

CANCIMANSI, J.A.N., SILVA, J.F.S. e VAN TILBURG, M.F. Recipientes de armazenamento de sêmen congelado e seu efeito sobre a crio-sobrevivência espermática. **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 42, Ed. 147, Art. 986, 2010.



PUBVET, Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia.

Recipientes de armazenamento de sêmen congelado e seu efeito sobre a crio-sobrevivência espermática

Juli Angélica Narváez Cancimansi¹, José Frederico Straggiotti Silva², Mauricio Fraga Van Tilburg³

¹Mestranda em Ciência Animal, Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal (LRMGA), Centro de Ciência e Tecnologias Agropecuária (CCTA), Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF).

²Professor Doutor Associado, LRMGA, CCTA, UENF, Campos dos Goytacazes, RJ.

³Pos-doutorando, Departamento de Ciência Animal, Universidade Federal de Ceara, Fortaleza, CE.

Resumo

O crescente uso de sêmen criopreservado para inseminação artificial (IA), tem incentivado a procura e desenvolvimento de melhores crioprotetores, diluentes, protocolos de congelamento (taxas de resfriamento, congelamento e descongelamento) e recipientes de armazenamento, com o objetivo de manter as características seminais, garantindo assim a preservação e comercialização de um sêmen de ótimas condições, facilitando sua utilização em campo. Existem diferentes tipos de recipientes utilizados para o congelamento de sêmen, entres eles, as palhetas de 0,25mL e 0,5mL que apresentam uma boa transmissão de temperatura do exterior ao interior mas seu pequeno volume

CANCIMANSI, J.A.N., SILVA, J.F.S. e VAN TILBURG, M.F. Recipientes de armazenamento de sêmen congelado e seu efeito sobre a crio-sobrevivência espermática. **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 42, Ed. 147, Art. 986, 2010.

faz necessário a utilização de varias amostras para completar a dose inseminante; a maxi-palheta de 4 e 5 mL tem uma forma criobiologicamente inadequado, pois não permite uma transmissão uniforme de temperatura através da amostra, facilitando a recristalização e dano de espermatozóides. A utilização de *Flatpacks* para o congelamento de sêmen suíno tem mostrado melhores resultados de motilidade espermática e integridade de membrana pós-descongelamento do que os outros recipientes, isto provavelmente devido a uma melhor transmissão da temperatura e dissipação do calor através da amostra contribuindo a uma desidratação e formação de cristais de gelo mais homogênea.

Palavras-chave: sêmen, criopreservação, recipiente de armazenamento

Storage containers for frozen semen and its effect on sperm cryo-survival

Abstract

The increasing use of cryopreserved semen for artificial insemination (AI) has stimulated the demand and development of better cryoprotectants, diluents, freezing protocols (cooling, freezing and thawing rates) and storage containers, in order to keep the semen characteristics, thus ensuring the preservation and marketing of the sperm in optimal conditions, facilitating its use in the field. There are different types of containers used for freezing semen, such as 0.25mL and 0.5mL straws, presenting good transmission temperature from the outside to the inside, but its small volume makes it necessary to use various samples to complete the insemination dose; maxi-straws of 4 and 5 mL, have a cryobiologically unsuitable shape because they do not allow the transmission of a uniform temperature across the sample, facilitating the recrystallization and damage to the sperm. The use of *Flatpacks* for freezing boar semen has shown better results in sperm motility and membrane integrity post-thawing than other containers, probably due to the

better transmission of temperature and heat dissipation through the sample, contributing to dehydration and more homogeneous formation of ice crystals.

Keywords: semen, cryopreservation, storage container

INTRODUÇÃO

O crescente uso de sêmen criopreservado de garanhões para inseminação artificial (IA), tem incentivado o desenvolvimento de melhores crioprotetores, diluentes, protocolos de congelamento e recipientes de armazenamento, com o objetivo de manter as características seminais, garantindo assim a preservação e comercialização de um sêmen de ótimas condições. Depois do processo de congelamento, características seminais tais como motilidade, integridade e viabilidade diminuem, afetando a fertilidade e causando perdas econômicas. O desenvolvimento de novos recipientes de armazenamento objetiva preservar as características espermáticas pós-descongelamento e facilitar a utilização a campo deste sêmen congelado em função da relação dose/volume de forma a prescindir da necessidade de utilizar várias amostras de sêmen para completar uma dose.

O entendimento do mecanismo do congelamento da célula espermática e a formação de cristais de gelo que causam danos mecânicos têm levado ao melhoramento dos protocolos de criopreservação, em decorrência de pesquisa de crioprotetores menos lesivos ou combinações mais favoráveis entre eles (VIDAMENT *et al.*, 2002; HENRY *et al.*, 2002); adição de substâncias como insulina e aminoácidos ao meio crioprotetor seminal de garanhões (FAGUNDES, 2008) e utilização de diferentes tipos recipientes de armazenamento (EKWALLS *et al.*, 2007) que possam modificar a morfologia dos cristais. Segundo Eriksson e colaboradores (2000a), foi observado um efeito positivo sobre a motilidade progressiva e a integridade da membrana de espermatozoides congelados em um novo recipiente de armazenamento conhecido como *FlatPack* (recipiente plano) quando comparados com os tipos de envase tradicionais como as palhetas de 0,5 mL e 0,25 mL. Os

pesquisadores atribuem este efeito positivo a uma melhor desidratação e maior homogeneidade dos cristais, que esta estreitamente relacionada com a forma do recipiente utilizado no congelamento; este tipo de recipiente plano permite com maior facilidade a expansão do líquido por ser mais flexível do que as palhetas. É importante entender o mecanismo pelo qual as lesões do congelamento-descongelamento ocorrem no espermatozóide e também quais são os efeitos que causam os recipientes o qual é o objetivo deste trabalho de pesquisa.

