

**AVALIAÇÃO DE UM MEIO HIPEROSMÓTICO A BASE DE TREALOSE,
ASSOCIADO OU NÃO AO QUELANTE DE CALCIO EDTA, PARA
CRIOPRESERVAÇÃO DO ESPERMATOZÓIDE OVINO**

“Evaluation of a trehalose based hyperosmotic extender, associated or not to the EDTA calcium chelator, for ram sperm cryopreservation”

“Evaluación de un medio hiperosmótico en base de trehalosa, asociado o no a lo quelante del calcio EDTA, para criopreservación del espermatozoide ovino”

**BITTENCOURT, Rodrigo Freitas¹; OBA, Eunice¹; VASCONCELOS, Marta Freitas³;
OLIVEIRA, Thiago Matos¹; BISCARDE, Carmo Emanuel Almeida¹; MARTINS,
Thiago; OLIVEIRA, José Vasconcelos Lima²; GUSMÃO, Alberto Lopes²; BICUDO,
Sony Dimas¹**

1- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP, Botucatu-SP, 18618-000, Brasil.

2- Escola de Medicina Veterinária – UFBA, Salvador-BA, 40170-110, Brasil.

3- Universidade de Brasília – UNB, Brasília-DF, 70910-900, Brasil.

rfbvet@yahoo.com.br

Resumo

Oito amostras de sêmen de quatro carneiros da raça Santa Inês foram submetidas à criopreservação, com o objetivo de estudar o efeito da adição da trealose (100mOsmol) (TRIS+TRE) a um diluidor a base de Tris-gema de ovo-glicerol (TRIS), associado ou não ao EDTA (TRIS+TER+EDTA), sobre a viabilidade espermática pós-descongelamento. Após a avaliação, as amostras de sêmen diluídas foram submetidas ao resfriamento a 5°C e congeladas em vapor de nitrogênio líquido. A descongelamento foi realizada em banho-maria à 37°C/50s e os parâmetros da cinética espermática avaliados pelo Hamilton Thorn Research. A viabilidade espermática foi observada através da associação das sondas fluorescentes iodeto de proprídio (IMP-integridade de membrana plasmática), JC-1 (PMM-potencial da membrana mitocondrial) e FITC-PSA (IAC-integridade acrossomal). Para a análise estatística foi empregado o pacote estatístico SAS (com $p < 0,05$). Os percentuais obtidos para motilidade total e progressiva à descongelamento foram, para o grupo TRIS: 73,8 e 52,6; TRIS+TRE: 52,6 e 15,1; TRIS+TRE+EDTA: 49,7 e 18,3. Estes valores foram significativamente superiores para o grupo TRIS em relação aos grupos que continham a trealose, assim como verificado com os parâmetros, velocidade progressiva, velocidade curvilínea, velocidade de trajeto, deslocamento lateral de cabeça, espermatozoides rápidos (%). Os índices IMP, PMM e IAC foram, para o grupo TRIS: 41,1; 31,3 e 69,48; TRIS+TRE: 33,96; 24,32 e 75,28; TRIS+TRE+EDTA: 28,25; 16,2 e 64,5. Estes valores não apresentaram diferença significativa entre os grupos estudados. Pode-se concluir, que a adição da trealose ao meio TRIS, associada ou não ao EDTA, não promoveu melhorias nas taxas de viabilidade espermática pós-descongelamento.

Palavras chave: Criopreservação, EDTA, ovino, sêmen, trealose.

Abstract

Eight semen samples of four rams of the Santa Inês breed were cryopreserved with the objective of verifying the trehalose addition effect (100mOsmol) to a Tris-egg yolk-glycerol

