINOS:
VIABILIDADE ESTRUTURAL E FUNCIONAL**

CARLOS FREDERICO MARTINS

**Brasília - DF
2006**

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR

**LIOFILIZAÇÃO DE ESPERMATOZÓIDES BOVINOS: VIABILIDADE
ESTRUTURAL E FUNCIONAL**

CARLOS FREDERICO MARTINS

Orientador: Dr. Rodolfo Rumpf

TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA AO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM BIOLOGIA, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO DE BIOLOGIA MOLECULAR.

APROVADA POR:

Dr. RODOLFO RUMPF (EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA).

Dra. SÔNIA NAIR BÃO (UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA-UnB).

Dr. ALBERTO LOPES GUSMÃO (UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA-UFBA).

Dr. HÉLIO BLUME (UNIÃO PIONEIRA DE INTEGRAÇÃO SOCIAL-UPIS).

Dra. MARGOT ALVES NUNES DODE (EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA).

FICHA CATALOGRÁFICA

Martins, Carlos Frederico.

Liofilização de espermatozóides bovinos: viabilidade estrutural e funcional. / Carlos Frederico Martins. Brasília, 2006. 110p.: il

Tese (Doutorado) – Universidade de Brasília. Faculdade de Ciências Biológicas.

Orientador: Rodolfo Rumpf.

1. Bovino. 2. Reprodução animal. 3. Genética. 4. ICSI. 5. Sperm freeze-drying. 6. Preservação. 7. TUNEL. I. Rumpf, Rodolfo.

636.082 - CDU

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Antonio Aparecido Martins e Maria
Aparecida de Medeiros Martins
e
especialmente a minha esposa Tatiana e ao meu filho
Gabriel Antonio,
pelo apoio e paciência nos momentos de ausência devido ao empenho
nesta tese.

AGRADECIMENTOS

Á Deus, por todas as oportunidades e desafios desta vida.

A minha família, especialmente aos meus pais, Antonio e Maria, e meus irmãos Alex e Fabrício, a sua esposa Teresa e minha sobrinha Eduarda, pelos exemplos e pela convivência de uma família harmoniosa.

Á minha esposa Tatiana e meu filho Gabriel, pelo amor e por suportarem minha ausência em muitos momentos devido ao grande empenho nesta tese.

Ao meu orientador Rodolfo Rumpf, por acreditar no meu trabalho e pelo apoio fundamental durante esta longa jornada e pela nossa grande amizade.

Ao Dr. Gusmão por sua importante colaboração como membro da banca desta tese.

Ao Dr. Cabral pelo respeito e incentivo durante todos os momentos de convivência.

Á Dra. Margot Dode, pelo auxílio contínuo e pelo exemplo de pessoa.

À Professora Sônia Bão por toda colaboração e apoio neste trabalho

Ao Dr. Hélio Blume pela sua imprescindível participação como membro da banca desta tese

Aos grandes amigos Regivaldo e Marcelo por seus conhecimentos e por sempre estarem prontos a ajudar a todos.

Aos Drs Maurício Machaim, Ivo Pivatto, Roberto Sartori e Eduardo Melo, pela amizade e apoio durante este trabalho.

A minha nova família, a Noêmia, Ruy, Luciana, Marcio, Isabella, Marco, Jaqueline, Aline e Ana Carolina, pela convivência diária.

Ao grande amigo Evandro e sua família, pelos bons momentos passados.

Aos grandes amigos da Embrapa: Abadia, Arlindo, Alexandre, Emivaldo, Expedito, Geórgia, Karine, Katlen, Léo Goiano, Léo Gaúcho, Lidiane, Lílian, Linda, Manoel, Milton, Rosângela, Rambo, Sarah, Teco, Tonha e Zé por nossa importante amizade.

Aos grandes amigos do Ceub, em especial a Marta, Adriene, Maria Augusta, Valdi Jaqueline e Magda, e também a todo pessoal da secretaria do bloco 9 e ao pessoal do Labocien, pela excelente convivência durante todos esses anos.

“Se um dia tudo lhe parecer perdido, lembre-se de que você nasceu sem nada, e que tudo que conseguiu foi através de esforços e os esforços nunca se perdem, somente dignificam as pessoas”

(Charles Chaplin)

ÍNDICE DE TABELAS

Capítulo segundo

Tabela 1: Comparison between Acridine Orange Test (AOT) and TUNEL assay to asses DNA damage in bovine sperm submitted to lyophilization with different freeze-drying media-----64

Tabela 2: Percentage of bovine oocytes presenting sperm head decondensation and pronucleus formation (PN) after ICSI with spermatozoa lyophilized with different freeze-drying media-----65

Capítulo terceiro

Tabela 1: Evaluation of the main sperm cell components by transmission electron microscopy after freeze-drying using different dilution media-----87

Tabela 2: Percentage of bovine oocytes presenting sperm head decondensation and pronucleus formation after ICSI with spermatozoa lyophilized with different freeze-drying media-----90

Tabela 3: Embryo development after ICSI with spermatozoa lyophilized with different freeze-drying media -----91

LISTA DE FIGURAS

Capítulo primeiro

Figura 1: Estrutura dos espermatozóides bovinos -----17

Capítulo segundo

Figura 1: Acridine Orange Test aplicado nos espermatozóides liofilizados, demonstrando a cromatina íntegra e danificada -----62

Figura 2: Avaliação da fragmentação de DNA pela técnica de TUNEL.-----63

Figura 3: Relação entre fragmentação de DNA e formação de pró-núcleos pela ICSI
-----66

Capítulo terceiro

Figura 1: Protocolo Experimental-----80

Figura 2: Avaliação da integridade do acrossoma nos espermatozóides liofilizados pelo corante trypan blue giemsa -----86

Figura 3: Avaliação de microscopia eletrônica de transmissão dos espermatozóides liofilizados -----88

Figure 4: Avaliação da fragmentação de DNA nos espermatozóides liofilizados pela técnica de TUNEL -----89

Capítulo quarto

Figure 1: Análise da retenção da cauda e acrossoma após a liofilização espermática
----- 103

Figura 2: Figura representativa do processo de injeção intracitoplasmática de espermatozóides convencional----- 106

Figura 3: Formação pró-nuclear após a ICSI com espermatozóide conservado por liofilização ----- 107

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AOT	Acridine orange test
ANOVA	Análise de variância
BSA	Bovine serum albumin
CSF	Citosol sperm factor
DMAP	Dimetilaminopurine
DMEN	Dubelcco's modified Eagle's medium
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA	Etileno glicol amino éter tetracético acid
FCS	Fetal calf serum
FSH	Hormônio folículo estimulante
g	Giros (medida de rotação de centrífuga)
ICSI	Intracytoplasmic sperm Injection
LH	Hormônio luteinizante
M	Molar
M II	Metáfase 2
Min	Minutos
MPF	Maturation promotion factor
mRNA	RNA mensageiro
PBS	Phosphate-buffered saline
pH	Potencial hidrogeniônico
PVP	Polyvinylpyrrolidone
SD	Standard deviation
SFB	Soro fetal bovino
SOAF	Fator espermático ativador do ovócito
SOF	Sintetic oviduct fluid
TALP	Tirodes albumin lactate pyruvate
TCM 199	Meio para cultura de tecidos
TdT	Terminaldeoxynucleotidi transferase
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUDP nick-end labeling
UI	Unidades internacionais
v/v	Razão volume por volume
µg	Microgramas
µl	Microlitros

ÍNDICE

CAPÍTULO PRIMEIRO

RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1- INTRODUÇÃO GERAL	14
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1. Estrutura espermática	16
2.2. Criopreservação convencional	18
2.3. Liofilização espermática	21
2.4. Substâncias núcleo-protetoras na liofilização	25
2.5. Injeção intracitoplasmática de espermatozóide	27
2.6 Ativação ovocitária artificial	30
2.7 Cultivo embrionário	34
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

CAPÍTULO SEGUNDO

4. Utilização do teste com acridina laranja e TUNEL para avaliar a integridade dos espermatozóides liofilizados de bovinos.	50
4.1. Resumo	50
5. THE USE OF ACRIDINE ORANGE TEST AND TUNEL ASSAY TO ASSESS DNA INTEGRITY OF BOVINE FREEZE-DRIED SPERMATOOZOA	52
6. ABSTRACT	53
7. INTRODUCTION	54
8. MATERIAL AND METHODS	56
8.1. Animals	56
8.2. Solution for freeze-drying spermatozoa	56
8.3. Sperm freeze-drying	57
8.4. Rehydration	57
8.5. Evaluation of chromatin stability by Acridine Orange Test	57
8.6. Detection of DNA fragmentation by TUNEL assay	58
8.7. Gametes preparation for ICSI	59
8.8. Sperm microinjection	59
8.9. Oocyte activation and embryo culture	60
8.10. Evaluation of fertilization	60
8.11. Statistical analysis	61
9. RESULTS	61
10. DISCUSSION	66
11. REFERENCES	69

CAPITULO TERCEIRO

12. Efeito dos diferentes tratamentos de liofilização sobre os espermatozoides bovinos: avaliações citológicas, ultraestruturais, de fragmentação do DNA e da habilidade de fecundação.....	72
12.1. Resumo	72
13. EFFECT OF DIFFERENT FREEZE-DRYING TREATMENT ON BOVINE SPERMATOZOA: CYTOLOGICAL, ULTRASTRUCTURAL, DNA FRAGMENTATION AND FERTILIZATION ABILITY EVALUATION	74
14. ABSTRACT	75
15. INTRODUCTION	76
16. MATERIALS AND METHODS	78
16.1. Animals	78
16.2. Solution for freeze-drying spermatozoa	78
16.3. Experimental design.....	78
16.4. Sperm freeze-drying	79
16.5. Rehydration.....	80
16.6. Plasma membrane and Acrosome integrity.....	81
16.7. Ultrastructural assessment	81
16.8. Detection of DNA fragmentation by TUNEL assay.....	82
16.9. Gametes preparation for ICSI	83
16.10. Sperm microinjection	83
16.11. Oocyte activation and embryo culture	84
16.12. Evaluation of decondensed sperm head and pronucleus formation	84
16.13. Statistical analysis	85
17. RESULTS	85
17.1. Evaluation of optical microscopy.....	85
17.2. Ultrastructural assessment	86
17.3. DNA fragmentation assay	89
17.4. Development of oocytes after ICSI	90
18. DISCUSSION	91
19. REFERENCES.....	96

CAPÍTULO QUARTO

20. DISCUSSÃO GERAL E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	101
21. REFERÊNCIAS.....	109

RESUMO

A liofilização é um método que visa à preservação celular através da 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. Nesta tese foi testado o efeito da liofilização com diferentes meios protetores sobre a estrutura e a função dos espermatozóides bovinos. Para isto foram testados os seguintes meios: (T 1) - TCM hank's com 10% de SFB; (T 2) - TCM hank's com 10% de SFB e trehalose 0,2 M; (T 3) – Solução de EGTA, composta de 50mM/L de EGTA [ethylene glycol-bis(β -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid] e 10mM/L de tris-HCl. Os efeitos da liofilização espermática foram estudados utilizando-se a microscopia óptica, para avaliar motilidade, retenção de cauda e de acrossoma com o uso da coloração de giemsa; a microscopia eletrônica, para avaliar ultra-estruturas importantes, tais como: membrana plasmática, acrossoma, mitocôndrias e microtúbulos; microscopia de fluorescência para avaliar a condição nuclear, através das técnicas de acridine orange test (AOT) e terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUDP nick-end labeling (TUNEL); e finalmente a injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI), para verificar o potencial de fecundação e de desenvolvimento embrionário dos espermatozóides liofilizados. Os resultados do primeiro trabalho indicaram que a viabilidade nuclear pode ser preservada de acordo com o meio protetor utilizado. Ainda demonstrou que a técnica de TUNEL é mais sensível que AOT para identificar danos nucleares, sendo a mais indicada para esta finalidade. No segundo trabalho, os dados revelaram que a liofilização ainda é um método agressivo aos espermatozóides, danificando a membrana plasmática e tornando-os imóveis. Porém, algumas estruturas, como acrossomo e mitocôndrias foram preservadas em todos os tratamentos. O núcleo foi melhor preservado nos meios com trehalose e EGTA. Estes tratamentos com a menor porcentagem de fragmentação nuclear também apresentaram as melhores taxas de cabeças descondensadas, formação de pró-núcleos e desenvolvimento embrionário, confirmando a avaliação de TUNEL. Estes resultados indicaram que o espermatozóide liofilizado participa do processo de fecundação quando utilizado pela ICSI. Entretanto, estudos adicionais são necessários, sendo que a melhoria desta tecnologia dependente dos meios protetores e de avanços na técnica de ICSI nos bovinos.

Palavras chave: bovinos, EGTA, ICSI, liofilização espermática, trehalose, TUNEL.

SUMMARY

Lyophilization is a procedure developed for cell preservation, as a result of restriction of active water from biological systems by ice sublimation. Recently, freeze-drying process has been used to preserve mammalian spermatozoa, becoming an alternative tool for genetic material preservation. In the present thesis the effect of lyophilization with different protecting medium on the bovine sperm cells structure and function was evaluated. The following medium were tested: (T 1) - TCM Hank's with 10% FCS; (T 2) - TCM Hank's with 10% de SFB and trehalose 0,2 M; (T 3) –EGTA solution, composed of 50mM/L de EGTA [ethylene glycol-bis(β -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid] and 10mM/L of Tris-HCl. Effects of sperm lyophilization were evaluated using optical microscopy analysis to assess motility, maintenance of the tail, and acrosome integrity by trypan-bleu/giensa stain; electron microscopy analysis was used to evaluated ultrastructure of important components such as plasma membrane, acrosome and microtubules; fluorescence microscopy was used to analyzed nuclear integrity by Acridine Orange Test (AOT) and terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUDP nick-end labeling (TUNEL); and finally, intracytoplasmic sperm injection (ICSI) to verify the fecundity and embryo development potential of lyophilized spermatozoa. The results of the first experiment indicated that nuclear viability preservation depends on the protector media utilized. In addition, it showed that TUNEL technique is more sensitive than AOT to detect nuclear damage, being the most indicated for nucleus evaluation. In the second experiment, data demonstrated that lyophilization is an aggressive procedure for the sperm cells, causing damage in the plasma membrane and lost of motility. However, other cell components such as acrosome and mitochondria were similarly preserved in all treatments. Nuclei were better conserved in medium containing EGTA and trehalose. Those treatments, which had lower of fragmented DNA, also presented higher rates of decondensed sperm head, pronucleus formation and embryo development, confirming TUNEL evaluation. Theses results suggested that freeze-drying spermatozoa participate in the process of fertilization when used for ICSI. However, additional studies are needed, being the improvements in this technology reliant on the adequate protector media and in the higher efficiency of ICSI technique.

Key words: bovine, EGTA, ICSI, sperm lyophilization, trehalose, TUNEL.

1. INTRODUÇÃO GERAL

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

Vários grupos de pesquisa vêm buscando alternativas mais econômicas e simples que permitam a preservação do genoma animal na sua integridade e que facilitem o armazenamento em temperatura ambiente. Inserindo-se nestes propósitos, o processo de liofilização espermática (desidratação a vácuo em baixas temperaturas) tem sido o principal objeto de estudo para a conservação do germoplasma 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) para 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 nesta área, há muito que se avançar, especialmente na espécie bovina. Atualmente, existem estudos com várias espécies, no entanto, somente há descendentes nascidos de espermatozoides liofilizados em camundongos e coelhos.

No Brasil, não existe nenhum estudo sobre o método de conservação de gametas por liofilização. Desta forma, a presente tese objetivou estudar de forma inédita a conservação por liofilização de espermatozóides bovinos da raça Nelore. Especificamente buscou-se avaliar o grau de proteção de diferentes meios durante o processo de liofilização espermática, tentando verificar a melhor maneira de se conservar espermatozóides bovinos por liofilização. Para alcançar este objetivo foram utilizadas diferentes ferramentas de avaliações, analisando-se desde o comprometimento da estrutura espermática, até a integridade nuclear e sua funcionalidade no momento da fecundação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Estrutura Espermática

A principal característica da cabeça do espermatozóide é o núcleo achatado de forma oval, contendo a cromatina altamente compactada. A cromatina condensada compreende um complexo 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 envolve intimamente o núcleo durante os últimos estágios de formação do espermatozóide (Figura 1). Esta estrutura contém enzimas hidrolíticas incluindo pró-acrosina, hialuronidase, esterases, e hidrolases ácidas, envolvidas no processo de fecundação (Mann e Lutwak-Mann, 1981). Durante a reação do acrossomo, a membrana externa acrossomal funde-se com o plasmalema, sob o controle intra e extra-celular do cálcio, determinando a exocitose de todo conteúdo do acrossomo (Harrison e Roldan, 1990). 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, 1995).

A cauda do gameta masculino é composta de colo, peça intermediária, principal e terminal (Figura 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 para central, onde a proteína dineína é responsável pela transformação da energia química em mecânica. Todo este conjunto é recoberto externamente por numerosas mitocôndrias dispostas em forma de hélice, que geram a energia necessária para a motilidade espermática.

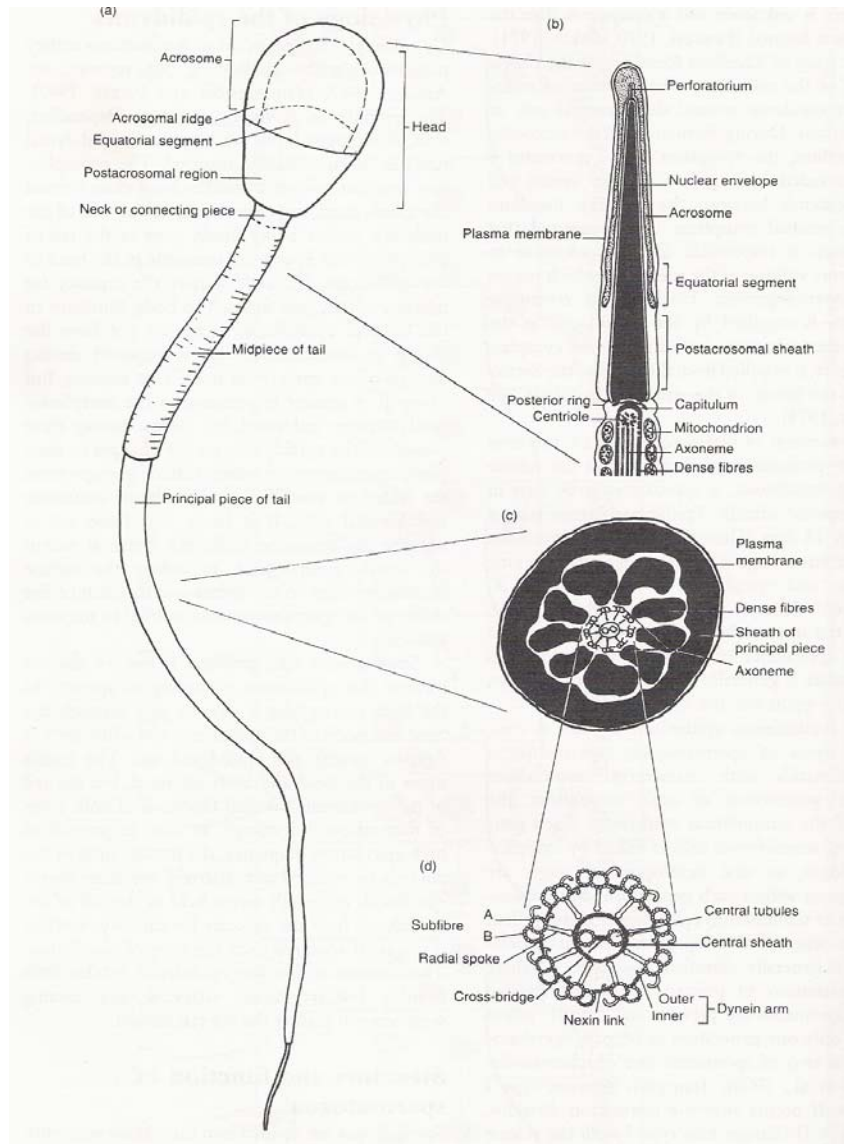


Figura 1: Diagrama da ultraestrutura do espermatozóide bovino. (a) principais estruturas identificadas por microscopia de campo claro. (b) características das ultraestruturas da cabeça e peça conectora. c) ultraestruturas da peça principal da cauda. d) detalhes gerais das ultraestruturas do axonema da cauda. (retirado de Bedford e Hoskins (1990)).