Não entanto, existem diversos fatores que podem influenciar nos resultados de crio-sobrevivência; muitas pesquisas têm demonstrado que não existe o diluente ideal em equinos, em muitos casos, sêmen de um mesmo garanhão pode responder de diferentes formas ao processo de criopreservação numa mesma época de monta, pois as características desse sêmen variam dentro de um determinado lapso de tempo, podendo influenciar de forma positiva ou negativa a sobrevivência ou viabilidade pós-descongelamento, o que refletirá na porcentagem de prenhes e nos custos de produção de um haras. Segundo Graham (1996), a congelabilidade ruim dos espermatozóides pode ser melhorada pela alteração de alguma(s) etapa(s) do protocolo principal de criopreservação, demonstrando que é necessário reconhecer quais são as fases críticas do processo de criopreservação para cada um dos garanhões o qual é um ponto a favor. Confirmando este postulado, Holt (2000) afirmou que existem diferenças na composição lipídica da membrana espermática entre espécies, raça e até entre indivíduos da mesma espécie, sendo muito provável que esta seja a razão pela qual um mesmo diluente proporcione maior ou menor proteção aos espermatozóides de um indivíduo em particular.

1. CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN

A utilização do sêmen criopreservado equino oferece diversas vantagens para a equideocultura tais como permitir o melhoramento e difusão das raças

CANCIMANSI, J.A.N., SILVA, J.F.S. e VAN TILBURG, M.F. Recipientes de armazenamento de sêmen congelado e seu efeito sobre a crio-sobrevivência espermática. **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 42, Ed. 147, Art. 986, 2010.

atuais por meio da utilização de sêmen de garanhões de alta genética, que possa ser armazenado em baixas temperaturas por um grande período de tempo, sendo posteriormente utilizado e resulte em prenhes. Porém, existem grandes dificuldades para o sucesso do congelamento de sêmen equino, pois as técnicas de preservação em baixas temperaturas causam lesões estruturais e funcionais dos espermatozóides como consequência do estresse térmico, afetando sua fertilidade (MORTON e BRUCE, 1989; JASKO, 1994) e motilidade, em função do aumento de injúria na estrutura da membrana (QUINN *et al.*, 1969; NATH, 1972, citados por BYRNE *et al.*, 2000). A fertilidade do sêmen congelado é inferior a do sêmen fresco em programas de inseminação artificial na maioria das espécies e pode ser apenas parcialmente compensada, ao utilizar grandes concentrações de espermatozóides por dose inseminante (WATSON, 1995).

Segundo Eriksson e colaboradores (2002), os métodos correntes de congelamento e descongelamento não tem mostrados os melhores resultados. Quando uma amostra de sêmen é processada muitos espermatozóides viáveis se perdem durante o resfriamento, centrifugação, congelamento e descongelamento. No estudo feito por estes pesquisadores, eles constataram que em suínos a centrifugação pode produzir aproximadamente 20 a 25 % de perdas dos espermatozóides viáveis; esta perda é devida à força centrífuga aplicada às amostras que tem um efeito negativo sobre a viabilidade espermática.

Takamatsu *et al.* (1999) observaram a formação extracelular de cristais de gelo durante o congelamento de sêmen, sendo este o principal estresse físico verificado. Durante o congelamento formam-se canais, dentro dos quais todo o soluto e materiais em suspensão, incluindo células ficam concentrados. Com a subsequente redução da temperatura, as células são expostas de modo crescente a soluções concentradas, continuando até que a solução concentrada fique cristalizada ou vitrificada (MORRIS *et al.*, 1999).

Geralmente os protocolos de criopreservação são desenvolvidos com taxas de resfriamento lentas e conseqüentemente, a maior parte de água livre é retirada da célula e em ato contínuo, também de forma imediata, da solução, permanecendo no meio extracelular em forma de cristais de gelo (EKWALL *et al.*, 1997). Por isso, mais de 80% da água livre está presente nos cristais de gelo extracelulares, comprimindo fortemente os espermatozóides desidratados que encontram-se adjacente ao soluto, em canais estreitos com dimensões variáveis. Com isso, existe certa proporção de resíduo de água nesses canais que vão determinar como a alta concentração de soluto circundará o espermatozóide. De acordo com Hernández *et al.* (2007), a variação no tamanho desses canais pode estar relacionada à concentração do soluto (Figura 1).