extender (TRIS), associated or not to EDTA, on the post-thaw sperm viability. After evaluation, the diluted semen samples were cooled to 5°C and frozen in liquid nitrogen vapour. The thawing was accomplished in water bath (37°C/50s) and the kinetic sperm parameters analyzed by Hamilton Thorn Research. The sperm viability was observed by using the multiple sperm parameter staining with propidium iodide (PMI, plasmatic membrane integrity), JC-1 (MMP, mitochondrial membrane potential) and FITC-PSA (ACI, acrosomal integrity). The statistical analyze was performed using the SAS software (with $p < 0.05$). The percentage of post-thaw total and progressive motility were for the TRIS: 73.8 and 52.6; TRIS+TRE: 52.6 and 15.1; TRIS+TRE+EDTA: 49.7 and 18.3. These values were greatest ($P < 0.05$) for the TRIS group in relation to trehalose ones, just as observed with the kinetic sperm parameters, progressive velocity, track speed, average path velocity, lateral amplitude of head and rapid spermatozoa percentage. The PMI, MMP and ACI rates (%) were for the TRIS group: 41.1; 31.3 and 69.48; TRIS+TRE: 33.96; 24.32 and 75.28; TRIS+TRE+EDTA: 28.25; 16.2 and 64.5. These values did not present difference ($P > 0.05$) among the groups. It can be concluded that the trehalose addition to the TRIS extender, associated or not to EDTA, did not promote the increase of the post-thaw sperm viability rates.

Key words: Crypreservation, EDTA, ovine, semen, trehalose.

1. Introdução

A trealose é um dissacarídeo, com atividade crioprotetora devido sua atividade desidratante e interação com as membranas celulares, além de exercer efeito antioxidante, minimizando as lesões espermáticas geradas pelo processo de criopreservação espermática (AISEN et al., 2005). A concentração de trealose no diluidor com melhores índices de viabilidade *in vitro* e fertilidade *in vivo* observados por Aisen et al. (2002) foi de 100mOsmol/L.

Trabalhos têm mostrado atividade sinérgica importante entre o EDTA e a trealose, com efeitos benéficos observados nas taxas de motilidade e preservação da morfologia espermática pós-descongelção (AISEN et al., 2000; BAKÁS e DISALVO, 1991).

A criopreservação do sêmen promove a elevação dos níveis de cálcio intracelular, o que resulta em disfunção e morte celular (AMANN e PICKETT, 1987). Assim, visando minimizar o efeito deletério do cálcio durante o processo de congelação, a partir da década de 1970 alguns pesquisadores passaram a empregar o etileno-diamino-tetra-acetato-dissódico (EDTA) em meios diluidores para a congelação de sêmen de diferentes espécies (MARTIN et al., 1979; BITTENCOURT et al., 2004; AISEN et al., 2005). Sua principal função seria quelar o cálcio no meio extracelular, diminuindo seu influxo para o meio intracelular, o que minimiza, o efeito deletério do cálcio sobre os espermatozóides (AMANN e PICKETT, 1987).

Em estudo com bovinos e bubalinos observou-se uma superioridade de 10-12% na taxa de motilidade espermática pós-descongelção com o diluidor que continha 0,1% de EDTA em sua composição, em relação ao diluidor que não o continha (DHAMI & SAHNI, 1993). Resultados semelhantes foram verificados na espécie caprina, cuja motilidade espermática na descongelção foi 10% superior no diluidor com o EDTA (0,1%) em sua composição (BITTENCOURT et al., 2004).

O objetivo deste estudo foi avaliar a adição da trealose (100mOsmol) a um diluidor a base de Tris-gema de ovo-glicerol (TRIS), associado ou não ao quelante de cálcio EDTA, sobre viabilidade do espermatozóide ovino pós-descongelção.

2. Materiais e Métodos

A solução de Tris-gema de ovo-glicerol foi o diluidor utilizado como base para os três grupos experimentais: Grupo 1: TRIS; Grupo 2: TRIS+TRE; Grupo 3: TRIS+TRE+EDTA. Aos diluidores TRIS+TRE foi adicionado 0,1% de EDTA e ao grupo TRIS+TRE+EDTA, além do EDTA, foi acrescentado 100Mosmol/L de trealose.

Oito amostras de sêmen de dois ovinos adultos, da raça Santa Inês, selecionados após a avaliação clínica e exame andrológico, foram utilizadas nesse experimento. Logo após as colheitas por vagina artificial, realizadas em dias alternados, o sêmen de cada reprodutor era encaminhado ao laboratório de processamento, mantido em banho-maria à temperatura de 35°C e avaliado quanto ao volume, cor, aspecto, motilidade total e progressiva, vigor, turbilhonamento e concentração. Também foram retiradas alíquotas do sêmen para avaliação dos defeitos espermáticos através de microscopia de contraste de fase com aumento de 1000x.

