

# Efeito da Inclusão de Colesterol após Criopreservação do Sêmen Caprino sobre a Funcionalidade da Membrana Espermática

Effect of Inclusion of Cholesterol after Cryopreservation of Semen on the Functionality of the Goat Sperm Membrane

---

*Carina da Silva Oliveira<sup>1</sup>, Elenice Andrade Moraes<sup>2</sup>*

## Resumo

Objetivou-se avaliar a funcionalidade da membrana após o descongelamento dos espermatozoides de machos caprinos tratados com colesterol pelo teste hiposmótico (HOST). Trinta ejaculados de reprodutores caprinos foram coletados e divididos em sete alíquotas iguais, centrifugados a 800 G/10min e o pelete ressuspensionado com diluente Tris. Em cada tubo, foi adicionada uma concentração de colesterol carregado pela ciclodextrina (CCC): 0; 0,75; 1,5; 3,0; 4,5; 6,0 ou 7,5mg de CCC/120x10<sup>6</sup> espermatozoides/mL por 15 minutos, e depois refrigerados a 4°C/2h. As amostras foram diluídas com Tris-Gema de ovo-glicerol (2%), envasadas em palhetas (0,5 mL), colocadas sob vapor de N<sub>2</sub> líquido a 5 cm da superfície por 20 minutos e, depois, estocadas. O descongelamento foi realizado em banho-maria a 37°C/30s. O HOST foi realizado incubando 0,1 mL de sêmen em 1,0 mL de solução de sacarose 150 mOsmol a

---

<sup>1</sup>Bolsista PIBIC Facepe, Petrolina, PE.

<sup>2</sup>Zootecnicista, D.Sc. em Reprodução Animal, professora da Universidade Federal do Vale do São Francisco (Univasf), Petrolina, PE, [elenice.moraes@univasf.edu.br](mailto:elenice.moraes@univasf.edu.br).

37 °C/30min. As células foram classificadas quanto à presença ou não de cauda dobrada. A variável foi avaliada por ANOVA. Os valores encontrados de caudas dobradas nas amostras, após o descongelamento, foram inferiores aos encontrados por outros autores que não trataram o sêmen com colesterol antes do protocolo de congelamento. A adição de colesterol no sêmen antes do congelamento não promoveu melhoria da qualidade da membrana espermática quando avaliada pelo HOST.

**Palavras-chave:** espermatozoides, esteroide, membrana, permeabilidade.

## Introdução

O processo de criopreservação causa danos irreversíveis na membrana de espermatozoides da espécie caprina. Parte desses danos ocorre por causa de alterações na membrana pela mudança do estado líquido para o estado gel, quando a temperatura é reduzida para temperaturas abaixo da fase de transição (WATSON, 1981). Uma maneira de evitar esses danos é aumentando a fluidez da membrana a baixas temperaturas através da adição de colesterol à mesma (PURDY; GRAHAM, 2004). Diversas substâncias adicionadas ao sêmen a fresco são utilizadas com o objetivo de proteger os espermatozoides contra os efeitos deletérios do resfriamento a temperaturas críticas. A substância atualmente utilizada em procedimentos de resfriamento do sêmen de bovinos e equinos é a ciclodextrina carregada com colesterol, que proporciona resultados variados em relação à motilidade e reação acrossômica (AMORIM et al., 2009; MOORE et al., 2005).

As características espermáticas como a concentração, motilidade e morfologia são insuficientes para o diagnóstico de fertilidade, a não ser que, individualmente, sejam muito diferentes dos valores da normalidade para a espécie. A habilidade do teste hiposmótico em avaliar a integridade funcional da membrana plasmática o torna um teste complementar importante na avaliação *in vitro* do sêmen congelado, uma vez que tanto o congelamento quanto o resfriamento podem levar a efeitos deletérios sobre a membrana.

Com este estudo, objetivou-se avaliar a funcionalidade da membrana após o descongelamento dos espermatozoides de machos caprinos tratados com colesterol antes do congelamento pelo teste hiposmótico.

## Material e Métodos

O experimento foi realizado no setor de caprinocultura da Universidade Federal do Vale do São Francisco (Univasf), situado no município de Petrolina, Pernambuco. A metil- $\beta$ -ciclodextrina foi carregada com colesterol como descrito por Purdy e Graham (2004). Utilizou-se sêmen de cinco reprodutores caprinos mestiços. Após a coleta, o sêmen fresco foi diluído com Ringer-Lactato e dividido em sete alíquotas iguais e centrifugadas a 800 G por 10 minutos (DELL'AGUA JÚNIOR; PAPA, 2001). Depois, o pelete foi ressuscitado com diluente Tris. A cada um dos sete tubos foi adicionada uma concentração de colesterol carregado pela ciclodextrina (CCC), sendo considerados os tratamentos (T): T1 = 0; T2 = 0,75; T3 = 1,5; T4 = 3,0; T5 = 4,5; T6 = 6,0 ou T7 = 7,5 mg de CCC/120x10<sup>6</sup> espermatozoides/mL.