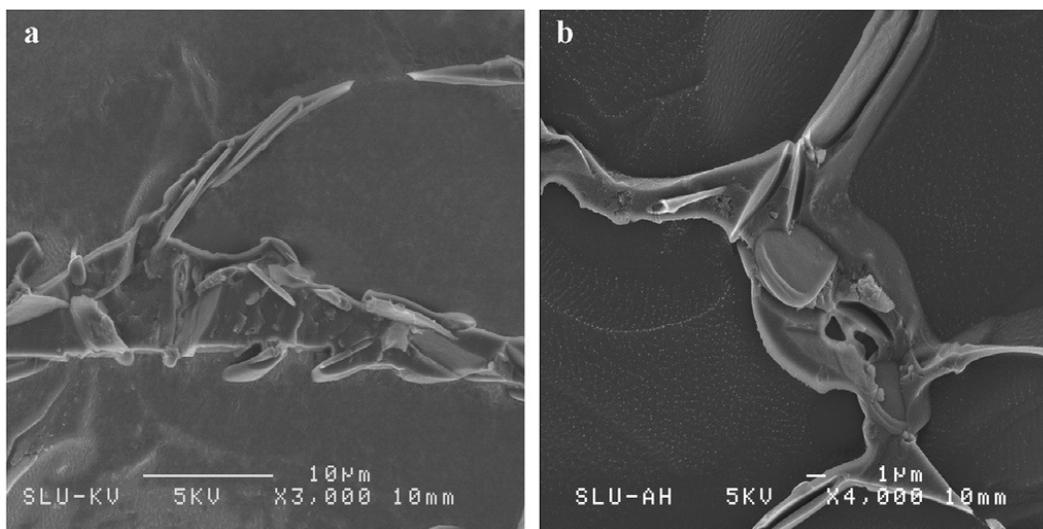


Figura 1. (a-b) Imagens (Microscópio Cryo-SEM) de amostras de espermatozóides suínos congelados em palhetas de 0,5ml. (a) A maioria dos espermatozóides estão localizados em canais de alta concentração de soluto que separa os cristais de gelo (3000x). (b) Imagem detalhada de uma célula espermática capturada pela matriz do diluente congelado (4000x), não sendo evidentes danos externos (HERNÁNDEZ *et al.*, 2007).

Os resultados de experimentos feitos por Mazur e colaboradores (MAZUR & COLE, 1989; SCHNEIDER & MAZUR, 1987; MAZUR, *et al.*, 1981) nos quais as células foram congeladas lentamente em soluções com osmolaridade iniciais

diferentes, mostram que durante o congelamento, em uma dada temperatura, a porcentagem relativa de fluido e gelo é uma função da osmolaridade inicial da solução; essa porcentagem foi chamada por eles "fração não congelada". Por meio desses experimentos eles mostraram que durante o congelamento lento, a sobrevivência celular, em qualquer temperatura é mais dependente da magnitude da fração não congelada do que da concentração de sais na solução extracelular. Segundo Mazur e seus colaboradores, isso demonstra que a dominância do mecanismo de danos durante o congelamento com baixas taxas de resfriamento é de natureza "reológica", relacionado com a interação entre célula na fração não congelada e gelo e esta é atribuída a força cortante do gelo ou deformidade da célula.

Uma particularidade da característica físico-química da água é sua tendência a se expandir quando congelada. Esse fenômeno de expansão é limitado pela palheta quando ocorre dentro da mesma. Como consequência de isso, os cristais de gelo extracelulares são empurrados em direção ao centro da palheta, causando ainda maior compressão às células que ficam nos canais. Courtens e Rety (2001) observaram maior número de lesões no acrossoma e membranas em espermatozoides de carneiros e varrões localizados no centro da palheta, mesmo não tendo sido observado cristais de gelo intracelulares quando congelados em palhetas convencionais.

A nucleação de gelo pode ocorrer próximo ao ponto de congelamento ou a mais de 10 a 20 °C abaixo dessa temperatura durante os métodos convencionais usados para o congelamento de sêmen (SONGSASEN *et al.*, 1997). Além disso, mesmo amostras com iguais condições de congelamento podem ter diferentes temperaturas de nucleação e estruturas diferentes de cristais de gelo quando a nucleação de gelo não for controlada (SEARLES *et al.*, 2001).

As estruturas dos cristais de gelo são essencialmente fixadas pela temperatura de nucleação do gelo em palhetas resfriadas abaixo do ponto de

congelamento (MORRIS *et al.*, 1999), o qual está relacionado com a recuperação das células no descongelamento, sendo considerado, portanto, o maior fator na variação entre mesmas amostras durante a criopreservação (WOELDERS *et al.*, 2005).

2. NUCLEAÇÃO DO GELO

Como a nucleação não é controlada, as mesmas amostras que são resfriadas como curvas idênticas apresentam diferenças entre se devido a diferentes temperaturas de nucleação e conseqüentemente diferentes estruturas de cristais de gelo (SEARLES *et al.*, 2001). Isso modifica a taxa de recuperação de células viáveis entre amostras de uma mesma partida seminal no descongelamento. Songsasen *et al.* (1997) e Woelders *et al.* (2005) sugeriram que a forma de controlar as diferentes temperaturas de nucleação e as diferentes estruturas de cristais de gelo em uma amostra é por meio do "seeding" que permite a indução da formação de cristais de gel extracelular depois de atingido o ponto de congelamento, eliminando, assim as arbitrariedades da nucleação do gelo e levando a condições de congelamento mais controladas. Nessas condições, as estruturas dos canais, usualmente, seguem um congelamento e solidificação linear da fração de gelo, resultando em um arranjo uniforme dos canais que parece ser benéfico para a crio-sobrevivência espermática (MORRIS *et al.*, 1999).

Hernandez *et al.* (2007) concordando com o exposto acima verificaram que o "seeding" em amostras de sêmen super-congeladas parece ser benéfico para a sobrevivência dos espermatozoides após o congelamento. Espermatozoides de humano foram congelados convencionalmente em grupos com e sem a nucleação do gelo induzida pelo "seeding". Houve um aumento significativo da motilidade espermática após o descongelamento no grupo induzido pelo "seeding" em relação ao grupo controle (MORRIS *et al.*, 1999). Kumar *et al.* (2003) constataram o efeito benéfico do "seeding" na sobrevivência espermática após o descongelamento de palhetas de 0,5 mL. O uso de glicerol como

crioprotetor, que aumenta a faixa de temperatura em que ocorre o super congelamento altera a morfologia do gelo de hexagonal para formas irregulares, sendo este outro fator que pode alterar a forma dos cristais de gelo (SEARLES *et al.*, 2001).

