



CRIOPOLÍMERO: TOXIDADE A CÉLULA ESPERMÁTICA DE SUÍNOS

**SARA LORANDI SOARES¹, CARINE DAHL CORCINI², FRANCISCO NOE DA FONSECA³,
MARLI LUIZA TEBALDI⁴, THOMAZ LUCIA JUNIOR.²**

¹ Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) Pelotas/RS – Doutoranda em Biotecnologia, sara.lorandi@yahoo.com.br; ² Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) Pelotas/RS – Professor; ³ Embrapa Suínos e Aves – Concórdia/SC; ⁴ Universidade Federal de Itajubá – Professor

Resumo - Com o objetivo de avaliar a utilização do polímero PNVCL (N-vinilcaprolactama) quanto sua precipitação em temperaturas acima de LCST (temperatura crítica inferior de solubilização) e também sua toxicidade quando em contato com sêmen suíno. O PNVCL foi utilizado nas seguintes concentrações: T1 = 5000 mg/L; T2 = 2500 mg/L; T3 = 1250 mg/L; T4 = 625 mg/L; T5 = 312,5 mg/L; T6 = 156,3 mg/L; T7 = 78,1 mg/L; T8 = 39,1 mg/L e T9 = 0 mg/L. Quando colocado em contato com o sêmen os tratamentos foram constituídos de 500 µL de sêmen e 500µL do tratamento em questão. Os resultados demonstram que a utilização de concentrações elevadas do polímero acarreta a precipitação do mesmo prejudicando assim as variáveis de qualidade seminal. Entretanto o PNVCL não é tóxico em contato com a célula. Desta forma a utilização do polímero é viável, contudo em baixas concentrações.

Palavras chave - PNVCL, qualidade, viabilidade,

POLYMER: CELL TOXICITY SPERM OF SWINE

Abstract - An experiment was conducted to evaluate the use of PNVCL (N-vinylcaprolactan) polymer considering its precipitation at temperatures above LCST (critical temperature below solubilization) and also its toxicity when in contact with swine semen. PNVCL was used in the following concentrations: T1 = 5000 mg / L; T2 = 2500 mg / L; T3 = 1250 mg / L; T4 = 625 mg / L; T5 = 312.5 mg / L; T6 = 156.3 mg / L; T7 = 78.1 mg / L; T8 = 39.1 mg / L and T9 = 0 mg / L. When placed in contact with semen treatments it was made up of 500 uL of semen and 500µL of the treatment in question. The results demonstrate that the use of high polymer concentration causes precipitation, impairing the sperm quality variables. However the PNVCL is non-toxic in contact with the cell. It can be concluded that the use of the polymer is feasible, but in low concentrations.

Key words: PNVCL, quality, viability.

Introdução - Na espécie suína os processos que envolvem congelamento de células espermáticas são ineficientes quando comparado a refrigeração, isto ocorre devido a grande suscetibilidade das células durante sua criopreservação (GROSSFELD et al., 2008). Temperaturas inferiores a 15°C já acarretam consequências negativas a viabilidade espermática. Tendo a membrana espermática como o principal componente estrutural a sofrer estas consequências, possivelmente em decorrência de sua composição lipídica (BAILEY et al., 2008). Invariavelmente em todas as espécies e protocolos de congelamento de sêmen ocorre à adição de substâncias que recebem o nome de crioprotetores e estes desempenham a função de proteger as células dos danos causados pelas temperaturas baixas. Esta classe de substâncias pode ser dividida em duas: crioprotetores permeáveis e os crioprotetores não permeáveis (YOUNG et al., 1998). Polímeros termosensíveis podem ser utilizados como crioprotetores e pois apresentam característica de dissolverem-se em água fria, porém precipitam em temperaturas acima da temperatura crítica inferior de solubilização (LCST), abaixo desta temperatura a rede polimérica tende a ser hidrofílica, retendo água. Entretanto em temperaturas acima da LCST o inverso acontece, sendo que a rede polimérica se tornará hidrofóbica, expulsando as moléculas de água (VIHOLA et al., 2002). Como exemplo de polímero termosensível tem-se o monômero n-vinilcaprolactama. Este trabalho teve por objetivo avaliar a utilização de um polímero a base de n-vinilcaprolactama (PNVCL) quanto sua



precipitação em temperaturas próximas as de inseminação artificial em suínos e também sua toxicidade quando em contato com a célula espermática.