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

2.2. Criopreservação

O espermatozóide é uma célula altamente polarizada e especializada com uma estrutura tripartida em cabeça, peça intermediária e cauda. Este gameta perde a habilidade de biossíntese, reparo, crescimento e divisão celular durante a fase final da espermatogênese. Desta forma, a conservação de espermatozoides 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 uma 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, através 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 a sua congelação. Se esta 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 Jr., 1986).

Vários aspectos da criopreservação espermática têm sido estudados, tais como a composição química dos diluentes e seus efeitos sobre a membrana plasmática, limites de tolerância osmótica, condutividade hídrica, e a permeabilidade dos crioprotetores (Gilmore et al., 1999). Estes estudos sugerem que os espermatozoides de cada espécie têm diferentes propriedades criobiológicas, bem como apresentam variação quanto à sensibilidade a manipulação (ex, pipetagem, centrifugação), tolerância osmótica, e sensibilidade ao resfriamento (Katkov e 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 congela, no momento em que a célula se aproxima do ponto de congelação, removendo o líquido extracelular, fato que acarreta um aumento de osmolaridade. Com esse desequilíbrio osmótica, 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 ocasionando a 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 com as tecnologias reprodutiva humana e bovina. A maioria dos protocolos utiliza uma curva lenta de resfriamento inicial (ex., 1–5 °C/min), que começam a partir da temperatura corporal ou temperatura ambiente, até atingir a temperatura de solidificação. Em seguida, após a formação inicial de gelo, faz-se necessário a adoção de uma taxa de resfriamento mais rápida (ex., 100–200 °C/min), na presença de glicerol tamponado com gema de ovo e citrato de sódio. Com esse procedimento, a taxa de sucesso tem sido satisfatória nestas 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 a 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, tais como suína, um método apropriado ainda está por ser determinado, enquanto que em outras espécies, como murina, um método que parece ser apropriado para uma linhagem falha em outra (Critser e Mobraaten, 2000). Estas informações indicam que um exame das propriedades criobiológicas dos espermatozoides, bem como um exame da exata natureza da crio-injúria espécie-específica, deve ser realizada para se determinar um apropriado protocolo de criopreservação (Holt, 2000).

2.3. 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., 1998a).

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 20-30% de glicerol e submetido a congelamento à 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 touros para obtenção de células viáveis falharam (Bialy e 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. Esta teoria foi comprovada por estes 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 após seis meses de estocagem. Neste mesmo trabalho, espermatozóides de camundongo foram depositados em meio sem crioprotetor e mergulhados no nitrogênio líquido. Apesar de todas as células terem sido consideradas mortas, utilizando-se o corante de exclusão de vivos e mortos, houve desenvolvimento normal após injeção de suas cabeças, ficando comprovado que a viabilidade celular e nuclear não são sinônimos.

Wakayama et al. (1998b) 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. Neste 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. (1998a), 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 o espermatozóide de camundongo pode ser conservado 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, 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(β -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), Desta forma, a tolerância do núcleo espermático a liofilização tem sido atribuída à condição de ligação das pontes de dissulfeto com as protaminas, que são bem estáveis nos espermatozóides maduros. Este fato tem sido comprovado através da liofilização de espermatozóides testiculares (imaturos), com menos pontes de dissulfeto, uma vez que apresentaram apenas 3 % de espermatozóides com cariótipo normal (Kaneko et al., 2003a).

O valor do pH da solução de liofilização parece também influenciar a integridade cromossômica. Assim sendo, Kaneko et al. (2003b), estudando este 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 8-8.2).

Keskintepe et al. (2002), liofilizaram espermatozóides bovinos em meio rico em aminoácidos e os microinjetaram dentro de ovócitos bovinos maturados *in*

vitro, e com subsequente ativação com 10µM de ionomicina e posterior incubação com 1.9 mM de 6-dimethylaminopurine (6DMAP). Com estes procedimentos este grupo observou a formação de embriões com 4-8 células (43%), mórulas (19,7%) e blastocistos (11,4%). Estes 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, o percentual de ativação foi inferior, quando comparado com o percentual para espermatozóides não liofilizados, e poucos conseguiram atingir a fase de blastocisto. Este achado permitiu concluir que durante o processo de liofilização ocorreu à destruição ou inativação de fatores ativadores do ovócito, localizados na cabeça espermática, dificultando a ativação e o desenvolvimento embrionário.

Também em 2004, Liu e colaboradores reportaram o nascimento de coelhos por ICSI de espermatozóides liofilizados. Este 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 MII, quando microinjetados

com estes gametas. Esta oscilação de cálcio é de fundamental importância para o desenvolvimento normal de ovócitos fecundados (Liu et al., 2005).

2.4. 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). Desta forma, torna-se importante à 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).

Um dos primeiros componentes descritos como protetores nucleares durante a liofilização espermática foi o soro fetal bovino (SFB) e a albumina sérica bovina (BSA). A presença destes componentes do meio de liofilização pode fornecer alguma proteção do 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 tais condições, acumulam compostos que previnem alterações deletérias nas membranas durante os estados de água reduzida. Um destes

compostos, a trehalose, é um dissacarídeo da glucose, comumente encontrado em altas concentrações em muitos organismos que sofrem completa desidratação. Nestes organismos se incluem as leveduras e fungos esporulados (Aisen et al., 2000). O mecanismo pelo qual a trehalose protege as células submetidas a desidratação ou congelamento parece envolver efeitos estabilizantes tanto de proteínas e membranas; no entanto, a natureza deste efeito permanece desconhecido (Aboagla e Terada, 2003).

Atualmente, uma solução não fisiológica quelante de cálcio EGTA (ethylene glycol bis (β -aminoethyl ether)-N,N,N'-tetraacetic acid) proporciona suficiente proteção ao DNA, adequada para gerar desenvolvimento embrionário a partir de espermatozoides desidratados e ressuspensos (Kusakabe et al., 2001). A liberação de nucleases endógenas dos espermatozoides 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 espermatozoides de camundongo. A presença de um agente quelante do cálcio em um meio livre de cálcio e magnésio e rico em potássio provavelmente contribuem para melhorar a estabilidade cromossômica nos espermatozoides liofilizados (Kusakabe et al., 2001).

Além disso, Kaneko et al. (2003b), estudando a liofilização de espermatozoides de camundongo com EGTA, acreditaram que um alto pH pode prevenir ou diminuir a ação de substâncias como a endonucleases. O pH ótimo para a DNase I, por exemplo, é 7.0 e é estável em um pH entre 5.0-6.0 (Kunitz, 1950). Como cátions divalentes são essenciais para a atividade da DNase, agentes quelantes de cálcio como EDTA e EGTA suprimiriam sua atividade. A

combinação de EGTA e um pH alcalino pode suprimir de forma sinérgica a atividade da DNase quando espermatozóides são liofilizados e suas membranas são rompidas (Kaneko et al, 2003b).

2.5. Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóide

A injeção intracitoplasmática de espermatozóides (intracytoplasmic sperm injection, ICSI), uma inserção mecânica de um único espermatozóide no citoplasma do ovócito, tem expandido as possibilidades das tecnologias de reprodução assistida em animais e humanos (Galli et al., 2003). A ICSI tem fornecido uma importante oportunidade para a investigação de aspectos fundamentais da fecundação, tais como: mecanismos da interação entre gametas, ativação do ovócito induzido pelo espermatozóide e controle do primeiro ciclo celular (Galli et al., 2003; Ock et al., 2003).

No entanto, a injeção direta de espermatozóide dentro do citoplasma de um ovócito não é uma inovação. Os primeiros experimentos com microinjeção espermática foram realizados por Hiramoto (1962), que injetou espermatozóide de ouriço do mar dentro de um ovócito da mesma espécie. Neste trabalho inicial o núcleo espermático não descondensou no citoplasma do ovócito. No entanto, quando o ovócito foi inseminado juntamente com a injeção espermática, o núcleo espermático injetado participou do processo meiótico. Este fato sugeriu que a ICSI por si só não promovia a ativação do citoplasma do ovócito e conseqüente descondensação do núcleo espermático, sendo necessário para isto um estímulo acessório.

O primeiro experimento com mamíferos foi conduzido por Uehara e Yanagimachi (1976). Estes pesquisadores aplicaram a técnica de ICSI para determinar se o espermatozóide ou núcleo espermático de hamster injetado dentro de ovócito de hamster pode se desenvolver em pró-núcleo masculino. Esses autores também examinaram se os espermatozoides de várias espécies formariam pró-núcleo quando injetados dentro de ovócitos de hamster. Neste estudo foi observado que o núcleo espermático humano foi capaz de se desenvolver em pró-núcleo quando microinjetados em ovócitos de hamster. Estes dados sugerem que, os fatores citoplasmáticos que controlam a transformação do núcleo espermático em pró-núcleo não são espécies específicas (Thadani, 1980).

Os primeiros estudos em bovinos foram realizados por Westhusin et al. (1984), os quais reportaram a formação de pró-núcleos masculino e feminino após injeção de espermatozóide bovino em ovócitos bovinos maturados *in vitro*.

O primeiro produto oriundo de ICSI em mamíferos foi registrado por Hosoi et al. (1988), em coelhos. Posteriormente, Goto et al. (1990) demonstraram que ovócitos bovinos, maturados *in vitro*, se desenvolveram em blastocistos após terem sido fecundados por injeção de espermatozoides considerados “mortos” por estarem imóveis, gerando bezerros normais.

Em humanos, a primeira gestação através de ICSI foi obtida em 1992, representando a maior inovação no campo da fecundação assistida na espécie humana (Palermo et al., 1992).

A ICSI tem apresentado algumas peculiaridades de acordo com as espécies. Em várias espécies tais como camundongos (Kimura e Yanagimachi, 1995), coelhos (Keefer, 1989), humanos (Van Steirteghem et al., 1993) e cavalos

(Galli et al., 2002), a introdução da agulha no ovócito e a deposição do espermatozóide no citoplasma já são suficientes para induzir a descondensação da cabeça espermática, formação do pró-núcleo masculino e início do subsequente desenvolvimento embrionário. Em camundongos, 70% dos ovócitos injetados desenvolvem-se em blastocistos (Kimura e Yanagimachi, 1995), enquanto nos bovinos a taxa de blastocistos não é maior que 12-20% (Keskintepe e Brackett, 2000). Esta baixa taxa de formação de blastocistos contrasta com a alta taxa de ativação dos ovócitos bovinos após a ICSI (Galli et al., 1999).

Embora esta técnica tenha sido usada para produzir descendentes bovinos (Goto et al., 1990; Wei e Fukui, 2002; Horiuchi et al., 2002), a eficiência desta técnica em bovinos está distante dos resultados satisfatórios. As principais causas de falha na ICSI bovina estão relacionadas com as fases de descondensação espermática e ativação do ovócito (Chen e Seidel, 1997). O núcleo espermático raramente descondensa no citoplasma do ovócito, a menos que ele tenha sido tratado com detergentes, sonicação, e ou tenha as membranas danificadas pelo congelamento e descongelamento antes da injeção (Ock, et al., 2003).

Atualmente, a utilização do piezo-drive, um dispositivo que promove a penetração da pipeta de injeção para dentro do ovócito por movimentos piezo-elétricos, tem tornado a ICSI mais eficiente em comparação com a introdução manual. A aplicação do piezo-ICSI tem resultado em maiores taxas de ativação, fecundação e desenvolvimento embrionário em camundongos (Kimura e Yanagimachi, 1995), bovinos (Katayose et al., 1999), cavalos (Lazzari et al., 2002) e humanos (Huang et al., 1996), e maiores taxas de gestações e nascimentos em humanos (Yanagida et al., 1999) e cavalos (Galli et al., 2002).

Para aperfeiçoar o procedimento de ICSI em bovinos, vários aspectos necessitam ser mais bem esclarecidos, tais como: o método de injeção, preparação do ovócito, pré-tratamento do espermatozóide, ativação do ovócito e cultivo embrionário (Susko-Parrish et al., 1994; Perry et al., 1999; Suttner et al., 2000).

2.6. Ativação Ovocitária Artificial

Em muitas espécies a ativação do ovócito com conseqüente retomada da meiose, é induzida pelo espermatozóide no momento da fecundação, através do fornecimento de uma sinalização que pode ser resultante da interação das moléculas da superfície das células e ou moléculas depositadas no citoplasma do ovócito pelo espermatozóide. Alguns dos efeitos da interação espermatozóide-ovócito incluem: (1) cálcio transitório dentro da célula; (2) aumento do pH intracelular; (3) uma diminuição da atividade do MPF, MAPK, e CSF (fator citosólico); (4) um influxo de cálcio extracelular dentro do citoplasma do ovócito; (5) liberação dos grânulos corticais; e (6) mobilização dos mRNAs maternos. O zigoto resultante é então capaz de iniciar o completo de desenvolvimento (Machaty e Prather, 1998).

Inicialmente, acreditava-se que a ativação dos ovócitos em mamíferos poderia ser promovida somente pelo aumento de cálcio intracelular durante a fecundação (Kaufman, 1993). No entanto, há outras duas hipóteses de como o espermatozóide induz a cascata de eventos conduzindo a ativação do ovócito. A primeira é que o espermatozóide se adere a um receptor de membrana

extracelular, que, atuando através da proteína G, estimula a onda de fosfoinositol que causa a ativação do ovócito (Kline et al., 1988). A outra hipótese é que um fator do espermatozóide é liberado no citoplasma do ovócito. Este fator deve interagir com o citoplasma do ovócito ou com a membrana interna, possibilitando a estimulação do sistema fosfoinositol para causar a ativação (Longo et al., 1986). Em estudos recentes, Perry et al. (1999) indicaram que o espermatozóide contém no mínimo duas funções distintas capazes de iniciar a ativação do ovócito: uma é a atividade citosólica e a outra, atividade do complexo das sub-membranas da cabeça que inclui o fator espermático ativador do ovócito (SOAF). O SOAF é de natureza protéica, insolúvel, presente nas sub-membranas da cabeça espermática, e que se torna solúvel em resposta ao ooplasma quando introduzido no ovócito. Assim, ficou provado que a função ativadora também reside na cabeça e não somente na cauda do espermatozóide.

Em relação a ICSI, embora a estimulação mecânica pela pipeta de injeção possa ocasionalmente promover ativação, uma ativação adicional ainda é necessária. Com o objetivo de otimizar os resultados dessa técnica, a ativação de ovócitos de mamíferos tem sido tentada utilizando-se diferentes estímulos químicos, físicos e enzimáticos (Qian et al., 1996; Chen e Seidel, 1997). Estímulos através do etanol (Minamihashi et al., 1993), cálcio ionóforo (Ware et al., 1989), e elétricos (Campbell et al., 1993), podem ativar alguns ovócitos, entretanto, o percentual de ativação foi baixo e freqüentemente variou com a idade do ovócito (Yang et al., 1993).

Vários pesquisadores sustentam a hipótese que o espermatozóide ativa o desenvolvimento do ovócito através da elevação de cálcio intracitoplasmático.

(Swann, 1996). Geralmente o aumento artificial de cálcio induz ativação ovocitária (Swann e Ozil, 1994) e estes métodos são denominados de cálcio dependentes (Machaty e Prather, 1998).

Um significativo influxo de cálcio transmembrana pode ser criado por um estímulo elétrico. Desta forma, um pulso elétrico induz um simples pico transitório de cálcio em camundongo, coelhos, bovinos e suínos. A fonte de cálcio nestes casos parece ser extracelular, e a amplitude do trânsito de cálcio é dependente dos parâmetros dos pulsos elétricos e do cálcio contido no meio (Machaty e Prather, 1998).

Uma outra forma para aumentar o cálcio e ativar os ovócitos é o uso dos ionóforos. Os ionóforos (Ca, Mg, e H) A23187 estimulam a liberação dos grânulos corticais, extrusão do segundo corpúsculo polar, e formação pró-nuclear em vários ovócitos de invertebrados e vertebrados e foi sugerido ser um ativador universal para os ovócitos (Kline e Kline, 1992; Funahashi et al., 1994).

Ionomicina, um outro potente ionóforo de cálcio foi descrito como melhorador do influxo de cálcio, mas em vez de facilitar o transporte diretamente pela membrana plasmática, ele mobiliza cálcio intracelular que acaba ativando a entrada de cálcio (Morgan e Jacob, 1994).

O etanol também foi descrito como potente ativador de ovócitos de camundongo (Winston e Maro, 1995), bovino (Presicce e Yang, 1995) e suíno (Didion et al., 1990). A incubação de ovócitos em metáfase II em meio contendo 7-8% de etanol por 5-7 minutos tem sido suficiente para induzir formação pró-nuclear e em alguns casos, desenvolvimento de blastocistos. Etanol ativa os ovócitos promovendo uma rápida potenciliação do mediador InsP3, liberando

cálcio por estimulação da formação do InsP3 na membrana plasmática (Ilyin e Parker, 1992).

A ativação artificial do ovócito também pode ocorrer por mecanismos de cálcio independentes. A estratégia aqui é atacar uma porção da rota de sinalização de cálcio, durante a sinalização inicial do cálcio. Neste caso este ataque tenta evitar a produção de ciclina B. A ciclina B1 é um componente do MPF e deve ser continuamente sintetizada para manter adequados níveis de MPF. Uma simples inibição da síntese protéica tanto por puromicina ou ciclohexamida pode induzir os ovócitos entrarem na primeira interfase, na maioria dos animais, exceto em anfíbios, ratos e suínos. Ativação e subsequente desenvolvimento embrionário tem tido mais sucesso quando a puromicina ou ciclohexamida são associados a um aumento passageiro de cálcio (Tanaka e Kanagawa, 1997).