2.1 Cristais de gelo intracelular

Quando se utiliza um congelamento lento, uma grande quantidade de água migra do interior da célula até o meio extracelular, na tentativa de reverter os danos do efeito hipertônico da solução. Neste caso, é importante que o descongelamento seja também lento, para que os volumes de água sejam reequilibrados antes do completo descongelamento, evitando que grandes alterações do volume celular provoquem lesão da membrana espermática. Por outro lado se o congelamento se dá rapidamente não ocorre uma grande alteração no volume de água no interior da célula e microcristais de gelo serão ali formados (MAZUR, 1984).

2.2 Cristais de gelo extracelular

Se o congelamento ocorre rapidamente, o descongelamento deverá ser rápido, pois se este é realizado de forma lenta a água intracelular se descongela em um momento em que existe ainda temperatura baixa o suficiente para haver uma recristalização da água recém descongelada. Se isto acontecer, grandes cristais, como consequência da recristalização se formarão, expondo a célula ao risco de sofrer perfurações por estes grandes cristais de gelo (WATSON, 1995; HOLT, 2000).

3. INJÚRIAS FÍSICAS E QUÍMICAS DURANTE O CONGELAMENTO

É conhecido que o processo de criopreservação do sêmen causa danos subletais às células e subsequentemente reduz a fertilidade. A membrana plasmática serve como a principal barreira ao meio exterior e é o lugar primário de dano no congelamento-descongelamento. Entre os danos causados podem-se incluir desestabilização de membrana devido ao rearranjo dos

lipídeos; perda dos lipídeos a partir da membrana; e peroxidação dos lipídeos da membrana como resultado da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS). Segundo Holt (2000) esses eventos podem afetar a motilidade espermática, as respostas ao estresse mecânico e as vias de sinalização; como consequência a habilidade para atingir, ligar-se e reagir com a zona pelúcida são comprometidas.

Diferentes pesquisas na área da criobiologia são dirigidas com o fim de entender os mecanismos de danos celulares durante o congelamento e descongelamento. Tem-se aceito nesse campo que são dois os mecanismos pelos quais se produz dano celular: químico (consequente da desidratação celular durante o congelamento com baixas taxas de resfriamento) e físicos (pela formação de cristais de gelo intracelular durante o congelamento com altas taxas de resfriamento) (MAZUR, 1970). Lovelock (1953) demonstrou os danos celulares por mecanismo químicos através de estudos com hemácias expostas a soluções hipertônicas, durante o congelamento celular, ele observou que os danos ocorrem pela progressiva formação de gelo no meio exterior, com consequente aumento progressivo da concentração da solução extracelular. Os danos causados pela solução extracelular hipertônica poderiam ser químicos ou relacionados com a taxa de osmolaridade, influenciando o volume celular. (MERYMAN, 1971 e STEPONKUS & GORDON-KAMM, 1985).

A maior parte dos pesquisadores acredita que o mecanismo de danos durante o congelamento com baixas taxas de resfriamento está correlacionado com a formação de uma solução hipertônica extracelular, entretanto vários cientistas têm desafiado essa teoria. Na década de sessenta, Nei e colaboradores postularam que as células são danificadas por interação mecânica entre a fase de desenvolvimento dos cristais de gelo e consequentemente localização entre esses cristais (NEI, 1967; NEI & TANNO, 1968). Eles observaram que hemácias congeladas entre -2 e -10°C apresentaram uma alta taxa de hemólise em relação a hemácias expostas em concentrações similares de cloreto de sódio (NaCl) nestas temperaturas, mas na ausência de cristais de gelo extracelular (NEI & TANNO, 1968). Com essas

observações, Nei concluiu que os danos durante o congelamento lento não poderia ser atribuído apenas a exposição a altas concentrações de soluto e que os danos mecânicos são uma causa significativa de hemólise em hemácias.

Depois da invenção do criomicroscópio de solidificação direcional por Rubinsky (1985) se promoveram estudos para entender o mecanismo de danos durante o congelamento. Rubinsky e Lkeda (1985) concluíram que o gradiente de temperatura da interface de congelamento e a velocidade da interface de congelamento são as duas maiores variáveis térmicas fundamentais que compõem a "taxa de resfriamento" que é o parâmetro térmico comumente usado na criobiologia para correlacionar a viabilidade celular com o histórico térmico durante o congelamento. Com o uso do microscópio de solidificação direcional eles mostraram que variando a velocidade da interface de congelamento e o gradiente de temperatura é possível congelar células como várias taxas de resfriamento e consequentemente com diferentes morfologias de cristais de gelo. Beckman *et. al.* (1990) e Hubel *et. al.* (1992) mostraram que para uma mesma taxa de resfriamento a viabilidade celular pode variar com a morfologia dos cristais de gelo, implicando, portanto, no mecanismo de interação célula-gelo responsável pela lesão da célula durante seu congelamento.

Takamatsu e Rubinsky (1999) desenvolveram um procedimento experimental para estudar o efeito da compressão dos cristais de gelo na viabilidade celular. Utilizando células cancerígenas de adenoma primário de próstata humana mostraram que a viabilidade celular decrescia vertiginosamente quando as células eram comprimidas para 30% do seu tamanho original. Um simples modelo matemático mostrou que a temperatura no qual o efeito da compressão pode causar danos na célula está relacionada com o espaço entre os cristais de gelo.