Após as avaliações iniciais e cálculo da concentração espermática, um total de 320×10^6 de espermatozoides com motilidade progressiva eram adicionados a tubos pré-aquecidos contendo 1mL de cada um dos três diluidores, compondo quatro doses inseminantes de 80×10^6 de espermatozoides com motilidade progressiva/0,25mL, para cada grupo experimental. O sêmen foi colhido através de vagina artificial e levado posteriormente para o laboratório de processamento. Após a realização da avaliação subjetiva (motilidade total, motilidade progressiva e vigor) e cálculo da concentração espermática, o sêmen foi diluído nos diferentes diluidores e envasado em palhetas de 0,25mL, com dose inseminante de 80×10^6 espermatozoides. Posteriormente, as amostras foram submetidas ao resfriamento a 5°C e, posteriormente, congeladas em vapor de nitrogênio líquido.

Após a descongelação, realizada em banho-maria à 37°C por 50 segundos, 90 dias depois da congelação, o sêmen foi diluído (1/20) em meio X-CELL (IMV, L'Aigle, França) e os parâmetros espermáticos analisados através do HAMILTON THORN RESEARCH (CASA), com a contagem mínima de quatro campos diferentes e mínimo de 300 células. As características avaliadas foram: as percentagens de espermatozoides com motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP) e de espermatozoides rápidos (RAP), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), deslocamento lateral de cabeça (ALH, μm), frequência de batimento flagelar (BCF, Hz), linearidade (%) e retilinearidade (%).

A análise da viabilidade espermática foi realizada através da coloração supra-vital (corante eosina) e pela microscopia com iluminação de epifluorescência, através da associação das sondas fluorescentes iodeto de proprídio (2 μl) (IMP, integridade de membrana plasmática), iodeto de 5,5',6,6'tetracloro-1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina - JC-1 (2 μl) (PMM, potencial de membrana mitocondrial) e aglutinina de Pisum sativum conjugada à fluoresceína de isotiocianato - FITC-PSA (25 μl) (IAC, integridade acrossomal). Para a análise estatística das características avaliadas, foi empregado o pacote estatístico Statistical Analysis System (SAS), versão 5.0 (1996), utilizando-se para análise descritiva o Procedimento MEANS e o Procedimento GLM, com o teste de Student Newman Keuls (SNK), para a comparação dos parâmetros espermáticos entre os diferentes grupos experimentais. O nível de significância empregado nas avaliações foi o de 5%.

3. Resultados

Através dos resultados obtidos pela análise computadorizada da cinética espermática (Tab.1), pode-se observar que a adição da trealose ao meio de congelamento, influenciou negativamente ($P<0,05$) a maioria dos parâmetros estudados, exceto BCF, STR e LIN.

Tabela 1. Médias e desvios-padrão dos parâmetros da cinética espermática pós-descongelamento, obtidos através da análise computadorizada, nos diferentes diluidores estudados (TRIS, TRIS+TRE e TRIS+TRE+EDTA).

PARÂMETROS (Média ± S)	TRATAMENTOS		
	TRIS	TRIS+TRE	TRIS+TRE+EDTA
MT (%)	73,87 ± 13,50 ^a	52,62 ± 10,04 ^b	49,75 ± 12,70 ^b
MP (%)	50,12 ± 11,86 ^a	15,12 ± 05,05 ^b	18,37 ± 07,32 ^b
VAP (µm/s)	146,76 ± 15,84 ^a	67,01 ± 07,59 ^b	80,97 ± 17,84 ^b
VSL (µm/s)	126,36 ± 15,31 ^a	58,42 ± 08,62 ^b	70,85 ± 16,45 ^b
VCL (µm/s)	234,05 ± 19,98 ^a	116,35 ± 07,81 ^b	134,87 ± 19,70 ^b
ALH (µm)	07,27 ± 00,61 ^a	04,90 ± 00,67 ^b	05,23 ± 00,41 ^b
BCF (Hz)	44,05 ± 01,71 ^a	42,51 ± 03,37 ^a	42,61 ± 02,54 ^a
STR (%)	83,37 ± 03,33 ^a	83,37 ± 02,66 ^a	83,62 ± 02,50 ^a
LIN (%)	54,37 ± 05,42 ^a	50,37 ± 03,92 ^a	52,12 ± 04,35 ^a
RAP (%)	63,50 ± 14,00 ^a	17,25 ± 04,65 ^b	21,75 ± 09,11 ^b

?Motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade progressiva (VSL), velocidade curvilínea (VCL), velocidade de trajeto (VAP), deslocamento lateral de cabeça (ALH), frequência de batimento flagelar (BCF), retilinearidade (STR), linearidade (LIN) e espermatozoides rápidos (RAP).

Valores seguidos de letras minúsculas distintas na mesma linha diferem entre si ($P<0,05$).

Esses resultados vão de acordo com resultado anterior observado por esta equipe (BITTENCOURT et al., 2007), cujos valores da MT, VCL e ALH foram inferiores ($P<0,05$) para o sêmen congelado em meio hiperosmótico a base de trealose, em relação ao meio isotônico (similar sem trealose). Este fato pode estar relacionado ao peso do meio diluidor hipertônico, que pode influenciar o deslocamento espermático, reduzindo os movimentos (ALH) e as velocidades dos movimentos (VAP, VSL, VCL). Dessa forma, os resultados das avaliações da cinética espermática ficam comprometidos no meio hipertônico, em relação aos meios isotônicos, usados mais comumente. Assim, essas diferenças podem não representar alterações espermáticas importantes, como as relacionadas à membrana plasmática ou às organelas, especialmente as mitocôndrias, responsáveis pelo metabolismo energético e que é uma das causas da redução verificada nos parâmetros da cinética espermática. Para tanto, é necessária a utilização de técnicas complementares que podem contribuir para esta conclusão, como a avaliação da integridade da membrana plasmática e do potencial mitocondrial, técnicas estas utilizadas no presente trabalho.

Também ficou evidenciado que a adição do quelante de cálcio EDTA ao meio com trealose (TRIS+TRE+EDTA) não promoveu melhorias nas taxas de cinética espermática pós-descongelamento, cujos resultados embora numericamente superiores (exceto para MT) aos obtidos com a trealose sozinha (TRIS+TRE), não representaram diferença significativa. E novamente, assim como observado com o meio TRIS+TRE, as médias dos parâmetros MT, MP, VAP, VSL, VCL, ALH e RAP foram inferiores às verificadas com o meio isotônico (TRIS).

Na Tab. 2 encontram-se os resultados encontradas para os parâmetros de viabilidade espermática, avaliadas através da coloração supra-vital e microscopia de fluorescência

Tabela 2. Médias e desvios-padrão dos parâmetros de viabilidade espermática pós-descongelamento, obtidos através da microscopia de epifluorescência (IMP, IAC e PMM) ou coloração supra-vital (EOS), nos diferentes diluidores estudados (TRIS, TRIS+TRE e TRIS+TRE+EDTA).

PARÂMETROS (Média ± S)	TRATAMENTOS		
	TRIS	TRIS+TRE	TRIS+TRE+EDTA
IMP	41,15 ± 15,32 ^a	33,96 ± 13,00 ^a	28,25 ± 11,96 ^a
IAC	69,48 ± 18,40 ^a	75,28 ± 11,02 ^a	64,5 ± 09,63 ^a
PMM	31,30 ± 28,84 ^a	24,32 ± 22,92 ^a	16,62 ± 20,02 ^a
EOS	57,08 ± 16,28 ^a	58,75 ± 10,37 ^a	54,87 ± 10,77 ^a

? Integridade de membrana plasmática (IMP) avaliada através da sonda fluorescente iodeto de proprídio, integridade acrossomal (IAC) verificada através glutinina de *Pisum sativum* conjugada à fluoresceína de isotiocianato - FITC-PSA, potencial da membrana mitocondrial avaliada através da sonda fluorescente iodeto de 5,5',6,6'tetracloro-1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina - JC-1.

Valores seguidos de letras minúsculas distintas na mesma coluna diferem entre si (P<0,05).