Os espermatozoides foram expostos à CCC durante 15 minutos e depois refrigerados a 4°C/2h. Após esse período, cada amostra foi diluída com Tris-Gema de ovo-glicerol (2%), envasada em palhetas de 0,5 mL e colocada sob vapores de N<sub>2</sub> líquido a 5 cm de sua superfície por 20 minutos. Depois, as amostras foram mergulhadas em N<sub>2</sub> líquido e estocadas. O descongelamento foi feito em banho-maria a 37°C por 30 segundos e, em seguida, realizou-se o teste hiposmótico (HOST).

O HOST foi realizado incubando-se 0,1 mL de sêmen em 1,0 mL de solução de sacarose 150 mOsmol, a 37 °C/30 minutos. Foram contadas 100 células no aumento de 400 vezes em microscopia de contraste de fase e o cálculo de formas reativas seguiu a fórmula: HO = (% de alterações na região da cauda após teste HO) - (% de alterações na região da cauda antes do teste HO).

Para a análise estatística, as variáveis foram submetidas à análise de variância, aplicando-se o teste SNK a 5% de probabilidade. As variáveis que não atenderam às premissas de normalidade e homocedasticidade, mesmo após a transformação dos dados, foram submetidas ao teste de Kruskal-Wallis.

## Resultados e Discussão

A adição de 6 mg e 7,5 mg de colesterol no sêmen a fresco apresentou os melhores valores do HOST comparada ao controle e aos tratamentos

aditivos de colesterol (Tabela 1). Não foi observada diferença da adição de 6 mg e 7,5 mg com o controle ( $P < 0,05$ ) e as amostras tratadas com 1,5 mg, 3 mg e 4,5 mg de CCC (Tabela 1).

**Tabela 1.** Percentual de caudas dobradas após descongelamento de espermatozoides tratados ou não com colesterol em diferentes concentrações.

Tratamentos (CCC em mg)	% de Cauda dobrada
0 mg	17,60 <sup>ab</sup>
0,75 mg	17,80 <sup>ab</sup>
1,5 mg	16,40 <sup>c</sup>
3,0 mg	17,00 <sup>bc</sup>
4,5 mg	16,60 <sup>bc</sup>
6,0 mg	19,50 <sup>a</sup>
7,5 mg	18,50 <sup>a</sup>

<sup>a,b,c</sup> Médias seguidas de letras diferentes diferiram pelo teste SNK ( $P < 0,05$ ).

Os valores encontrados de caudas dobradas nas amostras após o descongelamento foram inferiores aos encontrados por outros autores que não trataram o sêmen com colesterol antes do protocolo de congelamento. Além disso, foi observado que a média de espermatozoides reativos ao HOST para o sêmen criopreservado foi inferior às observadas por Santos et al. (2006) que encontraram 36% e 39%, respectivamente, para caprinos jovens e adultos, e Fonseca et al. (2001) que constataram valor de 63% de caudas dobradas. Com base nos resultados obtidos, não foi constatado efeito benéfico na adição de colesterol no sêmen antes de realizar o protocolo de congelamento, ou seja, não houve melhora na qualidade da membrana espermática para resistência ao processo de congelamento e descongelamento sofrido pela célula espermática, quando avaliada pelo teste hiposmótico.

## Conclusão

A adição de colesterol antes do congelamento no sêmen não melhorou a qualidade seminal.

## Agradecimentos

À FACEPE, pela bolsa de iniciação científica, e à Universidade Federal do Vale do São Francisco, pelo apoio às atividades de pesquisa.

## Referências

AMORIM, E. A. M.; TORRES, C. A. A.; GRAHAM, J. K.; AMORIM, L. S.; SANTOS, L. V. L. The hypoosmotic swelling test in fresh rabbit spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, [Amsterdam], v. 111, n. 2, p. 338-343, 2009.

DELL'AQUA JÚNIOR, J. A.; PAPA, F. O. Efeito de diluente e da intensidade e tempo de centrifugação sobre os parâmetros espermáticos para congelamento de sêmen equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 25, n. 3, p. 460-462, 2001.

FONSECA, J. F.; TORRES, C. A. A.; SANTOS, A. D. F.; ROVAY, H.; BORGES, A. M.; BARBOSA, L. P.; MAFFILI, V. V.; FRAGA, D. B. M. Hypoosmotic swelling test in goat spermatozoa. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 25, n. 3, p. 436-438, 2001.

MOORE, A. I.; SQUIRES, E. L.; GRAHAM, J. K. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. **Cryobiology**, [Amsterdam], v. 51, p. 241-249, 2005.

PURDY, P. H.; GRAHAM, J. K. Effect of cholesterol loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. **Cryobiology**, [Amsterdam], v. 48, p. 36-45, 2004.

SANTOS, A. D. F.; TORRES, C. A. A.; FONSECA, J. F.; BORGES, A. M.; GUIMARAES, J. D.; COSTA, E. P.; ROVAY, H. Uso de testes complementares para avaliação do congelamento do sêmen de bodes submetidos ao manejo de fotoperíodo artificial. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 35, n. 5, p. 1.934-1.942, 2006.

WATSON, P. F. The effects of cold shock on sperm cell membranes. In: MORRIS, G. J.; CLARKE, A. (Ed.). **Effects of low temperatures on biological membranes**. New York: Academic Press, 1981. p. 189-218.