Um outro agente, 6-dimethylaminopurine (6-DMAP), inibidor da proteína quinase gera com isso um bloqueio na fosforilação protéica e desta forma inibe a atividade do MPF e CSF (fator citosólico) (Machaty e Prather, 1998). Ao mesmo tempo também inibe a expulsão do segundo corpúsculo polar devido a inibição da fosforilação necessária para formar o aparato do fuso.

O procedimento que melhor mimetiza a fecundação e tem sido descrito como efetivo, inclui o uso de um fator espermático (Stice e Robl, 1990), combinado com um inibidor de síntese protéica (fosforilação protéica ou histona kinase), capaz de prevenir um novo acúmulo do MPF (Rho et al., 1998).

Cálcio ionóforo combinado com 6-dimethylaminopurine (DMAP; inibidor de histona kinase) tem sido efetivo em induzir a ativação. O intervalo de tempo entre

a incubação com cálcio ionóforo e o 6 DMAP desempenha uma função crucial na expulsão do segundo corpúsculo polar (Chung et al., 2000). Uma vez que ovócitos em metáfase II são ativados pela ionomicina, o segundo corpúsculo polar deve ser liberado no espaço perivitelino entre 3 a 6 horas. A utilização de um inibidor de síntese protéica imediatamente após o tratamento com ionomicina, a expulsão do segundo corpúsculo polar é inibida e resulta em um embrião triplóide.

O 6-DMAP tem inibido a fosforilação, mas não a síntese protéica (Neant e Guerrier, 1988). Um estudo da ativação dos ovócitos bovinos indicou que a função do 6-DMAP pode inibir indiretamente a atividade do MPF e permitir que ovócito escape da meiose e inicie a mitose devido a presença de proteínas não fosforiladas que inutilizam o MPF (Susko-Parrish et al., 1994).

2.7. Cultivo Embrionário

Muitos esforços têm sido investidos no sentido de melhorar o sistema de cultivo de embriões bovinos. Extensos estudos do ambiente tubárico *in vivo*, evidenciaram que o crescimento embrionário é regulado por uma delicada combinação de fatores autócrinos, parácrinos (incluindo proteínas específicas do oviduto) e ambientais que regulam o crescimento embrionário. A maioria destes fatores é produzida pelos embriões ou células do oviduto e parcialmente reguladas pela sua interação (Bavister, 1995). Como um sistema análogo, a co-cultura com células do oviduto foi encontrada como um eficiente suporte no desenvolvimento embrionário *in vitro*. Entretanto, o mesmo efeito benéfico foi detectado quando células de diferentes fontes foram utilizadas para co-cultura, incluindo aquelas provenientes do trato genital da fêmea (células do *cumulus-ovócito*, fibroblasto

uterino), outros órgãos (rim e fígado) e até de outras espécies (Gordon, 1994). Acredita-se, que o efeito benéfico da presença de células somáticas e das proteínas presentes no soro sanguíneo, seria a retirada de substâncias embriotóxicas do meio de cultivo tais como radicais livres, metais pesados e outros, bem como a produção de fatores embriotrópicos que auxiliariam no desenvolvimento embrionário (Geshi et al., 1999; Holm et al., 1999). No entanto, uma desvantagem da utilização do sistema de co-cultivo, é a falta de controle dos fatores que são produzidos pelas células, podendo tornar o meio indefinido (Holm et al., 1999).

Segundo Vajta et al. (1997), do ponto de vista prático, o modo mais simples de estabelecer co-culturas é através da manutenção dos embriões em placas de cultivo juntamente com as células do *cúmulus* que, nestas condições, são capazes de se multiplicarem e aderirem no fundo da placa, adquirindo a capacidade de liberar componentes parácrinos importantes para o desenvolvimento embrionário até o fim do período de cultivo.

Estas observações sugerem um efeito não específico adicional das células somáticas, que é atribuído principalmente a redução do nível de radicais de oxigênio livre, e que podem ser também conseguidos sem co-cultura pelo decréscimo do nível do oxigênio atmosférico (Trounson et al., 1994).

A utilização de um meio simplificado como o CZB (Chatot, Ziomek e Bavister), (Chatot et al. 1989), ou meio SOF, fluído sintético de oviduto (Tervit et al., 1972) para a cultura de embrião foi provavelmente o maior avanço na tecnologia de produção de embriões bovinos. Segundo Keskinetepe e Brackett (1996) e Holm et al. (1999) o meio SOF suplementado com soro fetal bovino tem

tido melhor eficiência para a cultura de embriões bovinos. De outra forma, a suplementação protéica pela albumina ou soro envolve componentes desconhecidos e podem causar anormalidades sub-celulares (Thompson, 1997). No entanto, a suplementação protéica é freqüentemente usada e considerada como promotor embrionário que estabiliza a produção de embriões, evitando variações do número de estruturas produzidas por manipulação (Trounson et al., 1994). O soro fetal bovino tem um efeito bifásico no desenvolvimento do embrião bovino. Enquanto inibe as primeiras divisões de clivagem na fase inicial, estimula o desenvolvimento de peri-compactação, transformação de mórula em blastocisto, desenvolvimento do blastocisto e eclosão da zona pelúcida (Thompson, 1997).

Para Holm et al. (1999) a suplementação do meio SOF com 5 % de soro fetal resulta em eficiente sistema de cultura de embriões. O meio SOF com ou sem soro, quando comparado com TCM 199 com soro e co-cultura de células da granulosa resultou em um aumento na taxa de blastocistos. Também de acordo com Dode et al. (2002), o meio SOFaaci também pode ser utilizado em alta tensão de oxigênio com co-cultura de células da granulosa, apresentando resultados superiores ao TCM-199.

Durante o cultivo embrionário há liberação de radicais livres, devido à alta tensão de O_2 nos sistemas de cultivo, dificultando o desenvolvimento dos embriões. Com altas concentrações de oxigênio há a produção de um tipo de oxigênio reativo, como o peróxido de hidrogênio, que induz danos ao DNA da célula (Takahashi et al., 2002). Desta forma, é indicado que o meio de cultura deva ter alguma suplementação, como a vitamina E. Este componente combate os

radicais livres e conseqüentemente há um aumento sensível na produção de blastocistos após sete dias (Olson e Seidel, 2000).

Existem outros fatores que interferem no cultivo embrionário e devem ser monitorados para uma melhor eficiência do sistema in vitro. Entre estes fatores é possível citar a temperatura e luminosidade, a presença ou não de soro fetal e a relação entre o número de embriões e o volume do meio de cultivo.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aisen EG, Alvarez HL, Venturino A, Garde JJ. Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. *Theriogenology* 2000; 53: 1053-1061.
- Aboagla EM, Terada T. Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. *Biol Reprod* 2003; 69: 1245-1250.
- Bavister BD. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Hum Reprod Update* 1995; 1: 91-148.
- Bedford, JM and Hoskins, D.D. In: Marshall's Physiology of Reproduction, ed. G.E. Lamming. 1990, 2: 379-568.
- Bhowmick S, Zhu L, McGinnis L, Lawitts J, Nath BD, Toner M, Biggers J. Desiccation tolerance of spermatozoa dried at ambient temperature: production of fetal mice. *Biol Reprod* 2003; 68: 1779-1786.
- Bialy G, Smith VR. Freezing and freeze-drying of human spermatozoa. *J. Dairy Sci* 1957; 40: 357-371.
- Campbell KH, Ritchie WA, Wilmut I. Nuclear-cytoplasmic interactions during the first cell cycle of nuclear transfer reconstructed bovine embryos: implications for deoxyribonucleic acid replication and development. *Biol Reprod* 1993; 49: 933-942.
- Chatot CL, Ziomek CA, Bavister BD, Lewis JL, Torres I. An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos in vitro. *J Reprod Fertil* 1989; 86: 679-688.
- Chen SH, Seidel J. Effects of oocyte activation and treatment of spermatozoa on

- embryonic development following intracytoplasmic sperm injection in cattle. *Theriogenology* 1997; 1265-1273.
- Chung JT, Keefer CL, Downey BR. Activation of bovine oocytes following intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Theriogenology* 2000; 53: 1273-1284.
- Critser JK, Mobraaten LE. Cryopreservation of murine spermatozoa. *Ilar J* 2000; 41: 197-206.
- Didion BA, Pomp D, Martin MJ, Homanics GE, Markert CL. Observations on the cooling and cryopreservation of pig oocytes at the germinal vesicle stage. *J Anim Sci* 1990; 68: 2803-2810.
- Dode MAN, Mattos L, RUumpf R. In vitro production of bovine embryos in SOFaa medium under high oxygen tension. *Theriogenology* 2002; 57: 661.
- Funahashi H, Cantley TC, Stumpf TT, Terlouw SL, Day BN. Use of low-salt culture medium for in vitro maturation of porcine oocytes is associated with elevated oocyte glutathione levels and enhanced male pronuclear formation after in vitro fertilization. *Biol Reprod* 1994; 51: 633-639.
- Galli C, Vassiliev I, Lagutina I, Galli A, Lazzari G. Bovine embryo development following ICSI: effect of activation, sperm capacitation and pre-treatment with dithiothreitol. *Theriogenology* 2003; 60: 1467-1480.
- Galli C, Crotti G, Turini P, Duchi R, Mari G, Zavaglia G. Frozen-thawed embryos produced by ovum pick up of immature oocytes and ICSI are capable to establish pregnancies in the horse. *Theriogenology* 2002; 58: 713-715.
- Galli C, Crotti G, Notari C, Lazzari G. High rate of activation and fertilisation

- following intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in cattle. *Theriogenology* 1999; 51: 355.
- Geshi M, Yonai M, Sakaguchi M, Nagai T. Improvement of in vitro co-culture systems for bovine embryos using a low concentration of carbon dioxide and medium supplemented with beta-mercaptoethanol. *Theriogenology* 1999; 51: 551-558.
- Gilmore JA, Liu J, Woods EJ, Peter AT, Critser JK. Cryoprotective agent and temperature effects on human sperm membrane permeabilities: convergence of theoretical and empirical approaches for optimal cryopreservation methods. *Hum Reprod* 2000; 15: 335-343.
- Goto K, Kinoshita A, Takuma Y, Ogawa K. Fertilisation of bovine oocytes by the injection of immobilised, killed spermatozoa. *Vet Rec* 1990; 127: 517-520.
- Gordon I. *Laboratory Production of Cattle Embryos. Biotechnology in Agriculture.* CAB International, Wallingford, UK 1994; 11.
- Hafez, ESE. Espermatozóide e plasma seminal. In: *Reprodução Animal.* Ed. Manole, São Paulo, 1995: 167-190.
- Harrison, RAP, and Roldan, ER. *Reprod. Fertil.* 1990; 2: 51.
- Hiramoto Y. Microinjection of the live spermatozoa into sea urchin eggs. *Exp Cell Res* 1962; 27: 416-426.
- Holm P, Booth PJ, Schmidt MH, Greve T, Callesen H. High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. *Theriogenology* 1999; 52: 683-700.

- Holt WV. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology* 2000; 53: 47-58.
- Horiuchi T, Emuta C, Yanagimachi Y, Oikawa T, Numabe T, Yanagimachi R. Birth of normal calves after intracytoplasmic sperm injection of bovine oocytes: a methodological approach. *Theriogenology* 2002; 57: 1013-1024.
- Hosoi Y, Miyake M, Utsumi K, Iritani A. Development of rabbit oocytes after microinjection of spermatozoon. *Proc. 11th Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem.* 1988; 3: 331-333.
- Huang T, Kimura Y, Yanagimachi R. The use of piezo micromanipulation for intracytoplasmic sperm injection of human oocytes. *J Assist Reprod Genet* 1996; 13: 320-328.
- Ilyin V, Parker I. Effects of alcohols on responses evoked by inositol trisphosphate in *Xenopus* oocytes. *J Physiol* 1992; 448: 339-354.
- Kaneko T, Whittingham DG, Overstreet JW, Yanagimachi R. Tolerance of the mouse sperm nuclei to freeze-drying depends on their disulfide status. *Biol Reprod* 2003 a; 69: 1859-1862.
- Kaneko T, Whittingham DG, Yanagimachi R. Effect of pH value of freeze-drying solution on the chromosome integrity and developmental ability of mouse spermatozoa. *Biol Reprod* 2003 b; 68: 136-139.
- Katayose H, Yanagida K, Shinoki T, Kawahara T, Horiuchi T, Sato A. Efficient injection of bull spermatozoa into oocytes using a Piezo-driven pipette. *Theriogenology* 1999; 52: 1215-1224.
- Katayose H, Matsuda J, Yanagimachi R. The viability of dehydrated hamster and

- human sperm nuclei to develop into pronuclei. *Biology Reproduction* 1992; 47: 277-284.
- Katkov, II, 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 Biochem Biophys* 1999; 31: 231-245.
- Kaufman ML, Homa ST. Defining a role for calcium in the resumption and progression of meiosis in the pig oocyte. *J Exp Zool* 1993; 265: 69-76.
- Keefer CL. Fertilization by sperm injection in the rabbit. *Gamete Res* 1989; 22: 59-69.
- Keskintepe L, Brackett BG. Cryopreservation of bovine blastocysts obtained by intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology* 2000; 53: 1041-1052.
- Keskintepe L, Brackett BG. In vitro developmental competence of in vitro-matured bovine oocytes fertilized and cultured in completely defined media. *Biol Reprod* 1996; 55: 333-339.
- Keskintepe L, Pacholczyk G, Machnicka A, Norris K, Curuk MA, Khan I, Brackett BG. Bovine blastocyst development from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. *Biol Reprod* 2002; 67: 409-415.
- Kimura Y, Yanagimachi R. Development of normal mice from oocytes injected with secondary spermatocyte nuclei. *Biol Reprod* 1995; 53: 855-862.
- Kline D. Calcium-dependent events at fertilization of the frog egg: injection of a calcium buffer blocks ion channel opening, exocytosis, and formation of pronuclei. *Dev Biol* 1988; 126: 346-361.

- Kline D, Kline JT. Repetitive calcium transients and the role of calcium in exocytosis and cell cycle activation in the mouse egg. *Dev Biol* 1992; 149: 80-89.
- Kunitz M. Crystalline desoxyribonuclease; digestion of thymus nucleic acid; the kinetics of the reaction. *J Gen Physiol* 1950; 33: 363-377.
- Kusakabe H, Szczygiel MA, Whittingham DG, Yanagimachi R. Maintenance of genetic integrity in frozen and freeze-dried mouse spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 13501-13506.
- Kwon IK, Park KE, Niwa K. Activation, pronuclear formation, and development in vitro of pig oocytes following intracytoplasmic injection of freeze-dried spermatozoa. *Biol Reprod* 2004; 71: 1430-1436. 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* 1994; 41: 780-790.
- Lazzari G, Crotti G, Turini P, Duchi R, Mari G, Zavaglia G. Equine embryos at the compacted morula and blastocyst stage can be obtained by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) of in vitro matured oocytes with frozen-thawed semen of different fertility. *Theriogenology* 2002; 58: 709-712.
- Longo FJ, Lynn JW, McCulloh DH, Chambers EL. Correlative ultrastructural and electrophysiological studies of sperm-egg interactions of the sea urchin, *Lytechinus variegatus*. *Dev Biol* 1986; 118: 155-166.
- Liu JL, Kusakabe H, Chang CC, Suzuki H, Schmidt DW, Julian M, Pfeffer R, Bormann CL, Tian XC, Yanagimachi R, Yang X. Freeze-dried sperm

fertilization leads to full-term development in rabbits. *Biol Reprod* 2004; 70: 1776-1781.

Liu QC, Chen TE, Huang XY, Sun FZ. Mammalian freeze-dried sperm can maintain their calcium oscillation-inducing ability when microinjected into mouse eggs. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 328: 824-830.

Machaty Z, Prather RS. Strategies for activating nuclear transfer oocytes. *Reprod Fertil Dev* 1998; 10: 599-613. 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 Biol* 1997; 16: 1087-1097.

Mann, T and Lutwak-Mann, C. Male reproductive function and semen. New York, Springer-Verlag, 1981.

Minamihashi A, Watson AJ, Watson PH, Church RB, Schurtz GA. Bovine parthenogenetic blastocysts following in vitro maturation and oocyte activation with ethanol. *Theriogenology* 1993; 40: 63-76.

Morgan AJ, Jacob R. Ionomycin enhances Ca²⁺ influx by stimulating store-regulated cation entry and not by a direct action at the plasma membrane. *Biochem J* 1994; 300 (Pt 3): 665-672.

Neant I, Guerrier P. 6-Dimethylaminopurine blocks starfish oocyte maturation by inhibiting a relevant protein kinase activity. *Exp Cell Res* 1988; 176: 68-79.

Ock SA, Bhak JS, Balasubramanian S, Lee HJ, Choe SY, Rho GJ. Different activation treatments for successful development of bovine oocytes following intracytoplasmic sperm injection. *Zygote* 2003; 11: 69-76.

- Olson SE, Seidel GE, Jr. Culture of in vitro-produced bovine embryos with vitamin E improves development in vitro and after transfer to recipients. *Biol Reprod* 2000; 62: 248-252.
- Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992; 340: 17-18.
- Perry AC, Wakayama T, Yanagimachi R. A novel trans-complementation assay suggests full mammalian oocyte activation is coordinately initiated by multiple, submembrane sperm components. *Biol Reprod* 1999; 60: 747-755.
- Phelps MJ, Liu J, Benson JD, Willoughby CE, Gilmore JA, Critser JK. Effects of Percoll separation, cryoprotective agents, and temperature on plasma membrane permeability characteristics of murine spermatozoa and their relevance to cryopreservation. *Biol Reprod* 1999; 61: 1031-1041.
- Polge C, Smith AU, Parkes AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature. *Nature* 1949; 164: 666-667.
- Presicce GA, Yang X. Nuclear dynamics of parthenogenesis of bovine oocytes matured in vitro for 20 and 40 hours and activated with combined ethanol and cycloheximide treatment. *Mol Reprod Dev* 1994; 37: 61-68.
- Qian XQ, Inagaki H, Sasada H, Sugawara S. Early mammalian development: parthenogenetic studies. *J. Mammal. Ova. Res.* 1996; 13: 118-121.
- Rho GJ, Wu B, Kawarsky S, Leibo SP, Betteridge KJ. Activation regimens to prepare bovine oocytes for intracytoplasmic sperm injection. *Mol Reprod Dev* 1998; 50: 485-492.

