PUBVET, Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia.

Efeito do álcool polivinílico na criopreservação de espermatozóides de ovinos

Carine Dahl Corcini [1,2*]; Antonio Sergio Varela Junior[3]; Raquel Schiavon Schiavon[2]; Gustavo Desire Antunes Gastal[2]; Karina Lemos Goularte [2]; Rafael da Rosa Ulguim [2]; Ivan Bianchi[2]; Thomaz Lucia Jr[2]

[1]Centro de Biotecnologia – Universidade Federal de Pelotas – UFPel/RS Campus Universitário – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900.

[2]Faculdade de Veterinária – Universidade Federal de Pelotas – UFPel/RS

[3]Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Rio Grande – FURG/RS UFPEL,

**corcinicd@gmail.com*

Resumo

O processo de criopreservação causa lesões nos espermatozóides de ovinos, por este motivo desenvolvimento de diluentes que incluam crioprotetores que minimizem estas lesões se justifica. Este trabalho objetivou avaliar à adição de álcool poliviliníco na composição de um diluente utilizado para congelamento do sêmen. Foram utilizados 6 carneiros SRD, totalizando 30 ejaculados. As amostras foram acondicionadas a 5°C com tris glucose e, somente após 1 hora, era acrescido 0,05% PVA. A motilidade espermática foi avaliada durante 30 minutos, em intervalos de 2,5 min entre cada análise. A comparação da motilidade em função do tempo foi realizada através da análise de variância de

Kruskal-Wallis. A motilidade observada em 2,5 min após a adição do PVA foi de 70,5% , após este período a motilidade foi decrescente. O tempo máximo de exposição ao PVA, antes do congelamento, seria de 5 minutos onde a motilidade foi de 46,5%. Portanto, é possível concluir que o tempo de exposição da célula espermática a um diluente contendo PVA na concentração de 0,05% não pode exceder 5 min, preservando dessa forma a qualidade seminal antes da criopreservação.

Palavras-chave: PVA, diluente, resfriamento, sêmen, ovino.

Effect of the polyvinyl alcohol on the cryopreservation of ram spermatozoa

Abstract

The cryopreservation process causes lesions in the ram spermatozoids, for this reason, the extenders development including cryoprotectors that reduce the lesions is warranted. This report had as goal to evaluate the add on of polyvinyl alcohol in the compositions of an extender used to freeze semen. It was used 6 SRD rams, in a total of 30 ejaculates. The samples were conditioned at 5°C with tris glucose and, only after 1 hour, it was added 0,05% PVA. The spermatic motility was evaluated during 30 minutes, in periods of 2,5 minutes among each analysis. The motility comparison by the time was done through the variance analysis of Kruskal-Wallis. The motility observed in 2,5 minutes after the PVA added was 70,5% , after this period the motility was decreasing. The maximum time of PVA exposition, before freeze, could be 5 minutes, where the motility was 46,5%. Therefore, it is possible to conclude that the exposition time of a spermatic cell in an extender with PVA in concentration of 0,05% cannot exceed 5 minutes, keeping this way the seminal quality before cryopreservation.

Keywords: PVA, extender, freeze, semen, ram

INTRODUÇÃO

O uso de sêmen congelado em programas de inseminação artificial (IA) contribui para a difusão do material genético de animais zootecnicamente superiores, em função de permitir o transporte e o armazenamento prolongado do sêmen (Donovan *et al.*, 2005). O processo de criopreservação de sêmen reduz a motilidade e a viabilidade espermática, após o descongelamento, devido à ocorrência de alterações estruturais e funcionais nos espermatozóides, especialmente na membrana plasmática (MP) (Hofmo & Almlid, 1991), acrossoma, peça intermediária e axonema (Salamon & Maxwell, 2000). Tais danos podem ser minimizados com a adição de substâncias crioprotetoras aos diluentes de sêmen, que protegem as células espermáticas durante o congelamento, reduzindo os danos provocados pela formação de cristais de gelo e alterações osmóticas (Gao & Critser, 2000). O glicerol é um dos crioprotetores mais usados, conferindo proteção contra a formação de cristais de gelo intracelulares, devido à sua capacidade de penetrar rapidamente na célula, no entanto, pode apresentar efeito tóxico para a célula espermática. Vários açúcares podem ser utilizados como crioprotetores, realizando a desidratação das células e inibição da formação de cristais de gelo, também interagindo com os fosfolipídeos da membrana celular, alterando a transição de temperatura da MP (De Leeuw *et al*., 1993).