Material e Métodos - foram utilizados como doadores de sêmen 3 machos suínos. O sêmen foi obtido de acordo com o método de coleta da mão enluvada. Logo após a coleta o sêmen foi diluído na proporção de 1:1 com BTS e encaminhado ao laboratório. No laboratório as amostras foram submetidas aos tratamentos com o polímero PNVCL (1579 g/mol), que foram: T1 = PNVCL 5000 mg/L, T2 = PNVCL 2500 mg/L; T3 = PNVCL 1250 mg/L; T4 = PNVCL 625 mg/L; T5 = PNVCL 312,5 mg/L; T6 = PNVCL 156,3 mg/L; T7 = PNVCL 78,1 mg/L; T8 = PNVCL 39,1 mg/L; T9 = PNVCL 0 mg/L (controle). As avaliações foram realizadas no sistema CASA (Sperm Class Analyser[®], Microptic S.L. versão 3.2.0) e eram compostas de: motilidade total, motilidade progressiva, linearidade, velocidade curvilínea e velocidade média. Estas análises foram realizadas no tempo inicial e após 60 minutos de incubação a 38°C. As variáveis foram analisadas pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk, análise de variância (ANOVA) e comparação entre medias por Tukey. Para avaliação estatística foi utilizado o programa computacional Statistix 9[®]. O nível de significância foi de $P < 0,05$.

Resultados e discussão - os resultados das variáveis analisadas estão demonstrados nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1 - Médias e erro padrão das variáveis no tempo inicial de acordo com o tratamento (TRAT) para a concentração do polímero (CONC), motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), linearidade (LIN), velocidade curvilínea (VCL) e velocidade média (VSL).

INICIAL						
TRAT	CONC (mg/L)	MT (%)	MP (%)	LIN (%)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	VSL (%)
1	5000	72,550 \pm 2,8153 a	57,402 \pm 4,1644 a	0,4162 \pm 8,957 bc	74,559 \pm 1,6161 b	31,587 \pm 1,2118 b
2	2500	72,962 \pm 1,2601 a	63,649 \pm 2,1029 a	0,4410 \pm 7,743 abc	85,645 \pm 1,9700 ab	38,028 \pm 0,7323 a
3	1250	68,462 \pm 0,7670 a	55,704 \pm 1,4520 a	0,4038 \pm 7,852 c	89,141 \pm 2,5814 a	36,474 \pm 1,2128 ab
4	625	67,870 \pm 1,7344 a	55,240 \pm 3,3035 a	0,4386 \pm 0,0142 abc	90,191 \pm 2,2021 a	40,369 \pm 1,9430 a
5	312,5	70,515 \pm 2,1419 a	59,694 \pm 2,9789 a	0,4633 \pm 0,0140 ab	83,137 \pm 1,5413 ab	38,745 \pm 1,1069 a
6	156,3	72,618 \pm 1,2858 a	66,183 \pm 1,5847 a	0,4848 \pm 0,0103 a	82,399 \pm 1,7367 ab	40,308 \pm 1,1336 a
7	78,1	69,690 \pm 1,2792 a	57,220 \pm 2,1073 a	0,4600 \pm 0,0131 ab	91,541 \pm 3,0392 a	42,081 \pm 1,2120 a
8	39,1	70,962 \pm 2,7258 a	59,417 \pm 2,9331 a	0,4419 \pm 0,0126 abc	85,979 \pm 3,0072 ab	38,166 \pm 1,3783 a
9	0	72,970 \pm 1,0550 a	63,732 \pm 1,6243 a	0,4324 \pm 8,840E-03 bc	91,620 \pm 3,3292 a	39,456 \pm 1,2396 a

a,b,c Letras distintas indicam diferença estatística nas colunas (ANOVA, $P < 0,05$).

De acordo com a tabela 1 pode-se perceber que no tempo inicial de contato e incubação das células espermáticas com o polímero não houve diferença significativa para motilidade total e progressiva. Já nos momentos iniciais os resultados demonstram que a inclusão do PNVCL nas maiores concentrações reduzem parâmetros como velocidade curvilínea, velocidade média e em consequência também a linearidade.