- Seidel Jr. GEI, 6, 1986, Fort Collins. Proceedings...Fort Collins:USA, 1986.
Principles of cryopreservation of mammalian embryos. In: techniques for freezing mammalian embryos; 1986; Fort Collins, USA.
- Stice SL, Robl JM. Activation of mammalian oocytes by a factor obtained from rabbit sperm. *Mol Reprod Dev* 1990; 25: 272-280.
- Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, Northey DL, Schutzkus V, First NL. Inhibition of protein kinases after an induced calcium transient causes transition of bovine oocytes to embryonic cycles without meiotic completion. *Dev Biol* 1994; 166: 729-739.
- Suttner R, Zakhartchenko V, Stojkovic P, Muller S, Alberio R, Medjugorac I, Brem G, Wolf E, Stojkovic M. Intracytoplasmic sperm injection in bovine: effects of oocyte activation, sperm pretreatment and injection technique. *Theriogenology* 2000; 54: 935-948.
- Swann K. Soluble sperm factors and Ca²⁺ release in eggs at fertilization. *Rev Reprod* 1996; 1: 33-39.
- Swann K, Ozil JP. Dynamics of the calcium signal that triggers mammalian egg activation. *Int Rev Cytol* 1994; 152: 183-222.
- Takahashi M, Keicho K, Takahashi H, Ogawa H, Schultz RM, Okano A. Effect of oxidative stress on development and DNA damage in in vitro cultured bovine embryos by comet assay. *Theriogenology* 2002; 54: 137-145.
- Tanaka H, Kanagawa H. Influence of combined activation treatments on the success of bovine nuclear transfer using young or aged oocytes. *Anim Reprod Sci* 1997; 49: 113-123.

- Tervit HR, Whittingham DG, Rowson LE. Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. *J Reprod Fertil* 1972; 30: 493-497.
- Thadani VM. A study of hetero-specific sperm -egg interactions in the rat, mouse, and deer mouse using in vitro fertilization and sperm injection. *J. Exp. Zool* 1980; 212: 435-453.
- Thompson JG. Comparison between in vivo-derived and in vitro-produced preelongation embryos from domestic ruminants. *Reproduction, Fertil and Develop* 1997; 9: 341-354.
- Trounson A, Wood C, Kausche A. In vitro maturation and the fertilization and developmental competence of oocytes recovered from untreated polycystic ovarian patients. *Fertil Steril* 1994; 62: 353-362.
- Trounson AO, Pushett D, Maclellan LJ, Lewis I, Gardner DK. Current status of IVM/IVF and embryo culture in humans and farm animals\ . *Theriogenology* 1994; 41: 57-66.
- Uehara T, Yanagimachi R. Microsurgical injection of spermatozoa into hamster eggs with subsequent transformation of sperm nuclei into male pronuclei. *Biol Reprod* 1976; 15: 467-470.
- Van Steirteghem AC, Nagy Z, Joris H, Liu J, Staessen C, Smitz J, Wisanto A, Devroey P. High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1993; 8: 1061-1066.
- Vajta G, Holm P, Greve T, Callesen H. Comparison of two manipulation methods to produce in vitro fertilized, biopsed and vitrified bovine embryos. *Theriogenology* 1997; 47: 501-509.

- Wakayama T, Whittingham DG, Yanagimachi R. Production of normal offspring from mouse oocytes injected with spermatozoa cryopreserved with or without cryoprotection. *J Reprod Fertil* 1998; 112: 11-17.
- Wakayama T, Yanagimachi R. Development of normal mice from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. *Nat Biotechnol* 1998; 16: 639-641.
- Ward WS, Kimura Y, Yanagimachi R. An intact sperm nuclear matrix may be necessary for the mouse paternal genome to participate in embryonic development. *Biol Reprod* 1999; 60: 702-706.
- Ware CB, Barnes FL, Maiki-Laurila M, First NL. Age dependence of bovine oocyte activation. *Gamete Res* 1989; 22: 265-275.
- Wei H, Fukui Y. Births of calves derived from intracytoplasmic sperm injection (ICSI) without exogenous oocyte activation treatment. *Theriogenology* 2002; 57: 758.
- Westhusin ME, Anderson JG, Harms PG, Kraemer DC. Microinjection of spermatozoa in bovine eggs. *Theriogenology* 1984; 21: 274.
- Winston NJ, Maro B. Calmodulin-dependent protein kinase II is activated transiently in ethanol-stimulated mouse oocytes. *Dev Biol* 1995; 170: 350-352.
- Woods EJ, Benson JD, Agca Y, Critser JK. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology* 2004; 48: 146-156.
- Yanagida K, Katayose H, Yazawa H, Kimura Y, Konnai K, Sato A. The usefulness of a piezo-micromanipulator in intracytoplasmic sperm injection in humans. *Hum Reprod* 1999; 14: 448-453.

Yang X, Jiang S, Farrell P, Foote RH, McGrath AB. Nuclear transfer in cattle: effect of nuclear donor cells, cytoplasmic age, co-culture, and embryo transfer. *Mol Reprod Dev* 1993; 35: 29-36.

Yoshida M. Conservation of sperms: current status and new trends. *Anim Reprod Sci* 2000; 60-61: 349-355.

CAPÍTULO SEGUNDO

4. Utilização do teste com acridina laranja e TUNEL para avaliar a integridade dos espermatozóides liofilizados de bovinos.

4.1. RESUMO: Uma correta detecção de danos nucleares é uma importante ferramenta para melhorar os métodos de preservação de espermatozóides. No presente estudo, o processo de liofilização foi utilizado como procedimento alternativo para preservar espermatozóides bovinos. Para detectar a condição do DNA das células espermáticas preservadas com os diferentes meios de liofilização dois métodos foram utilizados dois métodos, “acridine orange test” (AOT) e “terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUDP nick-end labeling “ (TUNEL). O AOT não foi capaz de detectar qualquer efeito da liofilização na integridade do DNA. Entretanto, quando o teste de TUNEL foi utilizado, uma diferença na integridade do DNA foi observada entre os tratamentos, sugerindo que o método de TUNEL é mais sensível para avaliar o DNA espermático. O tratamento utilizando a solução de EGTA (T3) apresentou 2% de espermatozóides com fragmentação de DNA, que não foi diferente ($P>0,05$) do tratamento controle. No entanto, o tratamento com TCM 199 e 10% of FCS (T1), demonstrou 14% de fragmentação de DNA. Quando os espermatozóides deste mesmo tratamento (T1) foi avaliado pelo AOT somente 4% de células apresentaram danos da cromatina, sendo similar aos outros tratamentos. Os resultados de fragmentação de DNA foram negativamente relacionados com o potencial de fecundação, uma vez que os danos ao DNA espermático foram inversamente relacionados com a formação de pró-núcleos. Desta forma, diferente do AOT, o teste de TUNEL pode ser

considerado um método eficiente para detectar danos ao DNA espermático e pode ser utilizado como uma ferramenta para prever a fertilidade do macho.

Palavras chave: Bovino, Liofilização, DNA, TUNEL, “Acridine orange test”, Conservação.

CAPÍTULO SEGUNDO

5. The use of Acridine orange Test and TUNEL assay to assess DNA integrity of bovine freeze-dried spermatozoa

Carlos Frederico Martins^{1, 2}, Margot Nunes Dode², Sônia Nair Bão¹, Rodolfo Rumpf²

Running Title: Evaluation of DNA status of bovine sperm freeze-dried

¹ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, W5 Norte final, 70770-990, Brasília, Distrito Federal, Brasil.

² Universidade de Brasília, Departamento de Biologia Celular, Distrito Federal, Brasil

Corresponding author: Carlos Frederico Martins

E-mail: frederico@cenargen.embrapa.br

6. ABSTRACT. The ability to detect nuclear damage is an important tool to improve methods of sperm preservation. In the present study, lyophilization process was used as an alternative procedure to preserve bovine spermatozoa. To detect DNA status of sperm cells preserved in different lyophilization medium two methods were used, the acridine orange test (AOT) and terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUDP nick-end labeling (TUNEL). The AOT was not able to detect any effect of the lyophilization treatment on DNA integrity. However, when TUNEL assay was used, a difference in DNA integrity was observed among treatments, suggesting that TUNEL is a more sensitive method to evaluate sperm DNA. Treatment using EGTA (T3) had 2% of the sperm cells with DNA fragmentation, which was not different ($P>0.05$) from the control. Nevertheless, treatment with TCM 199 and 10% of FCS (T1), showed 14% of DNA fragmentation. When the sperm from this same treatment (T1) was evaluated by AOT only 4% of the cells showed chromatin damages, which was similar to the others treatments. The results of the DNA fragmentation were negatively related with fertilizing potential, as the sperm DNA damage was inversely related to pro-nucleus formation. Therefore, in contrast to AOT, TUNEL assay can be considered an efficient method to detect sperm DNA damage, and can be used as a tool to predict male fertility.

Key words: Bovine, sperm freeze-drying, DNA, TUNEL, Acridine Orange test, Conservation.

7. INTRODUCTION

Lyophilization or freeze-drying is a procedure developed to preserve bioactive molecules (DNA, enzymes, and proteins), pharmaceuticals products (antibiotics) and other delicate solvent impregnated materials (Keskinetepe et al. 2002; Kusakabe and Kamiguchi 2004).

Recently, freeze-drying has been proposed to preserve mammalian spermatozoa and became an alternative method for cryopreservation (Wakayama et al. 1998; Kusakabe et al. 2001; Kaneko et al. 2003a; Kaneko et al. 2003b). In this technique the preservation of the sperm cell is obtained by the water removal due to ice sublimation, using high vacuum and low temperature.

Although sperm freeze-drying is a powerful tool, especially for animal conservation programs, it causes more damages than the conventional sperm cryopreservation procedures. When mammalian spermatozoa are freeze-dried, they lose motility and therefore, they are unable to fertilize oocytes both in vivo and in vitro (Liu et al. 2004). Nevertheless, if an intact nucleus is present, they can be used to fertilize oocytes through intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and are able to produce live offspring, as has been demonstrated in mouse and rabbit (Kwon et al. 2004).

Therefore, for sperm freeze-dried to produce live offspring the main requirement is the integrity of the nucleus (Kusakabe et al. 2001; Wakayama et al. 1998; Wakayama and Yanagimachi 1998). Thus, in order to increase efficiency of reproductive assisted techniques using sperm freeze-dried, a more accurate evaluation of sperm DNA status is needed.

Lately, several methods are used to assess sperm chromatin structure and DNA status (Erenpreiss et al. 2004). In general, the available assays can be classified into three categories, sperm chromatin structural probes, tests for direct assessment of sperm DNA fragmentation, and sperm nuclear matrix assays (Erenpreiss et al. 2006).

Among those methods the Acridine Orange Test (AOT) and the TUNEL assay are the most used to evaluate the sperm quality. The AOT, which uses a chromatin structural probe, measures *in situ* the DNA susceptibility to the acid-induced conformational helix-coil transition. On the other hand, TUNEL assay, that is a direct method for assessment of fragmented sperm DNA, quantifies the incorporation of dUTP at breaks in double-stranded DNA in a reaction catalyzed by terminal deoxynucleotidyl transferase.

It has been suggested that DNA damage can be induced by mechanical stress throughout freeze-drying procedure or by oxidative stress, which occurs after thawing or rehydration, during the holding period before ICSI (Kusakabe et al. 2001). If that is true, all the steps from sperm freeze-drying procedure to its use to fertilize an oocyte, can affect the status of the DNA. Therefore, the present study was designed to evaluate DNA damage of bovine spermatozoa submitted to different lyophilization treatments and to verify its relation with the fertilization potential. In addition we also aimed to compare two methods of DNA evaluation, AOT and TUNEL assay.

8. MATERIAL AND METHODS

8.1. Animals

All semen samples were obtained from one Nelore bull with in vitro fertility previously tested in our laboratory. Semen was collected using electroejaculation method.

8.2. Solution for freeze-drying spermatozoa

All reagents, unless otherwise stated, were purchased from Sigma Chemicals (St. Louis, MO). The different freeze-drying media tested were: medium 1: TCM 199 with Hanks salts (Gibco Life Technologies Inc., Grand Island, NY, USA) supplemented with 10% (v/v) FCS (Gibco Life Technologies Inc., Grand Island, NY, USA); medium 2: TCM 199 with Hanks salts supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum and 0.2 moles/L trehalose; medium 3: 10 mmoles/L Tris-HCl buffered supplemented with 50 mmoles/L of each of NaCl and EGTA [ethylene glycol-bis (β -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid] and pH of final solution adjusted to 8.2. The media 1, 2 and 3 were considered as treatments 1, 2 and 3, respectively.

For the control group a portion of the semen was separated before freezing-drying, and was cryopreserved with egg yolk Tris glycerol extender (Cormier et al., 1997).

8.3. Sperm freeze-drying

For all treatments the concentration was adjusted to 10×10^6 spermatozoa/100 μ l freeze-drying solution. Samples were diluted and kept at room temperature for 30 min; were cooled down in liquid nitrogen vapor for 1 h and then, plunged into liquid nitrogen. Frozen samples were immediately inserted into the freeze-dry machine (Thermo Savant, USA), previously stabilized at -40°C and 350×10^{-3} Mbar pressure. After 12-16 h of freeze-drying the tubes containing the samples were well covered with aluminum foil and stored for three months at 4°C .

8.4. Rehydration

Freeze-dried sperm samples were rehydrated by adding 100 μ l of milli-Q water at room temperature.

8.5. Evaluation of chromatin stability by Acridine Orange Test

For acridine orange staining, three smears from each sample were prepared on glass slide and air-dried. Each smear was fixed overnight in Carnoy's solution, freshly prepared with methanol and glacial acetic acid in a 3:1 proportion. The slides were air-dried again, and incubated in tampon solution (80 mmol/l citric acid and 15 mmol/l Na_2HPO_4 , pH 2.5) at 75°C for 5 minutes to test the chromatin stability. Then, the slides were stained with acridine orange stain (0.2 mg/ml). The slides were washed with water to remove background staining and while still wet, they were covered with coverslips and evaluated using epifluorescence microscope (Axiophot Zeiss; 490/530 nm excitation/barrier filter). A total of 100

cells were analyzed for each treatment slide. Sperm with normal DNA content presented a green fluorescence whereas sperm with an abnormal DNA content emitted fluorescence in a spectrum varying from yellow-green to red. The percentage of sperm with intact chromatin was calculated by dividing the number of green-stained sperm by the total number of sperm and multiplying by 100.

8.6. Detection of DNA fragmentation by TUNEL assay

For TUNEL technique, we used the In Situ Cell Death Detection Kit, fluorescein, carried out according to manufacturer's (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) protocol with slight modifications.

Spermatozoa were washed in 100 μ l of phosphate-buffered saline (PBS) supplemented with 0.1% polyvinylpyrrolidone (PVP). Sperm suspension was fixed with 100 μ l of 4% paraformaldehyde for 1 h at room temperature. Cells were washed again in PBS supplemented with PVP 0.1% and permeabilized with 0.5% Triton X-100 in 0.1% sodium citrate for 1 h on ice. Then, permeabilized spermatozoa were washed once in PBS supplemented with PVP 0.1% and incubated with TUNEL reaction mixture containing terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) plus dUTP label in the dark at 37° C for 1 h. After labeling, the cells were washed in PBS with PVP 0.1% and counterstained with 5 μ g/ml Hoechst 33342 to visualize total DNA. Negative (omitting TdT from the reaction mixture) and positive (using only DNase I, 1 mg/ml for 30 min at room temperature) controls were performed in each sample. For each sample tested, at least 100 cells were analyzed using a fluorescence microscope. Each spermatozoon was assigned to contain either a normal (blue nuclear fluorescence due to Hoechst 33342) or a

fragmented DNA (green nuclear fluorescence). Final percentage of sperm with fragmented DNA is referred to as TUNEL positive (%).

8.7. Gametes preparation for ICSI

Oocytes were matured for 22 h in media composed of TCM 199 with Earle's salts, supplemented with FCS 10% (v/v), 24 UI/ml of LH, 10 μ g/ml of FSH and antibiotics (50 UI/ml penicillin and 50 μ g/ml streptomycin). Matured oocytes were then exposed to 1mg/ml of bovine hyaluronidase for 5 min to remove the cumulus cells. Denuded oocytes with evident polar body were transferred back to maturation medium and maintained in the incubator until microinjection.

Freeze-dried sperm samples were rehydrated and washed twice by centrifugation for 3 min at 700 x g in TALP medium, where they remained until their use for ICSI. The frozen semen samples used as a control were prepared by centrifugation for 20 min at 700 x g in a percoll gradient 45%-90% (Parrish et al. 1995). The selected sperm obtained after percoll were capacitated by incubation with 200 μ g/ml of heparin for 1 h, before being used for ICSI.

8.8. Sperm microinjection

Sperm microinjection was performed by using a micromanipulator (Narishige Instrument, Tokyo, Japan) connected to an inverted microscope (Nikon, Japan) in a 200 x magnification. Dishes for microinjection were prepared by adding 10 drops of 20 μ l of TCM 199 with Hanks salts and 25mM HEPES, FCS (10% v/v) and antibiotics in the periphery of the dish and four drops of 10% polyvinylpyrrolidone

(PVP) solution (Irvine Scientific, Santa Ana, USA) containing the spermatozoa in the center of the dish. The selected spermatozoon had its tail broken by pressing the injection pipette against the bottom of the Petry dish. The spermatozoon with broken tail was then aspirated into the injection pipette and transferred to the drop containing the oocytes. The tip of the pipette was introduced into the perivitelline space and the oolemma was ruptured by gently aspirating small amounts of the ooplasm into the pipette. After, the spermatozoon and the small amount of the aspirated cytoplasm were inserted back into the oocyte with a minimal volume of the PVP solution.

8.9. Oocyte activation and embryo culture

For activation oocytes were exposed to a 5 μ M of ionomycin solution for 5 min and then were transferred to SOF media supplemented with 6 mg/ml of BSA fatty acid free, where they remained for 5 min to stop activation. After activation oocytes were cultured in SOF medium for 3 h for extrusion of the second polar body and finally incubated in a solution of 1.9 mM 6-dimethylaminopurine (DMAP) for 4 h. Activated oocytes were cultured in SOF media, using a co-culture with cumulus cells under mineral oil at 39°C with 5% CO₂ in air.

8.10. Evaluation of fertilization

A total of 165 oocytes were removed from culture at 16-18h pos-ICSI, fixed overnight in methanol: acetic acid (3:1 v/v) and stained with 1% of acetic acid lacmoid. Then, the oocytes were examined in phase-contrast microscope to verify

presence of decondensed sperm head and pronucleus formation.

8.11. Statistical analysis

Analysis of data was performed using Sigma Stat for Windows version 3.11 (Systat software, Inc). The results of AOT and TUNEL assay for the lyophilization treatments were compared by Mann-Whitney Rank Sum Test. A difference of $P < 0.05$ was considered statistically significant. To evaluate the relationship between DNA integrity and fertilization potential of freeze-dried sperm, a linear regression analysis was performed.

9. RESULTS

The analysis of the chromatin integrity by the OAT showed that for all treatments, including the control (frozen semen) the chromatin was kept stable (green fluorescence) in the majority of the cells analyzed (Figure 1a). The lyophilized spermatozoa with TCM 199 and FCS had 4% of the total cells showing chromatin damage (orange fluorescence; Figure 1b). Although, it was the highest rate (Table1), it was not different from the other groups ($P = 0.120$).