O uso de um co-polímero de álcool polivinílico (PVA) vem abrindo novas perspectivas para o controle da formação de gelo intracelular durante a criopreservação (Wowk *et al.*, 2000). O PVA tem baixo peso molecular e apresenta a capacidade de diminuir a viscosidade e de tornar translúcida a solução crioprotetora, atuando como um bloqueador da formação de gelo intracelular. Ao contrário dos crioprotetores convencionais, que inibem o congelamento pela interação com a água, o PVA aparentemente age através do reconhecimento molecular direto dos núcleos de gelo (Yaghmour & Karlsson, 2002). Portanto, pequenas quantidades de PVA podem incrementar a vitrificação das soluções, sem efeito tóxico adicional, ou ainda reduzir as

exigências para crioprotetores convencionais, mantendo o tempo de vitrificação (Fahy *et al.*, 2004). Até o momento, não existem estudos sobre o uso de PVA na criopreservação de sêmen ovino e nem informações sobre seus potenciais efeitos tóxicos sobre a célula espermática. O objetivo deste trabalho foi avaliar a sensibilidade de espermatozóides ovinos à adição de PVA na composição de um diluente utilizado para congelamento do sêmen.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 6 carneiros sem raça definida (SRD), com aproximadamente 24 a 36 meses de idade, mantidos em grupo, sob condições ambientais semi-extensivas, em área da Universidade Federal de Pelotas. Foram coletados cinco ejaculados de cada macho (n = 30). As coletas de sêmen foram realizadas através de vagina artificial aquecida a 42°C, utilizando um copo coletor de vidro. O intervalo entre as coletas foi de 72 horas. Após a coleta de sêmen, foram avaliadas a motilidade espermática (0 – 100%) e o vigor (0 – 5), por microscopia óptica de contraste de fases, em aumento de 200 X (Bearden & Fuquay, 1997). Todas as avaliações de motilidade e vigor espermática foram efetuadas pelo mesmo técnico treinado e as amostras foram pré-incubadas a 37°C por 5 minutos em banho-maria. Somente foram utilizados ejaculados que apresentassem motilidade ≥ 80% e vigor ≥ 4.

Para a criopreservação do sêmen foi utilizado como diluente base o Tris Glucose (TG) (Iguer-Ouada & Verstegen, 2001), composto de: tris dihidroximetil aminometano (3,025g); ácido cítrico (1,70g); glicose (1,25g); benzilpenicilina (100mg); e sulfato de dihidroestreptomicina (100mg) e água destilada até completar 100 ml de diluidor. O pH foi ajustado em 6,8.

As amostras de sêmen foram diluídas na proporção de 1/5 (v/v) no diluente base TG em condições isotérmicas. Após a coleta e diluição inicial do sêmen, foi iniciada a curva de resfriamento. O sêmen permaneceu submerso em água a 20°C durante uma hora e, após, os mesmos eram colocados em geladeira a 5°C por uma hora.