Observando a tabela 2 são percebidas diferenças significativas para motilidade total e progressiva de modo geral com elevação dos parâmetros de acordo com a redução da concentração do polímero na amostra. Possivelmente em consequência da temperatura houve precipitação do polímero e este provavelmente dificultou o deslocamento das células. Vihola et al., (2002) descreve que



temperaturas superiores a LCST tem como consequência a precipitação de polímeros termosensíveis. Novamente conforme a avaliação inicial (tabela 1), de modo geral com a redução da concentração do PNVCL ocorre melhoria nos parâmetros LIN, VCL e VSL.

Os resultados demonstram que a utilização do PNVCL não foi tóxica a célula espermática, contudo possivelmente em consequência da temperatura ocorreu a precipitação do polímero quando este se encontrava em concentrações elevadas, sendo esta precipitação reduzida conforme sua inclusão diminuía.

Tabela 2 - Médias e erro padrão das variáveis no tempo 60 minutos, de acordo com o tratamento (TRAT) para a concentração do polímero (CONC), motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), linearidade (LIN), velocidade curvilínea (VCL) e velocidade média (VSL).

60 MINUTOS						
TRA T	CONC (mg/L)	MT (%)	MP (%)	LIN (%)	VCL (µm/s)	VSL (%)
1	5000	64,375 ± 1,8484 a	47,806 ± 2,6781 b	0,4915 ± 0,0232 a	60,419 ± 3,0201 b	29,280 ± 1,2771 d
2	2500	60,969 ± 3,8305 ab	48,925 ± 4,3890 b	0,4962 ± 0,0185 a	65,681 ± 3,3331 ab	32,134 ± 1,1439 cd
3	1250	50,508 ± 2,9977 b	33,512 ± 2,4148 c	0,4800 ± 0,0171 a	68,479 ± 2,7639 ab	33,070 ± 1,6438 bcd
4	625	62,357 ± 3,8137 ab	47,453 ± 3,7319 b	0,4948 ± 0,0208 a	65,084 ± 5,5423 ab	30,490 ± 1,5711 cd
5	312,5	64,000 ± 3,2957 a	50,926 ± 2,8274 ab	0,5248 ± 0,0221 a	77,666 ± 4,2579 ab	39,455 ± 0,9059 ab
6	156,3	64,680 ± 3,1174 a	53,105 ± 3,6703 ab	0,4862 ± 0,0129 a	70,806 ± 5,3466 ab	33,643 ± 1,8793 abcd
7	78,1	62,834 ± 2,2938 a	52,404 ± 1,9543 ab	0,5286 ± 0,0187 a	71,861 ± 6,1501 ab	36,381 ± 1,9720 abc
8	39,1	65,720 ± 1,3708 a	56,863 ± 1,5950 ab	0,5224 ± 0,0176 a	76,883 ± 4,2519 ab	39,642 ± 1,6330 a
9	0	71,051 ± 1,4284 a	60,660 ± 1,2342 a	0,5024 ± 0,0130 a	80,167 ± 3,2434 a	39,212 ± 0,8473 ab

a,b,c Letras distintas indicam diferença estatística nas colunas (ANOVA, P<0,05).

Conclusões - neste trabalho pode-se concluir que a PNVCL não é tóxica para a célula, contudo deve ser utilizada em concentrações inferiores obtendo assim parâmetros melhores de qualidade espermática.

Referências bibliográficas

- BAILEY, J.L., LESSARD, C., JACQUES, J., BREQUE, C., DOBRINSKI, I., ZENG, W., GALANTINO-HOMER, H.L., 2008. Cryopreservation of boar semen and its future importance to the industry. *Theriogenology* 70, 1251–1259.
- GROSSFELD, R., SIEG, B., STRUCKMANN, C., FRENZEL, A., MAXWELL, W.M., RATH, D., 2008. New aspects of boar semen freezing strategies. *Theriogenology* 70, 1225–1233.
- VIHOLA, H.; LAUKKANEN, A.; HIRVONEN, J.; TENHU, H. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, V. 16, p. 69-74, 2002.
- YOUNG, E.; KENNY, A.; PUIGDOMENECH, E.; VAN THILLO, G.; TIVERON, G.; PIAZZA, A. Human oocyte cryopreservation and pregnancy. *Fertil Steril Suppl*, v.70, S16, 1998.