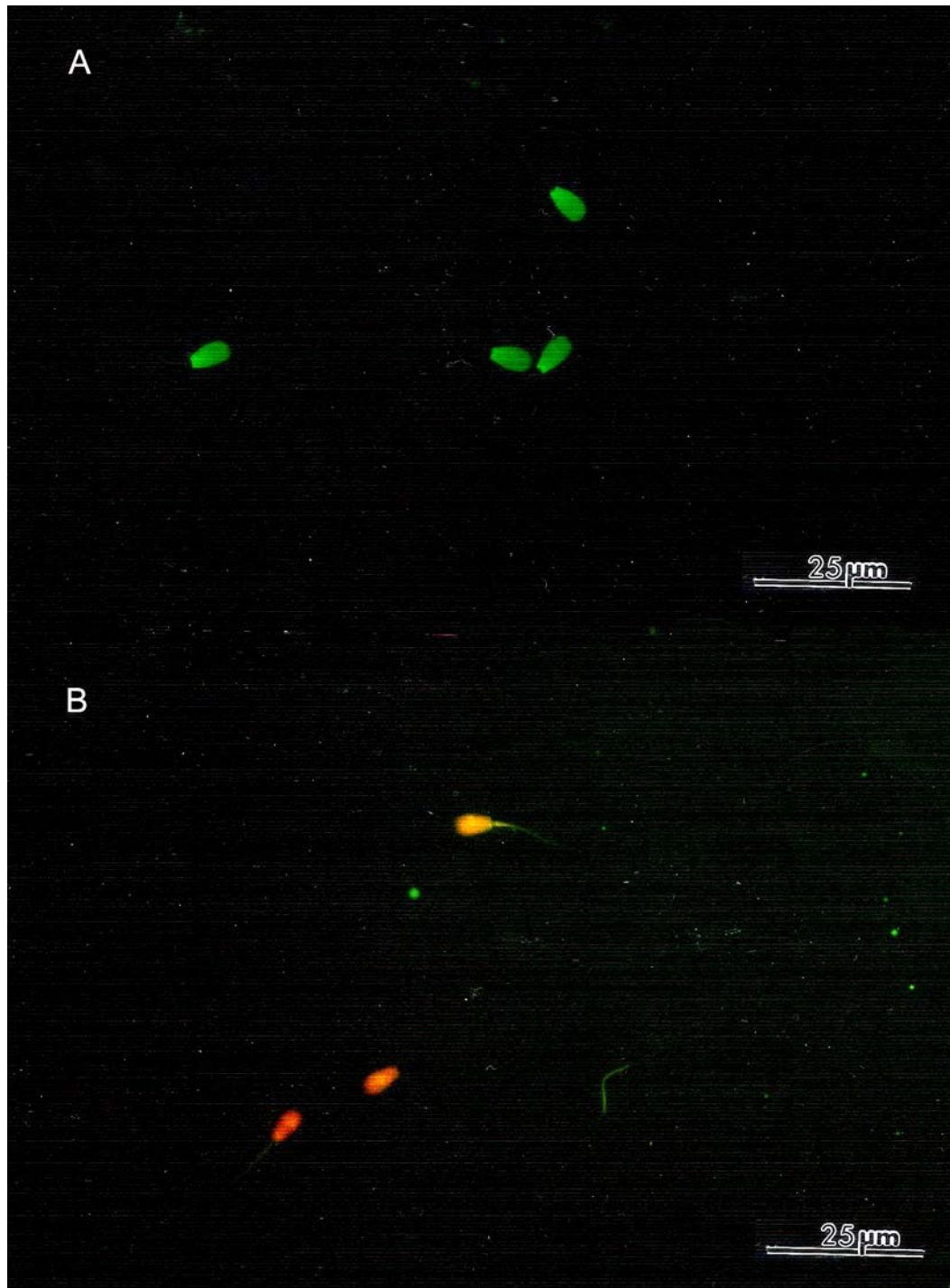


Figure 1: Acridine Orange Test applied in bovine freeze-dried spermatozoa with TCM 199 with Hanks salts. Figure A exhibiting spermatozoa with intact chromatin (green) and figure B spermatozoa with damage chromatin (orange).

The TUNEL assay was also used to assess differences in DNA damage among treatments (Figure 2). The treatment using EGTA (T3) had the lowest rate of DNA fragmentation (2%), being similar to the control ($P>0.05$). Treatment with trehalose (T2) showed 5% of the cells with DNA fragmentation, which was higher than T3 and the control, but was lower than T1. The highest rate ($P<0.05$) of DNA damage (14%) was observed in T1, in which TCM 199 with Hank's salts supplemented with 10% FCS was used for freeze-drying (Table 1)

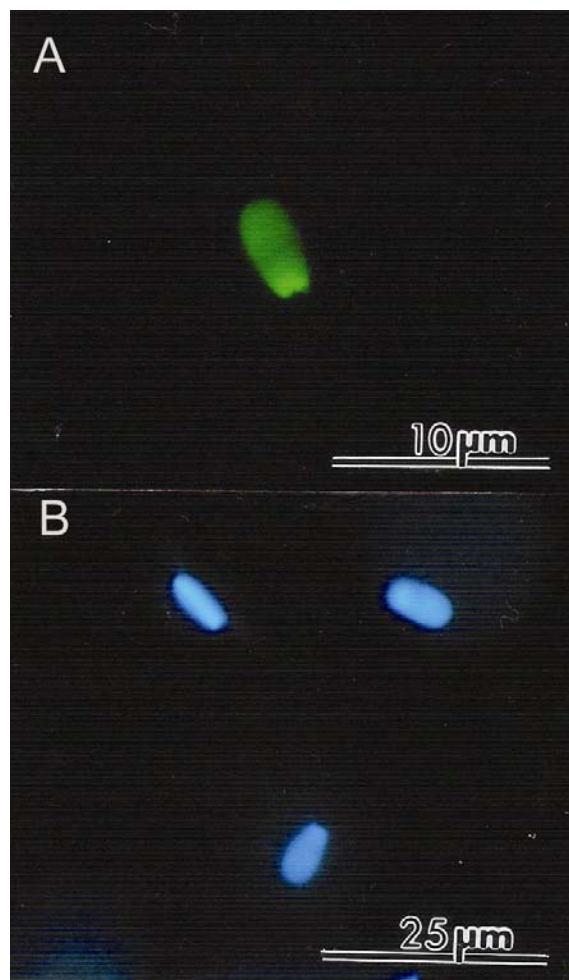


Figure 2: Bovine spermatozoa after freeze-drying with TCM 199 with Hanks salts, 10% FCS and 0.2 M trehalose presenting DNA fragmentation (A) and intact DNA (B), detected by the TUNEL assay.

Comparing both methods to detect DNA status, it was observed that TUNEL assay was able to detect a higher percentage of cells with DNA injuries than AOT (Table 1). In most of the treatments the amount of cells injured was low, however in T1 in which the percentage of damage was increased, TUNEL assay differentiated more precisely ($P=0,004$) the impaired cells than AOT.

Table 1: Comparison between Acridine Orange Test (ATO) and TUNEL assay to asses DNA damage in bovine sperm submitted to lyophilization with different freeze-drying media

Method	Percentage of cells with damaged DNA			
	<i>T1</i>	<i>T2</i>	<i>T3</i>	<i>Control</i>
TUNEL assay	14% ^a	5% ^a	2% ^a	1% ^a
AOT	4% ^b	2% ^a	1% ^a	0.5% ^a

^{a,b} Percentages with different superscripts, within columns, differ significantly at $p<0.05$.

T1: TCM 199 with Hanks salts supplemented with 10% FBS;

T2: TCM 199 with Hanks salts supplemented with 10% FBS and 0.2M of Trehalose;

T3: EGTA solution;

C: Control (frozen semen).

Table 2 depicts results of the freeze-dried spermatozoa nucleus functionality, for the different treatments, after ICSI. When matured oocytes were microinjected with spermatozoa from T2 and T3, the proportion of oocytes presenting sperm head decondensation and pronucleus formation, was similar ($P>0.05$) between them, but superior ($P<0.05$) to the results obtained for T1. As expect the control treatment showed the highest percentage of pronucleus

formation.

Table 2: Percentage of bovine oocytes presenting sperm head decondensation and pronucleus formation (PN) after ICSI with spermatozoa lyophilized with different freeze-drying media.

<i>Treatments</i>	<i>No of oocytes</i>	<i>MII+ISH</i>	<i>ISH+1PN</i>	<i>DH+1PN</i>	<i>2PN</i>
T1	40	9 (22.5%)	17 (42.5%)	6 (15.0%) ^b	8 (20.0%) ^a
T2	40	5 (12.5%)	6 (15.0%)	11 (27.5%) ^a	18 (45.0%) ^b
T3	40	10 (25.0%)	2 (5.0%)	13 (32.5%) ^a	15 (37.5%) ^b
Control	45	11 (24.4%)	4 (8.8%)	5 (11.1%) ^b	25 (55.5%) ^c

^{a,b,c} Percentages with different superscripts, within columns, differ significantly, $p < 0.05$.

MII+ISH: MII oocyte and intact sperm head; **ISH+1PN:** intact sperm head and female PN;

DH+1PN: sperm head decondensed and female PN; **2PN:** male and female PN.

T1: TCM 199 with Hanks salts supplemented with 10% FBS;

T2: TCM 199 with Hanks salts supplemented with 10% FBS and 0.2M of Trehalose;

T3: EGTA solution;

C: Control (frozen semen).

A positive relation between DNA integrity, assessed by TUNEL assay, and pronucleus formation after ICSI, was observed for all lyophilization treatments (Figure 3).

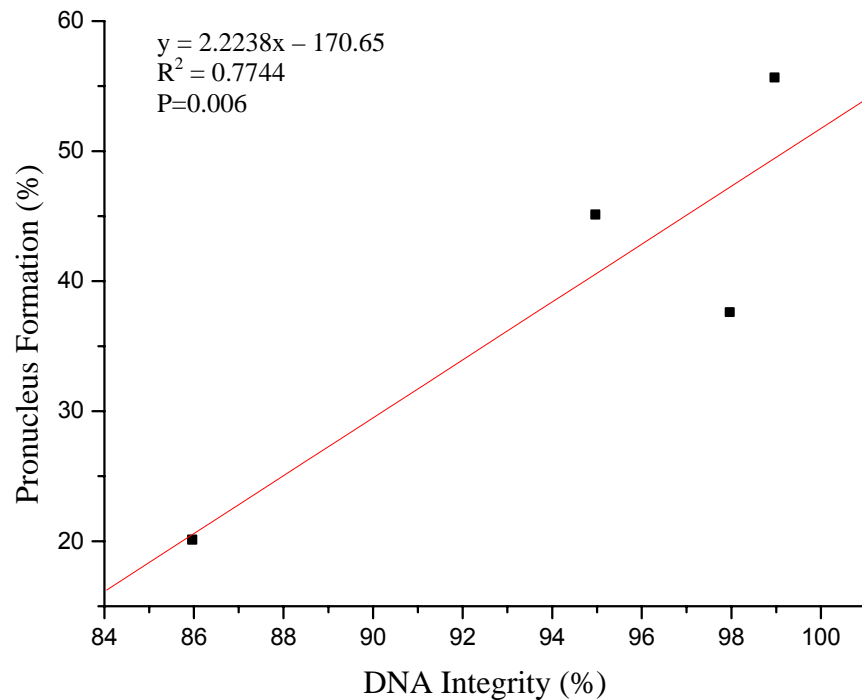


Figure 3: Linear regression between DNA integrity of sperm freeze-dried, using TUNEL assay, and pronucleus formation after ICSI.

10. DISCUSSION

Sperm freeze-drying is an alternative method for preservation of sperm cells. However, it can cause irreversible injuries to sperm structure, especially if suitable protection is not provided during the process itself or during storage. Considering these aspects, the present study was designed to monitor through two different approaches, AOT and TUNEL assay, possible injuries on the DNA when bovine spermatozoa are lyophilized with distinct protective substances. Based on the results it became clear that composition of lyophilization medium affects sperm DNA integrity. However, that effect was only confirmed when the TUNEL assay

was used, while the evaluation by AOT was not able to detect any abnormality, independent of the treatment used. Spermatozoa lyophilized with EGTA solution showed the lower DNA fragmentation rate, which was not different from the control treatment. In the samples preserved with trehalose, only 4 % of the sperm cells had fragmented DNA. The treatment with 10 % of FCS and TCM 199 conferred the lowest protection for sperm cell DNA, showing 14 % of the cells with fragmentation.

The contradictory results obtained with AOT and TUNEL allow us to raise some questions about the sensitivity of those tests. Nevertheless, when the fertilization potential of the spermatozoa was analyzed some assumptions can be made. The treatment using TCM 199 and FCS, which showed the highest rate of DNA fragmentation, also showed a higher percentage of oocytes with intact heads in the cytoplasm and, lower rate of pronucleus formation. These results agreed with the findings when the TUNEL technique was used, but not with AOT. Although the pattern of chromatin integrity was similar to the TUNEL, no differences were found among treatments, suggesting that AOT was not sensitive enough to detect the chromatin damage in the bovine sperm cell.

Even though AOT is an easy test to perform the results are doubtful, as was seen in this study. According to Duran et al. (1998) and Evenson et al. (1999) the main reasons for that are the subjectivity in reading and interpretation of the results, problems with rapidly fading fluorescence and heterogeneous slide staining. Those difficulties have limited the application of AOT in andrology clinics (Evenson et al. 2002; Perreault et al. 2003). To overcome those problems Evenson et al. (1980) developed the sperm chromatin structure assay (SCSA), which is similar to AOT, but gives better result since the evaluation is made by a flow

cytometer. The SCSA has been used with high efficiency in mice, equine, bovine and porcine sperm to evaluate sperm chromatin structure. Additionally, it has been used in humans as a routine measurement of sperm quality and fertility (Evenson and Jost 1994; Love and Kenney 1998; Evenson and Jost 2000).

In contrast, because TUNEL assay detects endogenous DNA damage it has been considered a more suitable method to quantify DNA breakage in sperm cells (Young et al. 2003). For human spermatozoa, TUNEL assay have been shown to have a significant relationship with both the SCSA (Larson-Cook et al. 2003) and single-cell gel electrophoresis (SCGE) or Comet assay (Collins et al. 1997). In the present study we demonstrated by the linear regression analysis that sperm DNA fragmentation is inversely related with fertilizing potential. Since DNA fragmentation increased as pronuclear formation decreased.

In conclusion, a previous evaluation of the sperm nuclei status is needed before using any of the reproductive assisted techniques. Sperm freeze-drying is a new methodology, in which the composition of the lyophilization medium is one of the factors that can provide a better protection for the spermatozoa. Evaluation of the freeze-dried sperm DNA has to be a routine procedure, given that the possibility of damage is higher than in others sperm preservation methods. In the present study, TUNEL assay was shown to be a more appropriate process to evaluate DNA status of lyophilized spermatozoa than AOT. Considering that the DNA detected by TUNEL assay was related with fertilization potential, we can assume that it should be the method of choice to predict sperm fertility.

Acknowledgments: The authors thank Embrapa Genetics Resources and Biotechnology and CNPq for the financial support.

11. REFERENCES

- Collins AR, Dobson VL, Dusinska M, Kennedy G et al. (1997). The comet assay: what can it really tell us? *Mutat Res* 375: 183-93.
- Cormier N, Sirad MA and Bayley JL (1997). Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. *J Androl* 18: 461-8.
- Duran EH, Gurgan T, Gunalp S, Enginsu ME et al. (1998). A logistic regression model including DNA status and morphology of spermatozoa for prediction of fertilization in vitro. *Hum Reprod* 13: 1235-9.
- Erenpreiss J, Jepson K, Giwercman A, Tsarev I et al. (2004). Toluidine blue cytometry test for sperm DNA conformation: comparison with the flow cytometric sperm chromatin structure and TUNEL assays. *Hum Reprod* 19: 2277-82.
- Erenpreiss J, Spano M, Erenpreisa J, Bungum M et al. (2006). Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects. *Asian J Androl* 8: 11-29.
- Evenson D and Jost L (1994). Sperm chromatin structure assay: DNA denaturability. *Methods Cell Biol* 42 Pt B: 159-76.
- Evenson DP, Darzynkiewicz Z, and Melamed MR (1980). Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science* 210: 1131-3.
- Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ et al. (1999). Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod* 14: 1039-49.
- Evenson, DP, Larson KL and Jost LK (2002). Sperm chromatin structure assay: its

- clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl* 23: 25-43.
- Kaneko T, Whittingham DG, Overstreet JW and Yanagimachi R. (2003a). Tolerance of the mouse sperm nuclei to freeze-drying depends on their disulfide status. *Biol Reprod* 69: 1859-62.
- Kaneko T, Whittingham DG and Yanagimachi R (2003b). Effect of pH value of freeze-drying solution on the chromosome integrity and developmental ability of mouse spermatozoa. *Biol Reprod* 68: 136-9.
- Keskintepe L, Pacholczyk G, Machnicka A, Norris K et al. (2002). Bovine blastocyst development from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. *Biol Reprod* 67: 409-15.
- Kusakabe H and Kamiguchi Y (2004). Chromosomal integrity of freeze-dried mouse spermatozoa after 137Cs gamma-ray irradiation. *Mutat Res* 556: 163-8.
- Kusakabe H, Szczygiel MA, Whittingham DG and Yanagimachi R (2001). Maintenance of genetic integrity in frozen and freeze-dried mouse spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 13501-6.
- Kwon IK, Park KE, and Niwa K (2004). Activation, pronuclear formation, and development in vitro of pig oocytes following intracytoplasmic injection of freeze-dried spermatozoa. *Biol Reprod* 71: 1430-6.
- Larson-Cook KL, Brannian JD, Hansen KA, Kasperson KM et al. (2003). Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay. *Fertil Steril* 80: 895-902.

- Liu JL, Kusakabe H, Chang CC, Suzuki H et al. (2004). Freeze-dried sperm fertilization leads to full-term development in rabbits. *Biol Reprod* 70: 1776-81.
- Love CC and Kenney RM (1998). The relationship of increased susceptibility of sperm DNA to denaturation and fertility in the stallion. *Theriogenology* 50: 955-72.
- Parrish JJ, Krogenaes A and Susko-Parrish JL (1995). Effect of bovine sperm separation by either swim-up and percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. *Theriogenology* 44: 859-69.
- Perreault SD, Aitken RJ, Baker HW, Evenson DP et al. (2003). Integrating new tests of sperm genetic integrity into semen analysis: breakout group discussion. *Adv Exp Med Biol* 518: 253-68.
- Wakayama TD, Whittingham G and Yanagimachi R (1998). Production of normal offspring from mouse oocytes injected with spermatozoa cryopreserved with or without cryoprotection. *J Reprod Fertil* 112: 11-7.
- Wakayama T and Yanagimachi R (1998). Development of normal mice from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. *Nat Biotechnol* 16: 639-41.
- Young KE, Robbins WA, Xun L, Elashoff D et al. (2003). Evaluation of chromosome breakage and DNA integrity in sperm: an investigation of remote semen collection conditions. *J Androl* 24: 853-61.

CAPÍTULO TERCEIRO

12. Efeito dos diferentes tratamentos de liofilização sobre os espermatozóides bovinos: avaliações citológicas, ultraestruturais, de fragmentação do DNA e da habilidade de fecundação.