Transcorrido este período, as amostras receberam a inclusão de PVA (Supercool X-1000®) com concentração final de 0,05%. O sêmen permaneceu 30 minutos em contato com o PVA a 5°C, durante este período em intervalos de 2,5 minutos era realizada a avaliação de motilidade e vigor espermática. A comparação da motilidade em função do tempo foi realizada através da análise de variância de Kruskal-Wallis, para dados não paramétricos utilizando o software Statistix, 2003®.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A motilidade espermática média, após a coleta, foi de 90,3%. Após a adição do D2, a motilidade decresceu rapidamente chegando a valores considerados inviáveis para conduzir o congelamento das amostras. Assim, o tempo de exposição ao PVA deve ser curto, para que este não provoque efeito tóxico sobre a célula espermática. O tempo máximo de exposição ao PVA, antes do congelamento, seria de 5 minutos. Nesse momento, a motilidade observada foi de 46,5%. Considerando que durante a criopreservação do sêmen ovino, 60-80% dos espermatozóides podem sofrer danos significativos. Não podemos utilizar sêmen com motilidade seja igual ou inferior a 50% antes do congelamento, pois o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal exige que a motilidade mínima pós-descongelamento para sêmen ovino é de 30%, indicando que o PVA deve ser colocado até 2,5 minutos antes do congelamento, pois, neste período, a motilidade observada foi de 68,3% (Figura 1).

Estudos prévios (Asada *et al*., 2002) demonstraram que a suplementação de PVA na concentração de 0,1% a solução de vitrificação de oócitos bovinos aumentou o índice de embriões em estágio de mórula. Porém, o mecanismo para entender a atividade do X-1000 em bloquear a formação de gelo, favorecendo os processos de criopreservação ou vitrificação, não está bem compreendido (Wowk, B. 2005). Ainda, segundo Choi *et al*. (2003), o PVA

foi superior ao BSA para capacitação e fertilização de espermatozóides eqüinos.

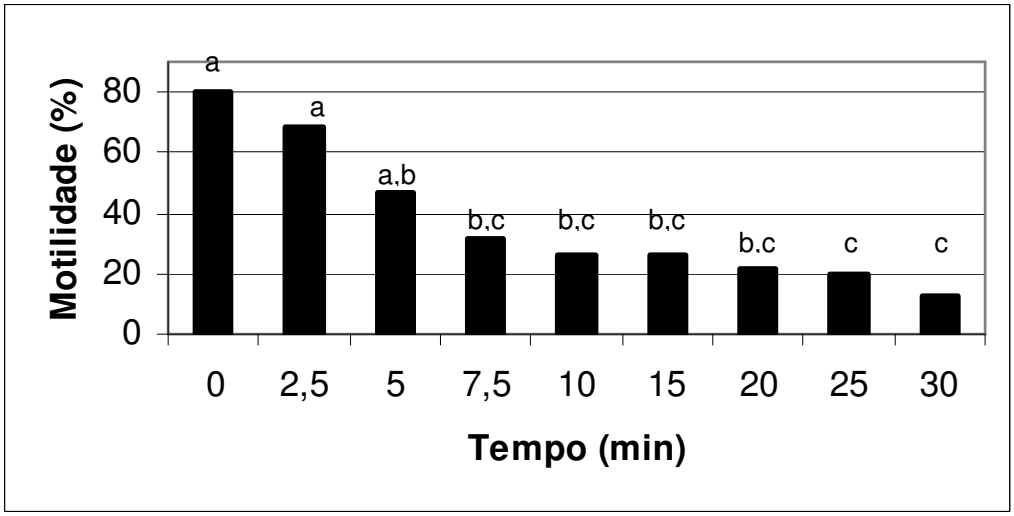

Figura 1: Motilidade espermática (%) em função do tempo de exposição ao crioprotetor PVA.
Expoentes diferentes indicam diferenças significativas (P < 0,0001).

Durante a criopreservação, a MP é desestabilizada, devido redução na temperatura e a elevação na concentração de sais, o que provoca alterações nos seus componentes lipídios, favorecendo o processo de apoptose. Anzar *et al* (2002) relatam que o uso de um diluente contendo glicerol, para congelamento de sêmen bovino, incrementou a taxa de ocorrência de apoptose em 40%, caracterizada por alterações na MP. Logo, a utilização do PVA seria uma alternativa para a criopreservação de sêmen em substituição ao glicerol.