4. TIPOS DE ENVASE

Desde que Merkt e Krause (1966) e Nagase *et al.*(1966) reportaram os primeiros casos de prenhes e nascimentos de produtos a partir da utilização de

sêmen processado em forma de *pellets* ou gotículas de sêmen diluído congelado sobre gelo seco, utilizando a técnica descrita por Nagase e Niwa (1964), a criopreservação de sêmen equino tem tomado maior importância. Na mesma década, Bader e Mahler (1968) e Oshida *et al.* (1968) registraram resultados utilizando a mesma técnica. Como consequência dos riscos de contaminação, dificuldade de identificação, armazenamento, manipulação e descongelamento dos *pellets*, esta técnica não foi utilizada com maior frequência (ERIKSSON e RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2000).

Na mesma década Knoop (1968) e Rajamanan *et al.* (1968) utilizaram ampolas de 10mL e Schafer e Baum (1968) de 100mL, como resultado foi observado que o congelamento de sêmen em grandes volumes estava relacionado com baixas porcentagens de sobrevivência espermática. Estes resultados incentivaram Ellery *et al.* (1971) a envasar 10mL de sêmen em sacolas plásticas de 5 por 15 cm, com uma espessura de aproximadamente 0,7mm. Este recipiente permitiu a otimização da relação volume/superfície melhorando as taxas de sobrevivências espermática; se convertendo assim no primeiro reporte de utilização de recipiente plástico plano (sacolas plásticas).

Uma grande relação de superfície:volume, é característico do recipiente de armazenamento plano (sacolas plásticas), este apresenta uma extensa superfície de contacto para armazenar um pequeno volume de sêmen (BWANGA *et al.* 1990). Tem se obtido aceitável motilidade e fertilidade pós-descongelamento, utilizando sacolas plásticas com volume de 5mL (LARSSON *et al.* 1976; BWANGA *et al.* 1991; MWANZA e RODRIGUEZ-MARTINEZ, 1993; citados por ERIKSSON e RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2000); mas no caso de sêmen suíno este deve ser re-diluído após o congelamento, para obter uma dose com volume ideal para a inseminação artificial, causando maiores lesões na membrana e diminuindo assim sua capacidade fertilizante (ORTMAN e RODRIGUEZ-MARTINEZ, 1994).

Em um estudo feito por Eriksson e Rodriguez-Martinez (2000a), foi congelado sêmen suíno, em sacolas plásticas grandes denominadas "cochettes" e maxi-palhetas, os resultados observados demonstraram que a motilidade pós-descongelamento nos "cochettes" foi melhor do que nas maxi-palhetas, mas em relação a integridade de membrana as maxi-palhetas demonstraram ser melhores do que os "cochettes". Eles atribuíram estes resultados a que os "cochettes" utilizados neste estudo eram muito flexíveis e dificultaram o esvaziamento total do ar, ficando preso dentro e impedindo o descongelamento rápido, o que favoreceu à re-cristalização de gelo, ou seja, a formação de novos cristais a partir de água em processo de descongelamento, lesando, assim, as membranas. Segundo eles, o procedimento de congelamento-descongelamento pode ser eficaz para manter a motilidade, mas pode não ser para manter a integridade da membrana, este devido possivelmente a que, tanto o compartimento da cabeça (relacionado à integridade de membrana plasmática e de acrossoma), quanto da peça intermédia e cauda (relacionado com motilidade) tem diferentes condições de congelamento e descongelamento.

O *FlatPack*, outro recipiente de armazenamento plano feito com plástico, foi desenvolvido por Eriksson e Rodriguez-Martinez (2000a). É uma sacola plástica plana, feita a partir de polietileno tereftalato (PET); suas dimensões são: 0,2mm de espessura, 30cm de comprimento e 22mm de largura; quando este é enchido com 5mL de sêmen, sua espessura chega a 1mm. O *FlatPack* foi utilizado para congelar sêmen suíno, contendo uma dose inseminante e por suas dimensões era de fácil armazenamento, pois este cabe em um caneco de um botijão convencional. Estes pesquisadores testaram e compararam diferentes taxas de congelamento e descongelamento em sêmen armazenado em maxi-palhetas e *Flatpacks*, avaliando sua influência sobre a motilidade e integridade de membrana; também foram monitoradas mudanças de temperatura intra-envase durante o congelamento e descongelamento. Eles observaram que os valores de motilidade, velocidade e deslocamento lateral de

cabeça dos espermatozoides congelados em *FlatPacks* foram superiores a aqueles que foram congelados em maxi-palhetas, também foi observado uma diferença substancial entre a temperatura intra-envase do centro e da periferia da maxi-palheta o que não aconteceu no *FlatPack*. Este melhoramento visto parece estar relacionado com a rapidez do congelamento-descongelamento e a homogeneidade da temperatura da amostra, não havendo diferenças de temperaturas dentro da mesma. Contrário a este, as diferenças de temperatura entre o centro e periferia da maxi-palheta no processo de congelamento e quase sempre durante o descongelamento, permitem a formação de gelo intra ou extracelular a partir de água já descongelada, evento conhecido como re-cristalização. A recristalização traz como consequência lesão de membranas (FISER e FAIRFULL, 1990) e formação de micro-cristais em mitocôndrias (COURTENS e PAQUIGNON, 1985), afetando a motilidade pós-descongelamento. Este fato foi observado nos espermatozoides congelados em maxi-palhetas (FISER e FAIRFULL, 1990).