12.1. RESUMO: A liofilização espermática representa uma ferramenta alternativa para a preservação de espermatozóides. Recentemente, esta metodologia tem sido aplicada para várias espécies, entretanto, poucos estudos são descritos nos bovinos. Desta forma, o principal objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de proteção dos diferentes meios de liofilização sobre os componentes estruturais e funcionais dos espermatozóides bovinos. Os meios protetores testados foram compostos de TCM 199 com sais de Hanks, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB); TCM 199 com sais de Hanks, suplementado com 10% de SFB e 0.2 M de trehalose; e a solução de EGTA. A eficiência de cada meio na preservação das estruturas dos espermatozóides bovino liofilizados foi avaliada utilizando análise de microscopia ótica e eletrônica. A integridade do DNA foi analisada pela técnica de TUNEL e a participação dos espermatozóides liofilizados no processo de fecundação foi verificada com a utilização da ICSI. A membrana plasmática foi danificada em todos meios testados, no entanto, outros componentes celulares tais como acrossoma e mitocôndrias foram similarmente preservados em todos os tratamentos de liofilização. Os microtúbulos apresentaram-se desorganizados nos tratamentos com trehalose e EGTA. Em contraste, o meio contendo EGTA e trehalose foram mais eficientes para preservar o núcleo dos espermatozóides liofilizados, demonstrando somente 2% e 5%, respectivamente de células com

fragmentação de DNA. De fato, os espermatozóides conservados com estes meios apresentaram taxas mais altas ($P < 0.05$) de cabeças descondensadas, formação de pró-núcleos e de blastocistos, do que com o meio suplementado apenas com SFB. Estes resultados demonstraram que os meios com EGTA e trehalose são adequados para proteger os espermatozóides bovinos durante a liofilização, preservando a viabilidade nuclear.

Palavras chave: Bovino, ICSI, Preservação, Liofilização espermática, TUNEL.

13. Effect of different freeze-drying treatment on bovine spermatozoa: cytological, ultrastructural, DNA fragmentation and fertilization ability evaluation.

Carlos F. Martins^{a, b, *}, Sônia N. Bão^b, Margot N. Dode^a,

Georgia A. Correa^a, Rodolfo Rumpf^a

^a*Embrapa Genetics Resources and Biotechnology, W5 Norte final, 70770-990,*

Brasília,

Distrito Federal, Brazil

^b*University of Brasília, Department of Cellular Biology, Distrito Federal, Brazil*

* Corresponding author. Tel.: +55-6134484714; fax: +055-6133403658

E-mail address: frederico@cenargen.embrapa.br (C.F. Martins).

Running title: Bovine sperm freeze-dried with different media

14. Abstract

Sperm freeze-drying represents an alternative tool for preservation of spermatozoa. Recently, this methodology has been applied to several species, however few studies are described in bovine. This way, the main objective of this study was to evaluate the protective effect of different freeze-drying media on the structural and functional components of bovine spermatozoa. The protectors media tested were composed of TCM 199 with Hanks salts supplemented with 10% fetal calf serum (FCS); TCM 199 with Hanks salts supplemented with 10% FCS and 0.2 M trehalose and EGTA solution. The efficiency of each media on the preservation of freeze-dried bovine sperm structures was evaluated using optical and electron microscopy analysis. DNA integrity was analyzed by TUNEL assay and participation of the lyophilized spermatozoa in fertilization process after ICSI. Plasma membrane was damaged in all media tested, however other cell components such as acrosome and mitochondria were similarly preserved in all freeze-drying treatments. The microtubules were disorganized in treatments with trehalose and EGTA. In contrast, medium containing EGTA and trehalose were more efficient to preserve nuclei in freeze-dried sperm, showing only 2% and 5%, respectively, of cells with fragmented DNA. Indeed, the spermatozoa conserved with these media also presented higher ($P < 0.05$) rates of decondensed sperm head, pronucleus formation and blastocysts rate than the media supplemented only with FCS. These results demonstrated that media with EGTA and trehalose are adequate to protect bovine sperm during freeze-drying by preserving nuclear viability.

Keywords: Bovine, ICSI, Preservation, Sperm freeze-drying, TUNEL.

15. Introduction

Cryopreservation of male gametes has contributed significantly in animal production and preservation, human reproduction as well as in many areas of scientific research.

Recently, freeze-drying or lyophilization process became a new method of sperm preservation and has been the focus of many research groups due to its economical and practical benefits. Decrease in cost, eliminating the need for liquid nitrogen, reduction of space for gamete storage and being an easier and much less expensive way to transport sperm samples, are the main factors that justify researchers interest and effort.

Freeze-drying is a procedure developed to preserve bioactive molecules (DNA, enzymes, and proteins), pharmaceuticals products (antibiotics) and other delicate solvent impregnated materials [1,2]. This procedure has been used to preserve cells due to its ability to restrict active water by ice sublimation [3].

The first report of cell preservation by dehydration in mammals showed that red blood cells maintained their bioavailability after freeze-drying [4]. Later, this procedure has been applied to preserve sperm cells in mammals [5]. This methodology provides the possibility to store and transport dehydrated gametes at room temperature or at 4°C, which brings many benefits for preservation of male genome of laboratory and farm animals [6].

One of the main concerns with any cryopreservation method is the level of damage inflicted in the cell to be preserved. Even the classical cryopreservation process of sperm cells, depending on the procedure applied, affects in higher or

lower extension sperm motility and its ability to fertilize an egg, specially by affecting acrosomal integrity [7].

On the other hand, freeze-drying is much more aggressive to the sperm cells and induces loss of the fertilizing ability. In spite of all the injuries caused by the procedure, live offspring were obtained when freeze-dried sperm from mouse [5] and rabbit [8] were used for intracytoplasmic sperm injection (ICSI). This result suggested that the cells, although with lost motility, were able to keep the nuclear viability. This assumption on based in the fact that sperm nucleus and centrosome integrity are essential for the success of ICSI [9].

Efforts to preserve spermatozoa structural integrity have been made by testing various protectors substances such as albumin [5,10], EGTA solution [11] and trehalose [12]. However, the exact components of the sperm cell in which they act are not clear yet. We evaluate the effect of different freeze-drying media containing those protectors substances on the main sperm cell components. We documented alteration in the functional and structural composition of the bovine spermatozoa caused by the freeze-drying process, providing new information in this species in which very few information related to the damages caused by lyophilization technique are available.

16. Materials and Methods

16.1. Animals

All semen samples were obtained from one Nelore bull with in vitro fertility previously tested in our laboratory. Semen was collected using electroejaculation method.

16.2. Solution for freeze-drying spermatozoa

All reagents, unless otherwise stated, were purchased from Sigma Chemicals (St. Louis, MO). The different freeze-drying media tested were: medium 1: TCM 199 with Hanks salts (Gibco Life Technologies Inc., Grand Island, NY, USA) supplemented with 10% (v/v) FCS (Gibco Life Technologies Inc., Grand Island, NY, USA); medium 2: TCM 199 with Hanks salts supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum and 0.2 moles/L trehalose; medium 3: 10 mmoles/L Tris-HCl buffered supplemented with 50 mmoles/L of each of NaCl and EGTA [ethylene glycol-bis (β -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid] and pH of final solution adjusted to 8.2. The media 1, 2 and 3 were considered as treatments 1, 2 and 3, respectively.

16.3. Experimental design

Three different semen samples were collected and used in the evaluations. Immediately after collection spermatozoa were evaluated for motility by subjective assessment, concentration and morphology. Only semen samples presenting motility higher than 80% and with less than 10% of morphological abnormalities were used for the experiment. Ejaculate was divided into 2 portions. One was

cryopreserved with egg yolk Tris glycerol extender [13] in the concentration of 30×10^6 spermatozoa/0.5 ml and was used as the control group. The other portion was centrifuged in a percoll gradient (45%-90%), to remove seminal plasma. Subsequently, sperm was washed twice in Tyrode's albumin lactate pyruvate (TALP) [14], and distributed into three freeze-drying treatment (T1, T2 and T3). Samples from all treatments were submitted to freeze-drying process under the same conditions and were stored for three months at 4°C. After storage period, freeze-dried sperm samples were rehydrated and sperm cells were then evaluated according to the procedures presented in Fig. 1. All semen evaluations were repeated three times.

16.4. Sperm freeze-drying

For all treatments the concentration was adjusted to 10×10^6 spermatozoa/ 100 μ l freeze-drying solution. Samples were diluted and kept at room temperature for 30 min; were cooled down in liquid nitrogen vapor at approximately - 80°C for 1 h and then, plunged into liquid nitrogen. Frozen samples were immediately inserted into the freeze-dry machine (Thermo Savant, USA), previously stabilized at - 40°C and 350×10^{-3} Mbar pressure. After 12-16 h of freeze-drying the tubes containing the samples were well covered with aluminum foil and stored for three months at 4°C.

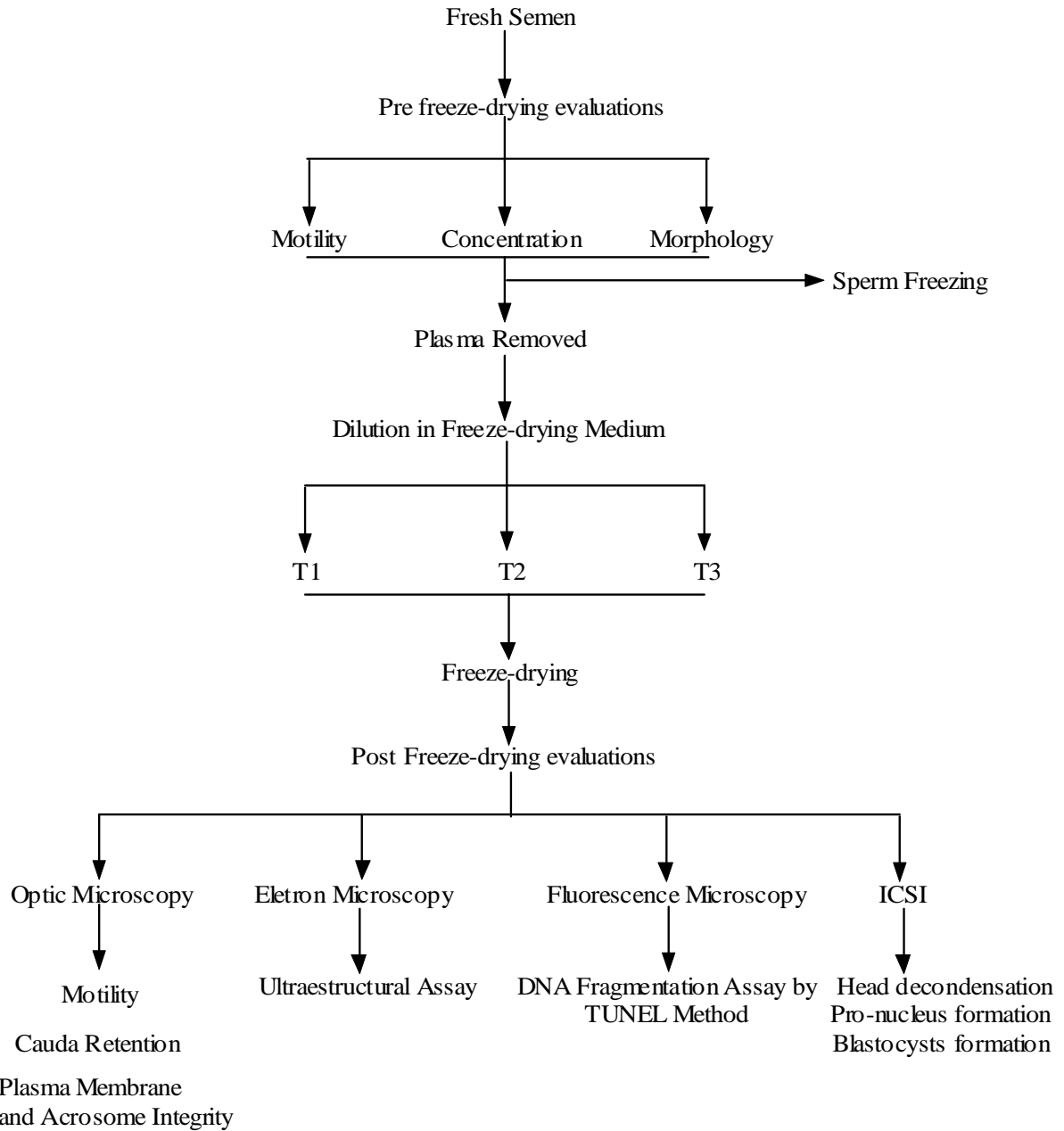


Fig.1. Experimental protocol for freeze-drying and evaluations of sperm structural and functional parameters using three different freeze-drying media, supplemented with FCS (T1), with FCS and trehalose (T2) and EGTA solution (T3).

16.5. Rehydration

Freeze-dried sperm samples were rehydrated by adding 100µl of milli-Q

water at room temperature.

16.6. Plasma membrane and acrosome integrity

The evaluation of sperm membrane and acrosome integrity was performed before and after freeze-drying by optical microscopy. A sample of 20 μ l from each treatment suspension was incubated with 20 μ l of trypan blue stain (0.4%) at 37°C for 10 min, and then centrifuged twice at 700 x g for 6 min. The pellet was resuspended with 0.5 ml of TALP and 3 smears were made from each sample. The smears were fixed with methanol for 5 min, dried and stained overnight with Giemsa (0.4%). Slides were evaluated by counting 100 cells in bright field microscopy and the results were expressed as percentage of cells with intact acrosome.

16.7. Ultrastructural assessment

To confirm the observations obtained in optical microscopy and to evaluate sperm ultrastructure, a transmission electron microscopy analysis was performed in samples from all treatments. Spermatozoa of each treatment were fixed for 3 h at room temperature in a solution containing 2% glutaraldehyde, 2% paraformaldehyde, 5% sucrose and 5 mM CaCl_2 in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2. After fixation, the specimens were rinsed in buffer, and post fixed in 1% osmium tetroxide, 0.8% potassium ferricyanide, 5 mM CaCl_2 in 0.1 M sodium cacodylate buffer, for 1 h. Dehydration was carried out in acetone and embedding in Epon 812 resin. Ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate, and examined in a Jeol 1011 (Jeol, Tokyo, Japan) transmission electron

microscope, operating at 80 kV. All electron microscopy reagents were purchased from Electron Microscopy Sciences (Ft, Washington, PA, USA).

16.8. Detection of DNA fragmentation by TUNEL assay

For TUNEL technique, we used the In Situ Cell Death Detection Kit, fluorescein, carried out according to manufacturer's (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) protocol with slight modifications.

Spermatozoa were washed in 100 µl of phosphate-buffered saline (PBS) supplemented with 0.1% polyvinylpyrrolidone (PVP). Sperm suspension was fixed with 100 µl of 4% paraformaldehyde for 1 h at room temperature. Cells were washed again in PBS supplemented with PVP 0.1% and permeabilized with 0.5% Triton X-100 in 0.1% sodium citrate for 1 h on ice. Then, permeabilized spermatozoa were washed once in PBS supplemented with PVP 0.1% and incubated with the TUNEL reaction mixture containing terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) plus dUTP label in the dark at 37° C for 1 h. After labeling, the cells were washed in PBS with PVP 0.1% and counterstained with 5µg/ml Hoechst 33342 to visualize total DNA. Negative (omitting TdT from the reaction mixture) and positive (using only DNase I, 1 mg/ml for 30 min at room temperature) controls were performed in each sample. For each sample tested, at least 100 cells were analyzed using a fluorescence microscope. Each spermatozoon was assigned to contain either a normal (blue nuclear fluorescence due to Hoechst 33342) or a fragmented DNA (green nuclear fluorescence). Final percentage of sperm with fragmented DNA is referred to as TUNEL positive.

16.9. Gametes preparation for ICSI

Oocytes were obtained from slaughterhouse ovaries and matured for 22 h in media composed of TCM 199 with Earle's salts, supplemented with FCS 10% (v/v), 24 UI/ml of LH, 10 μ g/ml of FSH and antibiotics (50 UI/ml penicillin and 50 μ g/ml streptomycin). Matured oocytes were then exposed to 1mg/ml of bovine hyaluronidase for 5 min to remove the cumulus cells. Denuded oocytes with evident polar body were transferred back to maturation medium and maintained in the incubator until microinjection.

Freeze-dried sperm samples were rehydrated and washed twice by centrifugation for 3 min at 700 x g in TALP medium, where they remained until their use for ICSI. The frozen semen samples used as a control were prepared by centrifugation for 20 min at 700 x g in a percoll gradient 45%-90% [14]. The selected sperm obtained after percoll were capacitated by incubation with 200 μ g/ml of heparin for 1 h, before being used for ICSI.

16.10. Sperm microinjection

Sperm microinjection was performed by using a micromanipulator (Narishige Instrument, Tokyo, Japan) connected to an inverted microscope (Nikon, Japan) in a 200 x magnification. Dishes for microinjection were prepared by adding 10 drops of 20 μ l of TCM 199 with Hanks salts and 25mM HEPES, FCS (10% v/v) and antibiotics in the periphery of the dish and four drops of 10% polyvinylpyrrolidone (PVP) solution (Irvine Scientific, Santa Ana, USA) containing the spermatozoa in the center of the dish. The selected spermatozoon had its tail broken by pressing the injection pipette against the bottom of the Petry dish. The spermatozoon with

broken tail was then aspirated into the injection pipette and transferred to the drop containing the oocytes. The tip of the pipette was introduced into the perivitelline space and the oolemma was ruptured by gently aspirating small amounts of the ooplasm into the pipette. After, the spermatozoon and the small amount of the aspirated cytoplasm were inserted back into the oocyte with a minimal volume of the PVP solution. Sham injections were performed in a similar manner for the parthenogenetic control.

16.11. Oocyte activation and embryo culture

All microinjected oocytes from each treatment were cultured for 1 h in SOF medium, until activation time. For activation oocytes were exposed to a 5 μ M of ionomycin solution for 5 min and then were transferred to SOF media supplemented with 6 mg/ml of BSA fatty acid free, where they remained for 5 min to stop activation. After activation oocytes were cultured in SOF medium for 4 h for extrusion of the second polar body and finally incubated in a solution of 1.9 mM 6-dimethylaminopurine (DMAP) for 4 h. Activated oocytes were cultured in SOF media, using a co-culture with cumulus cells under mineral oil at 39°C with 5% CO₂ in air.

16.12. Evaluation of decondensed sperm head, pronucleus formation and embryonic development

A total of 165 oocytes were removed from culture at 16-18h pos-ICSI, fixed overnight in methanol: acetic acid (3:1 v/v) and stained with 1% of acetic acid lacmoid. Then, the oocytes were examined in phase-contrast microscope to verify

presence of decondensed sperm head and pronucleus formation.

Embryonic development was assessed on the day 2 (cleavage) and day 7 (blastocyst rate) after start of the culture.

16.13. Statistical analysis

Analysis of data was performed using Sigma Stat for Windows version 3.11 (Systat software, Inc). One-way repeated measures ANOVA was used to compare the effects of different freeze-drying treatments. The data are given as mean values \pm SD. When ANOVA revealed a significant effect, the treatments were compared by Holm-Sidak test. A difference of $P < 0.05$ was considered significant.