CONCLUSÃO

Este estudo indica que o tempo de exposição da célula espermática a um diluente contendo PVA na concentração de 0,05% não pode exceder 5

minutos, pois, após este período, a motilidade espermática será reduzida a níveis inaceitáveis para a criopreservação do sêmen.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANZAR, M.; LIWEI, H.; BURH, M.M., KROETSCH T.G.; PAULS, K.p.; Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relationship with fertility. **Biology of reproduction,** v. 66, p. 354-360, 2002.

ASADA, M.; ISHIBASHI, S.; IKUMI, S.; FUKUI, Y. Effect os ploy vinyl alcohol (PVA) concentration during vitrification of in vitro matured bovine oocytes. **Theriogenology**, v.58, p. 1199-1208, 2002.

CHOI, Y.H.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; SEIDEL JR., G.E.; SQUIRES, E.L. Effect of capacitation of stallion sperm with polyvinylalcohol or bovine serum albumin on penetration of bovine zona-free or partially zona-removed equine oocytes. **Journal of Animal Science**, v.81, p. 2080-2087, 2003.

CORRÊA, M.N.; MEINCKE, W.; LUCIA, T. Jr.; DESCHAMPS, J.C. **Inseminação artificial em suínos**. Ed. Marcio Nunes Correa. Pelotas-RS, 2001.

CURRY, M.R. Cryopreservation of semen from domestic livestock. **Reprodustion** v. 5, p. 46-52, 2000.

DE LEEUW, F.E.; DE LEEUW, A.M.; DEN DAAS, J.H. *et al.* Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. **Cryobiology** v. 30, p. 32-44, 1993.

DONOVAN, A; HANRAHAN, J. P.; KUMMEN, E. *et al.* Fertility in the ewe following cervical insemination with fresh or frozen-thawed semen at a natural or synchronized oestrus. **Animal Reproduction Science**.vol.84, p. 359-368, 2004.

FAHY, G.M.; WOWK, B.; WU, J.; PAYNTER, S. Improved vitrification solutions based on the predictability of vitrification solution toxicity, **Cryobiology,** v. 48, p. 22–35, 2004.

GAO, D.; CRITSER, J.K. Mechanisms of cryoinjury in living cells. **Journal Institute for Laboratory Animal Research** v. 41, p. 187–196. 2000.

HOFMO, P. O.; ALMLID, T. Recent development in freezing of boar semen with special emphasis on cryprotectants**. Reproduction in Domestic Animals,** (Supp). 1, p. 111-122. 1991.

IGUER-OUADA, M.; VERSTEGEN, J.P. Long-term preservation of chilled canine semen: effect of commercial and laboratory prepared extenders. **Theriogenology.** v. 55, p. 671-684, 2001.

MCBEE. L., COTTERILL, O. Ion exchange chromatography and electrophoresis of egg yolk. **Journal of Food Science,** v. 44, p. 656-660, 1979.

MOUSSA, M.; MARINET, V.; TRIMECHE, A. *et al.* Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. **Theriogenology.** v. 57, p. 1695-1706. 2002.

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science,** v. 62, p. 77-111. 2000.

STATISTIX®. **Statistix® 8, Analytical Software**.

YAGHMOUR, S; KARLSSON, J.O.M. Effect of polyvinyl alcohol co-polymer on the nucleation and melting of ice, **Thirty-Ninth Annual Meeting of the Society for Cryobiology** - Abstrat**,** v. 45, p. 236. 2002

WOWK, B.; LEITL, E.; RASCH, C.M. *et al.* Vitrification enhancement by synthetic ice blocking agents **Cryobiology,** v. 40, p. 228-236, 2000.

WOWK, B. Anomalous high activity of a subfraction of polyvinyl alcohol ice blocker. **Cryobiology,** v. 50, p. 325-331, 2005.