O efeito mecânico que gera dano na criopreservação foi mostrado pela primeira vez por Nei (1967 e 1968) citado por Saragusty *et al.*, (2009), que comprovou que os cristais de gelo produziam dano celular por interação mecânica com as células que ficavam presas entre eles. Anos depois este postulado foi denominado a "hipótese da fração não congelada" (MAZUR, *et al.*, 1981). Os últimos estudos confirmam o anterior e concluem, que a diminuição no espaçamento entre os cristais podem realmente causar destruição celular (ISHIGURO e RUBINSKY, 1994; TAKAMATSU e RUBINSKY, 1999; citado por SARAGUSTY *et al.*, 2009). Saragusty e colaboradores (2009) mencionaram outros possíveis mecanismos de lesão que foram anteriormente pesquisados por outros autores, entre eles estão: O contato e interação entre o gelo e a bicamada lipídica (WOLFE e BRYANT, 2001), imersão das células pelo crescimento dos cristais em função da velocidade de congelamento e composição da solução (HUBEL *et al.*, 2007), e interação célula-célula

denominada como “efeito de envase” (PEGG e DIAPER, 1988; PEGG *et al.*, 1984).

A técnica de solidificação direcional utiliza o “seeding” para alcançar uma velocidade constante através de um gradiente de temperatura linear. Como consequência, o crescimento dos cristais de gelo pode ser controlado, melhorando sua morfologia. Um gradiente de temperatura linear se consegue utilizando uma grande superfície de armazenamento, pois esta permite que o calor seja eficientemente dissipado desde a amostra até o meio circundante, portanto o congelamento de grandes volumes minimiza o dano das células, mostrando melhores resultados em viabilidade, integridade de acrossoma e funcionalidade de membrana do que o tradicional congelamento em pequenos volumes (ARAV, 1999; ARAV *et al.*, 2002; SARAGUSTY *et al.*, 2007; citados por SARAGUSTY *et al.*, 2009). Em estudos feitos para comprovar o anterior postulado, eles introduziram pequenas esferas de vidro no recipiente de congelamento, para aumentar a superfície de contato dos espermatozóides, eles demonstraram que, a maior área de superfície com que as células entraram em contato, maior foi o dano, possivelmente porque as células ficaram comprimidas entre os cristais e a superfície. Em este mesmo estudo foi avaliada a pressão intra-envase e foi demonstrado que ao diminuir o volume em um recipiente rígido, a pressão intra-envase aumenta. Estes resultados podem explicar porquê menores concentrações de células em uma diluição e em recipientes mais flexíveis sobrevivem melhor ao congelamento (GIRAUD *et al.*, 2000, citado por SARAGUSTY *et al.*, 2009), ou porquê o congelamento em sacolas plásticas mais flexíveis, conhecidas como *FlatPacks* produzem melhores resultados do que o mesmo volume congelado em maxi-palhetas (EKWALL, 2009; ERIKSSON *et al.*, 2001). Estes resultados foram inicialmente observados em outro estudo feito por Eriksson e colaboradores (2002), os quais compararam a fertilidade de espermatozóides suínos congelados em *FlatPacks* com monta natural e inseminação artificial com sêmen refrigerado; os resultados sugeriram que este tipo de envase permite

CANCIMANSI, J.A.N., SILVA, J.F.S. e VAN TILBURG, M.F. Recipientes de armazenamento de sêmen congelado e seu efeito sobre a crio-sobrevivência espermática. **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 42, Ed. 147, Art. 986, 2010.

manter a viabilidade espermática pós-descongelamento e, além disso, que a taxa de fertilidade obtida com sêmen congelado neste tipo de envase é similar à obtida com monta natural e inseminação artificial com sêmen resfriado.

Segundo Ekwall *et al.* (2007), espermatozóides congelados em recipientes planos denominados como *MiniFlatPacks* mostraram maior motilidade linear pós-descongelamento do que aqueles que foram congelados em palhetas de 0,5 mL. Nesse mesmo estudo as amostras foram avaliadas mediante o uso de criomicroscopia eletrônica de varredura, observando-se grande cristais de gelo e canalículos aonde ficaram alojados os espermatozóides, solutos e criopreservantes. Os cristais de gelo encontrados no recipiente plano (*MiniFlatPacks*) eram mais homogêneos e de maior tamanho do que na palheta, o que indica que a desidratação neste foi mais homogênea, e que este fato está relacionado com uma melhor qualidade pós descongelamento. Na palheta se observou um padrão de formação de cristais de gelo com diferentes tamanhos, sendo de menor tamanho na periferia da palheta do que no centro, provavelmente, devido a uma rápida velocidade de congelamento que causaria uma grande formação de gelo intracelular nas células que ficam alojadas na periferia. Os espermatozóides que se acharam no centro da palheta apresentaram cristais de gelo na parte interior e exterior do acrossoma. A maioria dos acrossomas dos espermatozóides que estavam no centro da palheta foram destruídos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BADER, H.; MAHLER, R. Tiefgefrier- und besamungsversuche mit Hengstesperma unter Anwendung des Pelletverfahrens. *Zuchthyg.* 3, 6-13, 1968.

BECKMAN, J.; KORBER, CH.; RAU, G.; HUBEL, A.; CRAVALHO, E. G. Redefining cooling rates in terms of ice front velocity and thermal gradient: First evidence of relevance to freezing injury of lymphocytes. *Cryobiology* 27, 279-287, 1990.

BWANGA, C.O.; DE BRAGANCA, M.M.; EINARSSON, S.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Cryopreservation of boar semen in Mini- and Maxi-straws. *J. Vet. Med. A.* 37 (9), 651-658, 1990.