17. Results

17.1. Evaluation of optical microscopy

Fresh semen showed mean percentage of motile spermatozoa of 90%, however the dilution with freeze-drying media caused significant changes on this characteristic. Ten minutes after dilution motility was 80%, 30% and 40% for treatments T1, T2 e T3, respectively. After 30 min, no change in the motility for T1 was noted while in T2 and T3, all cells were immotile. Indeed after freeze-drying and rehydration all spermatozoa were immotile and were stained as dead by the trypan blue-giemsa stain due to the breaking of plasma membrane.

Sperm from treatments T1 and T2 were easily diluted and dispersed by the use of milli-Q water, in contrast, those from T3 were strongly agglutinated, being very difficult to dissolve them, even after repeated pipetting.

Although the percentage of spermatozoa with tail separated from the head showed a tendency ($P < 0.10$) to be higher in T1 (8%), than in T2 (5%) and in T3 (6%), it was similar to the percentage found in the control group.

As shown in Fig. 2, the percentage of sperm with intact acrosome was lower in T1 and T3 ($P < 0.05$) than in the other groups.

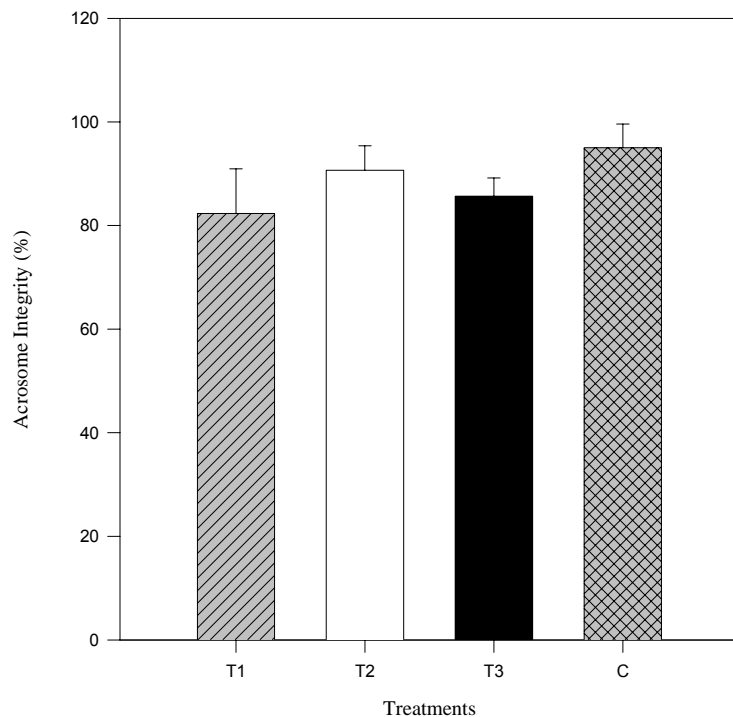


Fig. 2. Acrosome integrity in the different freeze-drying treatments and control (frozen sperm) evaluated by trypan blue-giemsa stain. Data are represented as the mean \pm SD and different superscript letters over bars represent statistical differences at $p < 0.05$.

17.2. Ultrastructural assessment

Electron microscopy analysis (Table 1) confirmed the results obtained by optical microscopy in regard to plasma membrane and acrosome integrity. The

sperm cell component most affected by freeze-drying was the plasma membrane (Fig. 3 A-D), which was damaged in all treatments, differing from the control (Fig. 3 E-F). Microtubules organization was also compromised in the majority of the spermatozoa from T2 and T3 (Fig. 3 D), diverging from T1 (Fig. 3 B) and control (Fig. 3 F), in which microtubules were intact. Conversely, acrosome and mitochondria were kept intact in all treatments (Fig. 3 A-F).

Table 1: Evaluation of the main sperm cell components by transmission electron microscopy after freeze-drying using different dilution media.

Treatments	Membrane	Acrosome	Mitochondria	Microtubules
T 1	Damaged	Intact	Intact	Intact
T 2	Damaged	Intact	Intact	Damaged
T 3	Damaged	Intact	Intact	Damaged
Control	Intact	Intact	Intact	Intact

T1: TCM 199 with Hanks salts supplemented with 10% FCS;

T2: TCM199 with Hanks salts supplemented with 10% FCS and 0.2M of trehalose;

T3: EGTA solution;

C: Control (frozen semen).

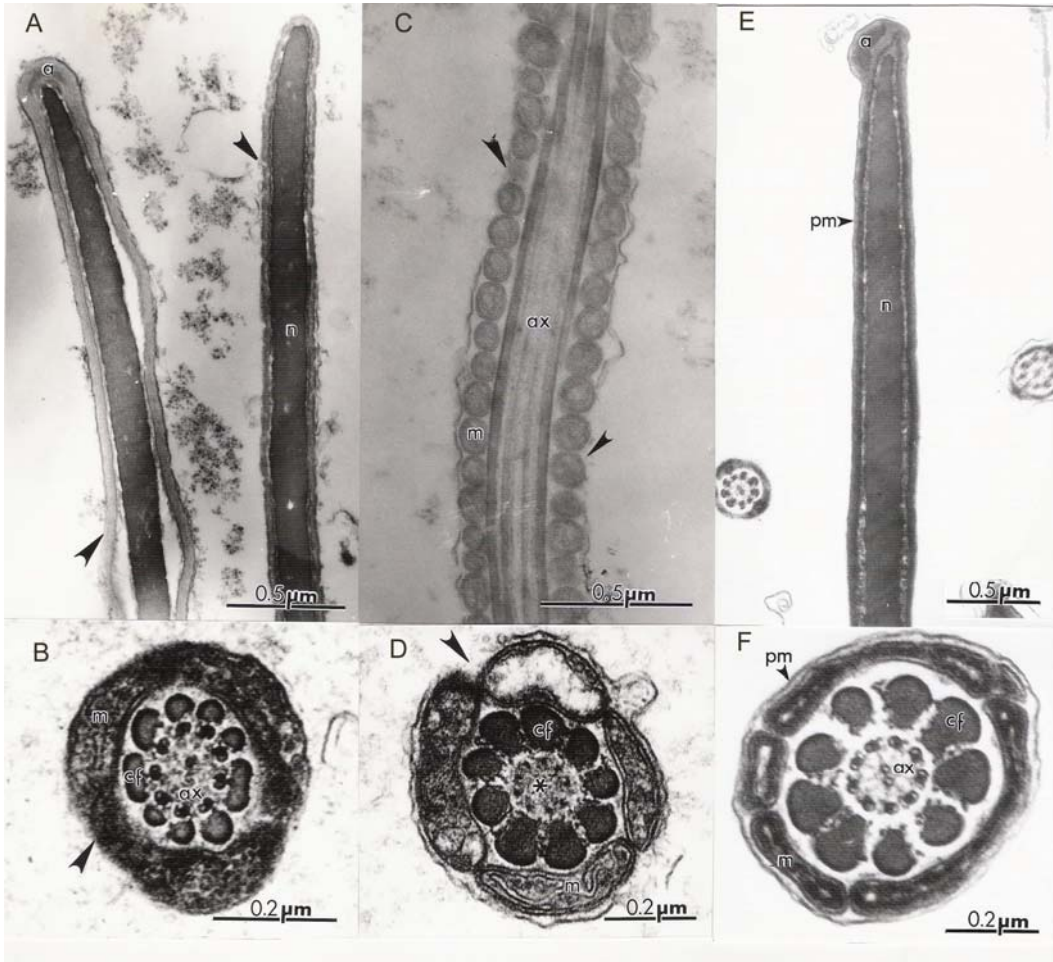


Fig. 3. Electron micrographs showing freeze-dried spermatozoa: A - spermatozoa from T3 with damaged plasma membrane (arrowhead) and intact acrosome (a) and nucleus (n); B - spermatozoa from T2 with damaged plasma membrane (arrowhead), presence of intact mitochondria (m) and axoneme (ax); C - spermatozoa from T1 with damaged plasma membrane (pm, arrowhead), presence of intact mitochondria (m), coarse fibers (cf) and axoneme (ax); D- spermatozoa from T2 with disorganized microtubules (*); E and F- frozen spermatozoa (control) with well preserved ultrastructure.

17.3. DNA fragmentation assay

The TUNEL assay was used to assess differences in DNA damage among treatments. The treatment using EGTA (T3) had the lowest rate of DNA fragmentation (2%), being similar to the control ($P>0.05$). Treatment with trehalose (T2) showed 5% of the cells with DNA fragmentation, which was higher than T3 and the control, but lower than T1 (Fig. 4). The highest ($P<0.05$) DNA damage rate (14%) was observed in T1 in which TCM 199 with Hanks salts supplemented with 10% FCS was used for freeze-drying.

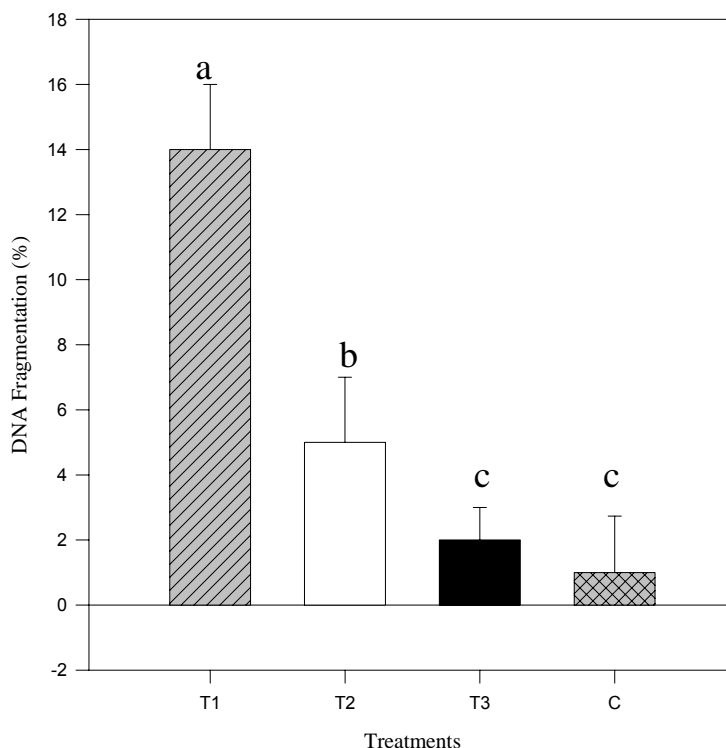


Fig. 4. Percentage of spermatozoa presenting DNA fragmentation in the various treatments for freeze-drying and for the control (frozen semen) evaluated by TUNEL assay. Data are represented as the mean \pm SD and different superscript letters over bars represent statistical differences at $p<0.05$.

17.4. Development of oocytes after ICSI

Table 2 and 3 depicts results of the freeze-dried spermatozoa nucleus functionality, for the different treatments, after ICSI. When matured oocytes were microinjected with spermatozoa from T2 and T3, the proportion of oocytes presenting sperm head decondensation and pronuclear formation, was similar ($P>0.05$) between them, but superior ($P<0.05$) to the results obtained for T1. In the same way, the blastocyst rate was similar ($P>0.05$) for T2, T3 and control (frozen semen), however, superior ($P<0.05$) to the results obtained for groups T1 and parthenogenetic control (sham injection).

Table 2: Percentage of bovine oocytes presenting sperm head decondensation and pronucleus formation after ICSI with spermatozoa lyophilized with different freeze-drying media.

Treatments	No. of oocytes	MII+ISH	ISH+1PN	DH+1PN	2PN
T1	40	9 (22.5%)	17 (42.5%)	6 (15%) ^b	8 (20%) ^a
T2	40	5 (12.5%)	6 (15%)	11 (27.5%) ^a	18 (45%) ^b
T3	40	10 (25%)	2 (5%)	13 (32.5%) ^a	15 (37.5%) ^b
Control	45	11 (24.44%)	4 (8.88%)	5 (11.11%) ^b	25 (55.55%) ^c

^{a,b}within a column, percentages with different superscripts differ significantly, $p<0.05$. Replicates: 5

MII+ISH: MII oocyte + intact sperm head; **ISH+1PN:** intact sperm head + female PN; **DH+1PN:** head decondensed + female PN; **2PN:** male + female PN.

T1: TCM 199 with Hanks salts supplemented with 10% FCS;

T2: TCM 199 with Hanks salts supplemented with 10% FCS and 0.2M of trehalose;

T3: EGTA solution;

C: Control (frozen semen).

Table 3: Embryo development after ICSI with spermatozoa lyophilized with different freeze-drying media.

Treatments	No. of oocytes	Cleavage (%)	Blastocysts (%)
T1	185	67 (36,21%) ^a	19 (10,27%) ^a
T2	185	93 (50,27%) ^b	34 (18,37%) ^b
T3	180	104 (57,77%) ^c	35 (19,44%) ^b
Frozen semen	185	99 (53,51%) ^c	38 (20,54%) ^b
Sham injection	160	52 (32,50%) ^a	13 (8,12%) ^a

^{a,b,c}within a column, percentages with different superscripts differ significantly, $p < 0.05$. Replicates: 10

T1: TCM 199 with Hanks salts supplemented with 10% FCS;

T2: TCM199 with Hanks salts supplemented with 10% FCS and 0.2M of trehalose;

T3: EGTA solution;

Frozen semen: control

Sham injection: parthenogenetic control

18. Discussion

In the present study we describe, with details, information not mentioned before in other reports, about the level of protection of different freeze-drying media on the structural and functional characteristics of the bovine spermatozoa. We demonstrated for the first time that EGTA solution, which is widely used in mice [2,11,15], is efficient to preserve nucleus, acrosome and mitochondria of bovine sperm cell. In addition, we showed that the medium containing trehalose and FCS protected, the bovine sperm submitted to freeze-drying process as well. The presence of decondensed sperm head, pronucleus and blastocyst formation after ICSI, observed in those treatments, demonstrated that freeze-dried spermatozoa

using EGTA solution and medium supplemented with FCS and trehalose were able to fertilized matured oocytes.

The main objective of research on sperm cell freeze-drying is to preserve motility and the fertilization capability, in such a way that they could be used in artificial insemination or in vitro fertilization. However, this goal has not been achieved in any of the species studied, even when changes in the conditions of freeze-drying or storage were made. As expected, in the present investigation sperm were immotile after freeze-drying in all treatments. Indeed, damage of the sperm plasma membrane of all cells analyzed was verified by exclusion stain and confirmed by electron microscopy. In fact, plasma membrane is one of the most susceptible components to damage due to loss of water consequent of dehydration. According to Crowe [16], water loss from phospholipids headgroups in cellular membranes may lead to lateral phase separation and cause extravasation of the intracellular content.

Acrosome is another component of the sperm cell that has been widely reported as suffering extensive injuries by freeze-drying process. However, we observed that more than 80% of the cells showed presence of acrosome, independently of the media used (Fig. 2). Although there is no report in bovines, the results of the present study differ from those described in mice [5] and rabbits [8] and are similar to those in rats [17]. It is important to point out that the electron microscopy analysis confirmed that the acrosome was not lost, and no changes in its morphology were observed in the freeze-dried sperm as well as in the control group (Fig. 3 A and E). These results suggested that the presence of protectors

media during freeze-drying may provide higher acrosome retention and avoid morphological alterations.

Separation of the tail from the head of the lyophilized sperm has been mentioned as a common finding in pigs [6], rabbits [8] and in mice using DMEN [5] or EGTA media [11]. Although there were slight differences among media used, we observed a low degree of head-tail separation, being the media containing trehalose and EGTA the one with the lowest level of tail separation. It is possible that bovine sperm has a greater stability in the connection region than other species which could explain the low loss of tail after freeze-drying when compared to data found in the literature. Electron microscopy evaluation showed that in all treatments the mitochondria were preserved (Fig. 3 C) after freeze-drying, however microtubules remained intact only in the media containing FCS and in the control group (Table 1; Fig. 3 B and 3 F). Therefore, we can hypothesize that the media with EGTA and trehalose, due to their hypertonicity, could affect microtubules integrity in higher extension.

Although freeze-drying process aims to completely preserve structural and functional sperm characteristics, studies have shown that an intact sperm nucleus can be the only condition needed to obtain a successful embryo development [5, 15]. Mammals sperm nuclei are very stable and highly condensed with an unique DNA organization [18], being 6 times more compact and having 40 times less DNA volume than somatic cells [19,20]. This unique type of DNA packing is essential to protect the cell and minimize damages caused by exogenous agents before fertilization. It has been suggested that the bovine spermatozoa have a more stable nuclear packing than other species [21], which resulted in some difficulties

for the sperm head decondensation in the ooplasm when bovine spermatozoa are used for ICSI. On the other hand, this nuclei characteristic makes the bovine sperm an ideal cell to be preserved by freeze-drying.

Sperm DNA can be damaged during freeze-drying and especially during storage if the adequate protection is not provided. It is well known that damages in DNA can be caused by activation of endogenous nucleases, which is always injured after freeze-drying. In the present investigation, DNA damages during freeze-drying and storage were evaluated by TUNEL, which showed that the medium containing trehalose and EGTA stored for 3 months at 4°C had lower apoptotic sperm than the media containing FCS (Fig.4).

The spermatozoa agglomeration observed in the medium with EGTA, in spite not to be explained, hindered the manipulation in ICSI, but did not interfere in the results. Therefore, nucleus functionality of freeze-dried spermatozoa evaluated by ICSI corroborated the structural evaluation by TUNEL, showing that sperm lyophilized with media containing EGTA and trehalose had higher rates of decondensing sperm head, pronucleus formation and blastocysts (Table 2 and 3). These results suggested that both solutions may conserve bovine sperm viability more adequately during freeze-drying process. However, the mechanism and function of these solutions in protecting the spermatozoa are not clear.

In regard to EGTA, which is a calcium chelator, it is believed that it either prevents or decreases the activity of calcium-dependent endonucleases [15] by limiting the availability of the circulating calcium. This way, the use of EGTA is recommended to avoid chromosome breakage due to inhibition of the endonucleases [22]. Trehalose, on the other hand, is a disaccharide of glucose

found, frequently, in many organisms that are able to survive under complete dehydration, a phenomenon known as anhydrobiosis [16,23]. It is hypothesized that during sperm freeze-drying, trehalose binds to the sperm membranes and turn them into more stable structures with low molecular mobility, which would confer a longer biological stability. Another possibility to explain the stabilization, raised by Blanquet et al [24], is that trehalose could replace the water and cause stabilization due to the formation of hydrogen bridges with components of the cells when the water is removed. For those reasons, trehalose has been used with success to protect liposomes [25], bacteria [26], yeast [27], retroviruses [28] , proteins [29], chromatin [30], and cell lines in vitro [31-33]. It is possible that during sperm freeze-drying process, trehalose binds to the sperm membranes and forms a stable component with low mobility, which would be responsible for the longer biological stability.