A partir dos resultados da Tab. 2 pode-se verificar a similaridade (P>0,05) das taxas de viabilidade espermática, entre os diluidores empregados, o que nos leva a concluir que os índices inferiores dos parâmetros da cinética dos espermatozoides ovinos, observados com os meios hiperosmóticos de trealose, não estão relacionados a alterações na membrana plasmática ou às mitocôndrias, o que comprometeria os mecanismos fisiológicos e metabolismo energético dos espermatozoides. Este fato reforça a justificativa do meio diluidor hipertônico exercer maior resistência aos espermatozoides e isto estaria representado pelas taxas inferiores das características relacionadas à cinética espermática.

Assim, os resultados obtidos neste estudo contradizem diversos relatos existentes na literatura científica que citam que a adição da trealose aos meios isotônicos a base de gema de ovo-glicerol, melhorou os índices de viabilidade espermática pós-descongelamento (AISEN et al., 2005; ABGOALA e TERADA, 2003; AISEN et al., 2000), fato este não observado neste estudo e em trabalho anterior da nossa equipe (BITTENCOURT et al., 2007). Provavelmente, variações nos protocolos de diluição, descongelamento e rediluição, composição do meio diluidor e concentração da trealose utilizada podem ser responsáveis pelas diferenças observadas entre este trabalho e os demais.

4. Conclusões

A adição da trealose ao meio tris-gema de ovo, sozinha ou associada ao quelante de cálcio EDTA, não melhorou os índices de viabilidade do espermatozóide ovino e ainda interferiu negativamente sobre os parâmetros da cinética espermática.

Novos estudos com a utilização da trealose são necessários, empregando metodologias alternativas para observação do seu efeito, sob condições diferentes.

5. Referências

ABOAGLA, E.M., TERADA, T. Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. **Biology of Reproduction**, v.69, p.1245–1250, 2003.

AISEN, E.G., QUINTANA, M., MEDINA, V., MORELLO, H., VENTURINO, A. Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose-based hypertonic extenders. **Cryobiology**, v.50, n.3, p.239-249, 2005.

AISEN E.G.; VENTURINO, A; MEDINA, V. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. **Theriogenology**, v.57, n.7, p.1801-1808, 2002.

AISEN E.G.; ALVAREZ, LA H.L.; VENTURINO, A; GARDE, J.J. Effect of trehalose and edta on cryoprotective action of Ram semen diluents. **Theriogenology**, v.53, p.1053-1061, 2000.

AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Principle of cryopreservation and a review of stallion spermatozoa. **Equine Veterinary Science**, v.7, n.3, p.145-174, 1987.

BAKÁS, L.S.; DISALVO, E.A. Effect of Ca²⁺ on the cryoprotective action of trehalose. **Cryobiology**, n.28, p.347-353, 1991

BITTENCOURT, R. F. ; BICUDO, S. D. ; PAPA, F.O. ; VASCONCELOS, Marta Freitas ; Siqueira, J.B. ; BISCARDE, Carmo Emanuel A ; RESENDE, José ; OBA, Eunice . Avaliação da congelabilidade do sêmen de carneiros e caprinos, criopreservado com um meio hiperosmótico a base de trealose. In: XXI REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 2007, Costa do Sauípe. Acta Scientiae Veterinariae. Porto Alegre : UFRGS, 2007. v.35. p.999-999.

BITTENCOURT, RF; RIBEIRO FILHO, A. DE L.; SANTOS, AD.F.; FURST, R; TEIXEIRA, RB.S.; CHALHOUB, M.; PORTELA, AP.; ALVES, S.G.G.; ALMEIDA, AK.; GUIMARÃES, J.D. Utilização de glicerol ou etilenoglicol como crioprotetores na congelação de sêmen caprino. **Ciência Animal Brasileira**, v.5, n.1, 2004.

DHAMI, A.J.; SAHNI, K.L.S.O. Effect of extenders, additives and deep freezing on the leakage of lactic dehydrogenase from cattle and buffalo spermatozoa. **Indian Journal of Animal Sciences**, v.63, n.3, p.251-56, 1993.

MARTIN, J.C.; KLUG, E.; GÜNZEL, A.R. Centrifugation of stallion semen and storage in large volumes straws. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v.27, p.47-51, 1979.