- CANCIMANSI, J.A.N., SILVA, J.F.S. e VAN TILBURG, M.F. Recipientes de armazenamento de sêmen congelado e seu efeito sobre a crio-sobrevivência espermática. **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 42, Ed. 147, Art. 986, 2010.
- BYRNE, G.P.; LORERGAN, P.; WADE, M.; DUFFY, P.; DONOVAN, A.; HANRAHAN, J.P.; BOLAND, M.P. Effect of freezing rate of ram spermatozoa on subsequent fertility in vivo and in vitro. *Anim. Reprod. Scien* v.62 p. 265-275, 2000.
- COURTENS, J.L.; PAQUIGNON, M. Ultrastructure of fresh, frozen and frozen-thawed spermatozoa of the boar. In: Johnson, L.A., Larsson, K. (Eds.), *Deep Freezing of Boar Semen*. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, pp. 61-87, 1985.
- COURTENS, J. L.; RETY, J. M. Numerical simulation for freezing and thawing mammalian spermatozoa. Evaluation of cell injuries at different depths in bags or straws during all steps of the technique, *Genet. Sel Evol.* V.33 p. 83-104, 2001.
- EKWALL, H.; ERIKSSON, B. M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Cryo-EM of frozen boar semen, Proc. of the Annual Meeting of the Royal Microscopy Society, "Low temperature microscopy and analysis, York, UK, pp. P-2, 1997.
- EKWALL, H.; HERNÁNDEZ, M.; SARAVIA, F.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Cryo-scanning electron microscopy (Cryo-SEM) of boar sêmen frozen in médium-straws and MiniFlatpacks. *Theriogenology* 67; 1463-1472, 2007.
- EKWALL, H. Cryo-scanning electron microscopy discloses differences in dehydration of frozen boar semen stored in large containers. *Reprod. Dom. Anim.* 44 (1):62-68, 2009.
- ELLERY, J.; GRAHAM, E.; ZEMJANIS, R. Artificial insemination of poney mares with semen frozen and store in liquid nitrogen. *Am. J. Vet. Res.* 32, 1963-1968, 1971.
- ERIKSSON, B. M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Deep-Freezing of Boar Semen in Plastic Film "Cochettes". *J. Vet. Med.* A 47, 89-97, 2000.
- ERIKSSON, B. M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Effect of freezing and thawing rates on the post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in FlatPacks and Maxi-straw. *Anim. Reprod. Sci.* 63, 205-220, 2000a.
- ERIKSSON, B.M.; VAZQUEZ, J.M.; MARTINEZ, E.A.; ROCA, J.; LUCAS, X.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Effects of holding time during cooling and of type of package on plasma membrane integrity, motility and in vitro oocyte penetration ability of frozen-thawed boar spermatozoa. *Theriogenology* 55(8):1593-1605, 2001.
- ERIKSSON, B. M.; PETERSSON, H.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Field fertility with exported boar sêmen frozen in the new FlatPack container. *Theriogenology* 58: 1065-1079, 2002.
- FAGUNDES, B. Adição de aminoácidos e insulina ao meio crioprotetor seminal de garanhões de raça Mangalarga Marchador. Tese (Doutorado em Produção Animal) – Campos dos Goytacazes – RJ. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 2008.
- FISER, P.S.; FAIRFULL, R.W. Combined effect of glycerol concentration and cooling velocity on motility and acrosomal integrity of boar spermatozoa frozen in 0.5 ml straws. *Mol. Reprod. Dev.* 25, 123-129, 1990.
- GRAHAM, J.K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. In *Diagnostic techniques and assisted reproductive technology*. Edited by E.L. Squires. *Vet. Clinic. N. Amer.*, 4 (2):131-147, 1996.

- CANCIMANSI, J.A.N., SILVA, J.F.S. e VAN TILBURG, M.F. Recipientes de armazenamento de sêmen congelado e seu efeito sobre a crio-sobrevivência espermática. **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 42, Ed. 147, Art. 986, 2010.
- HENRY, M.; SNOECK, P.P.N.; COTTORELLO, A.C.P. Post-thaw spermatozoa plasma membrane integrity and motility of stallion semen frozen with different cryoprotectants. *Theriogenology* 58; 245-248, 2002.
- HERNÁNDEZ, M.; EKWALL, H.; ROCA, J.; VAZQUEZ, J. M.; MARTINEZ, E.; MARTÍNEZ, H. R. Cryo-scanning electron microscopy (Cryo-SEM) of semen frozen in medium-straws from good and sub-standard freezer AI-boars. *Cryobiology*, v.54, p. 63-70, 2007.
- HOLT, W. V. Basic aspect of frozen storage of semen. *Anim. Reprod. Sci.* v.62, p.3-22, 2000.
- HUBEL, A.; CARVALHO, E. G.; NUNNER, B.; KORBER, C. Survival of directional solidified B-lymphoblasts under various crystal growth conditions. *Cryobiology* 29, 183-198, 1992.
- JASKO, D.J. Procedures for cooling and freezing of equine semen. *Ars Vet.*, v.10, p.156-65, 1994.
- KNOOP, C. E. Freezing equine semen for use in artificial insemination . 6.º Congr. Int. Repr. Anim. Insem. Artif. París. v.2, 1577-1580, 1968.
- KUMAR, S.; MILLAR, J.D.; WATSON, P. F. The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines, *Cryobiology* 46 p.246-253, 2003.
- LOVELOCK, J. E. The haemolysis of human red blood-cells by freezing and thawing. *Biochim. Biophys. Acta* 10, 414-426, 1953.
- MAZUR, P. Cryobiology: The freezing of biological systems. *Science* 68, 939-949, 1970.
- MAZUR, P.; RALL, W. F.; RIGOPOULOS, N. Relative contributions of the fraction of unfrozen water and of salt concentration to the survival of slowly frozen human erythrocytes. *Biophys. J.* 36, 653-665, 1981.
- MAZUR, P. Freezing of living cells – mechanisms and implications, *Am. J. Physiol.* 247 (3) C125-C142, 1984.
- MAZUR, P.; COLE, K. W. Roles of unfrozen fraction, salt concentration and changes in cell volume in the survival of frozen human erythrocytes. *Cryobiology* 26, 1-29, 1989.
- MERKT, H.; KRAUSE, D. Tiefgefrierung mit Equindsperma unter Anwendung des sog. Pelletverfahrens. *Dtsch. Tierarztl. Wschr.* 73, 276-278, 1966.
- MERYMAN, H. T. Osmotic stress as a mechanism of freezing injury. *Cryobiology* 8, 489-500, 1971.
- MORRIS, G. J.; ACTON, E.; AVERY, S. A novel approach to sperm cryopreservation. *Human Reproduction*. 14 no.4, 1013-1021, 1999.
- MORTON, D.B.; BRUCE, S.G. Semen evaluation, cryopreservation and factors relevant to the use of frozen semen in dogs. *J. Reprod. Fertil., suppl.*39, p.311-316, 1989.
- NAGASE, H.; NIWA, T. Deep freezing bull semen in concentrated pellet form. Proc. 5th Inst. Congr. Anim. Rep. A. I. Trento. v.1, 410-415, 1964.