In conclusion, we demonstrated that the medium TCM 199 with Hanks salts supplemented with FCS and 0.2 M of trehalose and the medium containing EGTA solution were more efficient in avoiding damages to the sperm cell structure, specially the nuclei, of bovine sperm from Nelore breed. Therefore, it became clear that the medium used for freeze-drying process affects directly sperm nuclear integrity. Considering the benefic effects of trehalose and EGTA, it is possible that the association of both would confer even a better protection to sperm during the freeze-drying and especially during storage, by avoiding chemical reactions responsible for injuries to the DNA.

Acknowledgements

The authors thank Embrapa Genetics Resources and Biotechnology, CNPq and FINEP for the financial support.

19. References

- [1] Keskindepe L, Pacholczyk G, Machnicka A, Norris K, Curuk MA, Khan I, Brackett BG. Bovine blastocyst development from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. *Biol Reprod* 2002;67:409-15.
- [2] Kusakabe H & Kamiguchi Y. Chromosomal integrity of freeze-dried mouse spermatozoa after ¹³⁷Cs gamma-ray irradiation. *Mutat Res* 2004;556:163-8.
- [3] Polge C, Smith AU, Parkes AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature. *Nature* 1949;164:666-7.
- [4] Goodrich RP, Sowemimo-Coker SO, Zerez CR, Tanaka KR. Preservation of metabolic activity in lyophilized human erythrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:967-71.
- [5] Wakayama T, Yanagimachi R. Development of normal mice from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. *Nat Biotechnol* 1998;16:639-41.
- [6] Kwon IK, Park KE, Niwa K. Activation, pronuclear formation, and development in vitro of pig oocytes following intracytoplasmic injection of freeze-dried spermatozoa. *Biol Reprod* 2004;71:1430-6.
- [7] Critser JK, Huse-Benda AR, Aaker DV, Arneson BW, Ball GD. Cryopreservation of human spermatozoa. I. Effects of holding procedure and seeding on motility, fertilizability, and acrosome reaction. *Fertil Steril* 1987;47:656-63.
- [8] Liu JL, Kusakabe H, Chang CC, Suzuki H, Schmidt DW, Julian M, Pfeffer R, Bormann CL, Tian XC, Yanagimachi R, Yang X. Freeze-dried sperm

- fertilization leads to full-term development in rabbits. *Biol Reprod* 2004;70:1776-81.
- [9] Oates RD, Lobel SM, Harris DH, Pang S, Burgess CM, Carson RS. Efficacy of intracytoplasmic sperm injection using intentionally cryopreserved epididymal spermatozoa. *Hum Reprod* 1996;11:133-8.
- [10] Wakayama T, Whittingham DG, Yanagimachi R. Production of normal offspring from mouse oocytes injected with spermatozoa cryopreserved with or without cryoprotection. *J Reprod Fertil* 1998;112:11-17.
- [11] Kaneko T, Whittingham DG, Yanagimachi R. Effect of pH value of freeze-drying solution on the chromosome integrity and developmental ability of mouse spermatozoa. *Biol Reprod* 2003;68:136-9.
- [12] McGinnis LK, Zhu L, Lawitts JA, Bhowmick S, Toner M, Biggers JD. Mouse sperm desiccated and stored in trehalose medium without freezing. *Biol Reprod* 2005;73:627-33.
- [13] Cormier N, Sirad MA, Bayley JL. Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. *J Androl* 1997;18:461-8.
- [14] Parrish JJ, Krogenaes A, Susko-Parrish JL. Effect of bovine sperm separation by either swim-up and percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. *Theriogenology* 1995;44:859-69.
- [15] Kusakabe H, Szczygiel MA, Whittingham DG, Yanagimachi R. Maintenance of genetic integrity in frozen and freeze-dried mouse spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:13501-6.
- [16] Crowe JH, Crowe LM, Carpenter JF, Prestelski SJ, Hoekstra FA. Anhydrobiosis: cellular adaptations to extreme dehydration. In: W.H. Dantzler

- (Ed.), Comparative Physiology, Handbook of Physiology, Oxford University Press, Oxford. Vol II. 1997:1445-77.
- [17] Hirabayashi M, Kato M, Ito J, Hochi S. Viable rat offspring derived from oocytes intracytoplasmically injected with freeze-dried sperm heads. *Zygote* 2005;13:79-85.
- [18] Yanagimachi R. Stability of the mammalian sperm nucleus. *Zygote* 1994; 2:383-4.
- [19] Ward WS. The structure of the sleeping genome: implication of sperm DNA organization for somatic cells. *J Cell Biochem* 1994;55:77-82.
- [20] Ward WS, Zalensky AO. The unique complex organization of the transcriptionally silent sperm chromatin. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1996;6:139-47.
- [21] Perreault SD, Barbee RR, Elstein KH, Zucker RM, Keefer CL. Interspecies differences in the stability of mammalian sperm nuclei assessed in vivo by sperm microinjection and in vitro by flow cytometry. *Biol Reprod* 1988;39:157-67.
- [22] Szczygiel MA, Moisyadi S, Ward WS. Expression of foreign DNA is associated with paternal chromosome degradation in intracytoplasmic sperm injection-mediated transgenesis in the mouse. *Biol Reprod* 2002;68:1903-10.
- [23] Crowe JH, Hoekstra FA & Crowe LM. Anhydrobiosis. *Annu Rev Physiol* 1992;54:579-99.
- [24] Blanquet S, Garrait G, Beyssac E, Perrier C, Denis S, Hebrard G, Alric M. Effects of cryoprotectants on the viability and activity of freeze dried

- recombinant yeasts as novel oral drug delivery systems assessed by an artificial digestive system. *Eur J Pharm Biopharm* 2005;61:32-9.
- [25] Crowe LM, Crowe JH, Rudolph A, Womersley C, Appel L. Preservation of freeze dried liposomes by trehalose. *Arch Biochem Biophys* 1985;242:240-47.
- [26] Conrad PB, Miller DP, Cielenski PR, de Pablo JJ. Stabilization and preservation of *Lactobacillus acidophilus* in saccharide matrices. *Cryobiology* 2000;41:17-24.
- [27] Leslie SB, Teter SA, Crowe LM, Crowe JH. Trehalose lowers membrane phase transitions in dry yeast cells. *Biochim Biophys* 1994;1192:7-13.
- [28] Bieganski R, Fowler A, Morgan JR, Toner M. Stabilization of active recombinant retroviruses in an amorphous dry state with trehalose. *Biotechnol Prog* 1998;14:615-20.
- [29] Kaushik JK, Bhat R. Why is trehalose an exceptional protein stabilizer? An analysis of the thermal stability of proteins in the presence of the compatible osmolyte trehalose. *J Biol Chem* 2003;278: 26458-65.
- [30] Gilles R, Bourdouxhe-Housiaux C, Colson P, Houssier C. Effect of compensatory organic osmolytes on resistance to freeze-drying of L929 cells and of their isolated chromatin. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 1999;122:145-55.
- [31] Crowe JH, Tablin F, Wolkers WF, Gousset K, Tsvetkova NM, J. R. Stabilization of membranes in human platelets freeze-dried with trehalose. *Chem Physiol of Lipids*. 2003;22:41-52.
- [32] Guo N, Puhlev I, Brown DR, Mansbridge J, Levine F. Trehalose expression

confers desiccation tolerance on human cells. *Nat Biotechnol* 2000;18:168-71.

[33] Puhlev I, Guo N, Brown DR, Levine F. Desiccation tolerance in human cells.

Cryobiology 2001;42:207-17.

CAPÍTULO QUARTO

20. DISCUSSÃO GERAL E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A estabilização das células por liofilização tem sido um dos maiores objetivos da criobiologia por muitas décadas, mas o sucesso desta técnica tem sido limitado (Crowe et al., 2001). No entanto, o conhecimento obtido a partir do estudo da biologia molecular tem mudado este contexto. Dentro desta nova realidade, células somáticas, como os fibroblastos já foram conservados adequadamente por liofilização por algumas semanas (Chen et al., 2001). Além disso, espermatozóides de camundongos, ratos e coelhos também já foram conservados por liofilização e descendentes foram produzidos através da reprodução assistida.

Alguns grupos têm tentado conservar espermatozóides bovinos através da liofilização, devido a grande praticidade e economia que esta tecnologia poderia trazer para a reprodução desta espécie de grande interesse mundial. Desde a década de 50 que a liofilização espermática tem sido testada para conservar espermatozóides de bovinos e humanos (Shermann, 1954 a, b). No entanto, somente em 2002 surgiu um único trabalho descrevendo a viabilidade de espermatozóides liofilizados bovinos para produzir embriões.

Devido às limitadas informações da liofilização espermática nos bovinos, esta tese procurou avaliar mais profundamente o impacto desta tecnologia na viabilidade estrutural e funcional dos espermatozóides bovinos conservados com diferentes meios. Desta forma foram testados os principais potenciais meios utilizados em camundongo, compostos de soro fetal e com a solução de EGTA.

Além disso, uma nova solução composta de trehalose 0,2 M foi testada para esta finalidade de proteção durante a liofilização. Este dissacarídeo da glucose tem despertado interesse, pois tem sido utilizado com sucesso para a liofilização de fibroblastos e para a congelação de espermatozóides de várias espécies.

Os conhecimentos gerados a partir das análises desta tese 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 (Figura 1 A), uma estrutura fundamental para fecundação. Estes 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 desta estrutura em camundongos. Em bovinos, não há descrição da avaliação desta estrutura após o processo liofilização.

A cauda espermática é outra estrutura que tem se separado da cabeça durante a liofilização de espermatozóides em outras espécies (Wakayama e Yanagimachi, 1998; Kwon et. al. 2004; Liu et. al., 2004), porém neste estudo não houve um destacamento (Figura 1b) maior que 8%, não havendo diferenças significativas entre os tratamentos. Este fato está ligado a proteção oferecida pelos meios e também diretamente relacionado com a estrutura do espermatozóide

bovino, que deve ter uma maior resistência nesta 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 desta 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 desta estrutura em relação ao processo de liofilização, porém uma possível explicação estaria relacionada com uma maior sensibilidade dos microtúbulos aos meios protetores. Os meios contendo trehalose e EGTA são meios hipertônicos e com pH alcalino, e estas características possa ter afetado esta estrutura.

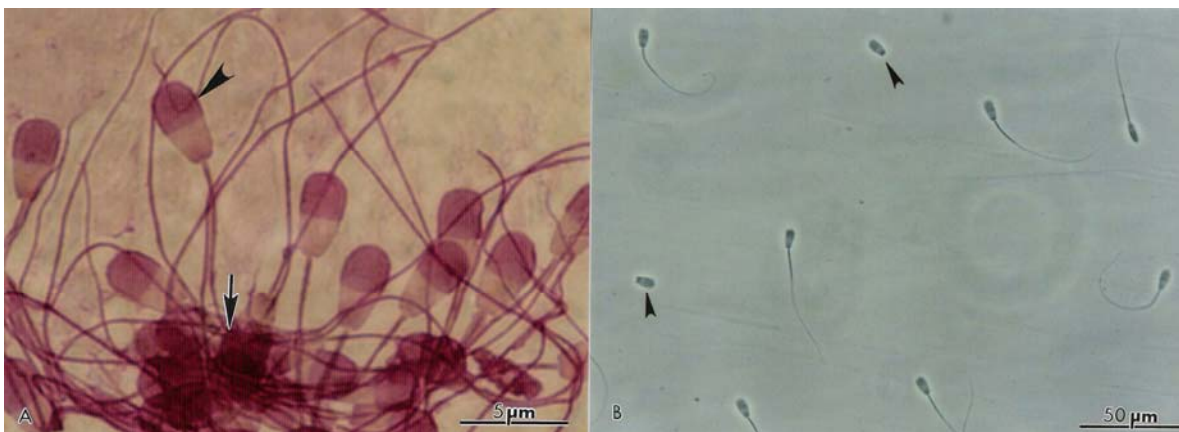


Figura 1: A - espermatozoides liofilizados com meio contendo EGTA, onde as setas indicam a retenção da estrutura acrossomal e uma aglomeração espermática típica desta solução de proteção. B - espermatozoides liofilizados com meio contendo trehalose, onde as setas indicam a separação da cauda de alguns espermatozoides.

O núcleo espermático foi melhor conservado quando as soluções com trehalose e EGTA foram utilizadas. A conservação dos espermatozoides bovinos com a presença de 0,2 M de trehalose demonstrou que 95% dos espermatozoides 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. Ainda a trehalose também pode se ligar ao hidrogênio na porção polar das proteínas e lipídeos, evitando a ocorrência da fusão ou desnaturação. Neste trabalho, o meio com 0,2 M de trehalose não evitou os danos na membrana plasmática, no entanto, garantiu a estabilidade nuclear por proteger as proteínas nucleares, especialmente as protaminas da cromatina.

A solução de EGTA tem sido o meio de eleição para liofilização de espermatozoides de camundongos (Szczygiel et.al., 2002). Os resultados desta tese com a solução de EGTA e a solução de trehalose são inéditos para os bovinos, sendo agora indicadas para a conservação nuclear dos espermatozoides desta espécie. Os resultados obtidos com a solução de EGTA em espermatozoides bovinos confirmam os resultados obtidos em camundongos (Kaneko et. al., 2003; Kusakabe e Kamiguchi, 2004). Esta solução tem se mostrado adequada para manutenção da integridade nuclear, pois confere proteção ao espermatozoide durante o processo de liofilização e especialmente após, pois tem importante função na inibição das endonucleases (Szczygiel et.al., 2002; Kusakabe e 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. Desta 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 TUNEL é extremamente mais sensível e confiável que AOT para esta finalidade. Estas 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 (Figura 2), 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 destas dificuldades, este trabalho de tese comprovou que os espermatozóides liofilizados bovinos apresentam o potencial de liberar seu material genético no citoplasma do ovócito e gerar desenvolvimento embrionário (Figura 3 a, b). Estas informações corroboram os dados obtidos por Keskinetepe 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 outro lado, os espermatozóides do tratamento com

soro fetal bovino e TCM 199 apresentaram as maiores taxas de fragmentação de DNA e o pior potencial de fecundação e desenvolvimento embrionário. Estes resultados confirmam os achados da avaliação de TUNEL, indicando que esta é uma técnica fundamental e indicada antes da ICSI para determinar o status do DNA espermático.



Figura 2: Figura representativa do processo de injeção intracitoplasmática convencional

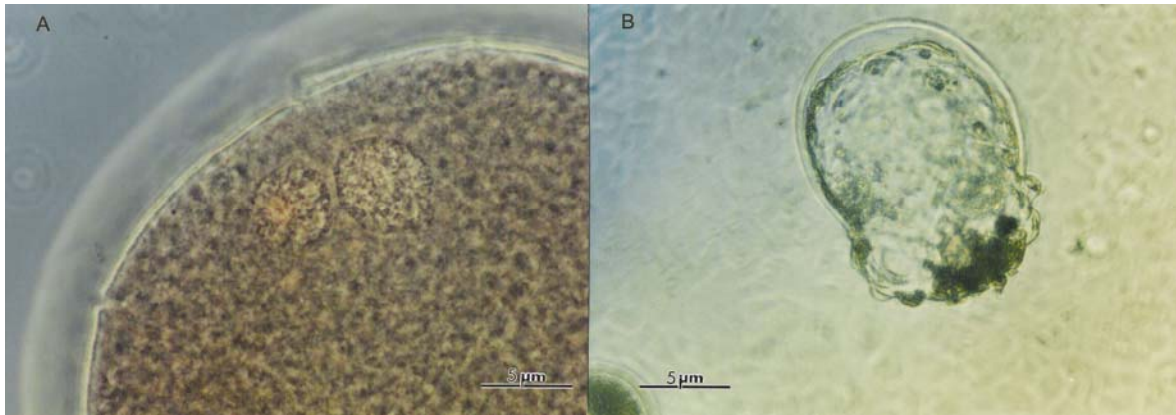


Figura 3: A-Formação de pró-núcleos; B-Formação embrionária após a ICSI com espermatozóides liofilizados.

Portanto, nesta tese, importantes informações foram conquistadas, 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 destas estruturas, não preservadas anteriormente, indica importantes conquistas na busca da preservação completa da estrutura e função dos espermatozóides.

Além disso, os melhores meios para proteção nuclear são os compostos pela trehalose e a solução de 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 pela 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 através das vibrações piezo-elétricas o espermatozóide liofilizado pode ser inserido no ovócito sem provocar lesões ao ovócito.

21. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Chen, T, Acker, JP, Eroglu, A, Cheley, S., Bayley, H, Fowler, A, Toner, M. Beneficial effect of intracellular trehalose on the membrane integrity of dried mammalian cells. *Cryobiology*, 2001 43:168-181.
- Crowe, JH, Crowe, LM, Oliver, AE, Tsvetkova, N, Wolkers, Tablin, F. The trehalose myth revisited: introduction to a symposium on stabilization of cells in the dry state. *Cryobiology* 2001; 43:89-105.
- Hirabayashi M, Kato M, Ito J, Hochi S. Viable rat offspring derived from oocytes intracytoplasmically injected with freeze-dried sperm heads. *Zygote* 2005; 13:79-85.
- Kaneko T, Whittingham DG, Yanagimachi R. Effect of pH value of freeze-drying solution on the chromosome integrity and developmental ability of mouse spermatozoa. *Biol Reprod* 2003;68:136-9
- Keskintepe L, Pacholczyk G, Machnicka A, Norris K, Curuk MA, Khan I, Brackett BG. Bovine blastocyst development from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. *Biol Reprod* 2002; 67: 409-415.
- Kusakabe H & Kamiguchi Y. Chromosomal integrity of freeze-dried mouse spermatozoa after ¹³⁷Cs gamma-ray irradiation. *Mutat Res* 2004; 556:163-8.
- Kwon IK, Park KE, Niwa K. Activation, pronuclear formation, and development in vitro of pig oocytes following intracytoplasmic injection of freeze-dried spermatozoa. *Biol Reprod* 2004; 71:1430-6.
- Liu JL, Kusakabe H, Chang CC, Suzuki H, Schmidt DW, Julian M, Pfeffer R, Bormann CL, Tian XC, Yanagimachi R, Yang X. Freeze-dried sperm

- fertilization leads to full-term development in rabbits. *Biol Reprod* 2004; 70:1776-81.
- Ock SA, Bhak JS, Balasubramanian S, Lee HJ, Choe SY, Rho GJ. Different activation treatments for successful development of bovine oocytes following intracytoplasmic sperm injection. *Zygote* 2003; 11: 69-76.
- Sherman, JK. Freezing and freeze-drying of human spermatozoa, *Fertil Steril*. 1954; 5: 357-371.
- Sherman, J.K. Freezing and freeze-drying of bull spermatozoa. *Fertil Steril* 1957; 190: 281-296.
- Szczygiel MA, Moisyadi S, Ward WS. Expression of foreign DNA is associated with paternal chromosome degradation in intracytoplasmic sperm injection-mediated transgenesis in the mouse. *Biol Reprod* 2002; 68:1903-10.
- Wakayama T, Yanagimachi R. Development of normal mice from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. *Nat Biotechnol* 1998; 16:639-41.
- Young KE, Robbins WA, Xun L, Elashoff D. Evaluation of chromosome breakage and DNA integrity in sperm: an investigation of remote semen collection conditions. *J Androl* 2003; 24: 853-61.