CANCIMANSI, J.A.N., SILVA, J.F.S. e VAN TILBURG, M.F. Recipientes de armazenamento de sêmen congelado e seu efeito sobre a crio-sobrevivência espermática. **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 42, Ed. 147, Art. 986, 2010.

NAGASE, H.; SOEJIMA, A.; NIWA, T.; OSHIDA, H.; SAGARA, Y.; ISHIZAKI, N.; HOSHI, S. Studies on the freezing storage of stallion semen. I. Fertility results of stallion frozen semen in concentrated pellet form. *Jap. J Anim. Reprod.* 12, 48-51, 1966.

NEI, T. Mechanism of hemolysis of erythrocytes by freezing at near-zero temperatures. II. Investigations of factors affecting hemolysis by freezing. *Cryobiology* 4, 303-308, 1967.

NEI, T.; TANNO, K. The mechanism of hemolysis by freezing at near zero temperatures. III. Some aspects of factors affecting hemolysis. *Low. Temp. Sci. Ser. B* 26, 91-97, 1968.

ORTMAN, K.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Membrane damage during dilution, cooling and freezing thawing of boar spermatozoa packaged in plastic bags, *J. Vet. Med. A* 41, 37-47, 1994.

OSHIDA, H.; HORINCHIM, H.; TOMIZUKA, T. e NAGASE, H. Fertility of frozen stallion semen and some factors affecting to it. 6.º Congr. Int. Reprod. Anim. I. A. París. Vol. 2, 1597-1598, 1968.

RAJAMANAN, A.; ZEMJANIS, R. e ELLERY, J. Freezing and fertility studies with stallion semen, 6.º Congr. Int. Reprod. Anim. I. A. París. Vol. 2, 1601-1604, 1968.

RUBINSKY, B. Directional solidification for controlled freezing of biomaterials, *U. S. Patent 4531373*, July 30, 1985.

RUBINSKY, B.; IKEDA, M. A cryomicroscope using directional solidification for the controlled freezing of biological material. *Cryobiology* 22, 55-68, 1985.

SARAGUSTY, J.; GACITUA, H.; ROZENBOIM, I.; ARAV, A. Do Physical Forces Contribute to Cryodamage?. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 104, No. 4, 2009.

SCHAFFER, W.; BAUM, W. Use of deep frozen semen in horse artificial insemination. *Fortpfl. Bes. Aufzucht Haustiere* 4, 201-296, 1970.

SCHNEIDER, U.; MAZUR, P. Relative influence of unfrozen fraction and salt concentration on the survival of slowly frozen eight cell mouse embryos. *Cryobiology* 24, 17-14, 1987.

SEARLES, J. A.; CARPENTER, J. F.; RANDOLPH, T. W. The ice nucleation temperature determines the primary drying rate of lyophilization for samples frozen on a temperature-controlled shelf. *J. Pharm. Sci.* 90, 860-871, 2001.

SONGSASEN, N.; LEIBO, S. P. The ice nucleation temperature determines the primary drying rate of lyophilization for samples frozen on a temperature-controlled shelf, *Cryobiology* 35 p.240-254, 1997.

STEPONKUS, P. L.; GORDON-KAMM, W. J. Cryoinjury of isolated protoplasts: A consequence of dehydration or the fraction of suspended medium that is frozen. *Cryo-Lett.* 6, 217-226, 1985.

TAKAMATSU, H.; RUBINSKY, B. Viability of deformed cells. *Cryobiology* 39, 243-251, 1999.

VIDAMENT, M.; DAIRE, C.; YVON, J.M.; DOLIGEZ, P.; BRUNEAU, B.; MAGISTRINI, M.; ECOT, P. Motility and fertility of stallion semen frozen with glycerol and/or dimethyl formamide. *Theriogenology* 58; 249-251, 2002.

WATSON, P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.* V.7 p.871-891, 1995.

CANCIMANSI, J.A.N., SILVA, J.F.S. e VAN TILBURG, M.F. Recipientes de armazenamento de sêmen congelado e seu efeito sobre a crio-sobrevivência espermática. **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 42, Ed. 147, Art. 986, 2010.

WOELDERS, H.; MATTHIJS, A.; ZUIDBERG, C. A.; CHAVEIRO, A. E. Cryopreservation of boar semen: equilibrium freezing in the cryomicroscope and in straws. *Theriogenology* 63, 383-395, 2005.