

## ADIÇÃO DE COLESTEROL CARREGADO COM CICLODEXTRINA AO SÊMEN OVINO NA CRIOPRESERVAÇÃO

*(Addition of cholesterol loaded with cyclodextrin  
to sheep semen in cryopreservation)*

Wildelfrancys Lima SOUZA<sup>1\*</sup>; Elenice Andrade MORAES<sup>2</sup>; Pedro Humberto  
Felix SOUZA<sup>3</sup>; Jarmerson Carvalho FERREIRA<sup>2</sup>; Thais Thatiane dos Santos  
SOUZA<sup>1</sup>; Raimundo Parente de OLIVEIRA<sup>4</sup>; Ricardo TONIOLLI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Reprodução Suína e Tecnologia de Sêmen da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará (UECE); <sup>2</sup>Universidade Federal do Vale do São Francisco; <sup>3</sup>Dpto de Tecnologia e Ciências Sociais da Universidade do Estado da Bahia; <sup>4</sup>Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Amazônia Oriental). \*E-mail: [wilde@zootecnista.com.br](mailto:wilde@zootecnista.com.br)

### RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito da adição de diferentes concentrações do colesterol carregado por ciclodextrina (CCC) sobre os espermatozoides congelados de ovinos. Foram coletados dois ejaculados de 10 carneiros (n=20) e diluídos em Tris-Gema de ovo até a concentração final de 200 x10<sup>6</sup> sptz/mL e mantidos em banho maria a 32 °C. O CCC foi adicionado: controle (0,0mg), 1,5mg, 3,0mg e 6,0mg de CCC/120 x10<sup>6</sup> sptz/mL. Após adição, o sêmen foi resfriado a 5 °C por duas horas, após esse período, envasado em palhetas de 0,5mL e então acondicionado sob vapor de nitrogênio líquido (N<sub>2</sub>L), a 8cm da lâmina líquida/15 minutos e depois imersos no N<sub>2</sub>L. As amostras foram analisadas quanto à motilidade espermática, integridade da membrana plasmática e da membrana acrossomal, atividade mitocondrial e teste de ligação. As variáveis foram submetidas à análise de variância e médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. O maior percentual de integridade da membrana plasmática, acrossomal e a maior atividade mitocondrial foram obtidos utilizando 6,0mg de CCC. A adição de 3,0mg de CCC manteve o percentual de motilidade espermática após a criopreservação, quando comparado aos demais tratamentos e controle. A adição de 1,5 e 3,0mg de CCC mantiveram o percentual de viabilidade espermática após a criopreservação acima de 65%. O número de espermatozoides com capacidade de ligação a membrana perivitelina da gema de ovo foi maior (p<0,05) no tratamento com 3,0mg de CCC. Concluiu-se que a adição de CCC ao sêmen diluído, nas concentrações avaliadas, melhora a qualidade espermática após descongelamento.

**Palavras-chave:** Congelamento, crioprotetor, espermatozoides.

### ABSTRACT

The objective was to evaluate the effect of adding different concentrations of cholesterol carried by cyclodextrin (CCC) on frozen ovine sperm. Two ejaculates were collected from 10 rams (n=20) and diluted in Tris-Yolk until the final concentration of 200 x10<sup>6</sup> sptz/mL was reached and kept in a water bath at 32 °C. The CCC was added: control (0,0mg), 1.5mg, 3.0mg, and 6.0mg of CCC/120 x10<sup>6</sup> sptz/mL. After the addition, the semen was cooled at 5 °C for two hours, after that period, filled in 0.5mL straws, and then conditioned under liquid nitrogen vapor (N<sub>2</sub>L), at 8 cm of the liquid/15 minutes, and then immersed in N<sub>2</sub>L. The samples were analyzed for sperm motility, plasma membrane and acrosomal membrane integrity, mitochondrial activity, and binding test. The variables were subjected to analysis of variance and means compared by Tukey's test at 5% probability. The highest percentage of plasma membrane integrity and the highest mitochondrial activity were obtained using 6.0mg of CCC. The addition of 3.0mg of CCC maintained the percentage of sperm motility after cryopreservation, when compared to other treatments and control. The addition of 1.5 and 3.0mg of CCC maintained the percentage of sperm viability after cryopreservation, above 65%. The count of sperm with ability to bind to the egg yolk perivitelline membrane was higher (p<0.05) with 3.0mg of CCC. It is concluded that the addition of CCC to the diluted semen, in the evaluated concentrations, improves the sperm quality after thawing.

**Key words:** Freezing, cryoprotectant, sperm.

## INTRODUÇÃO

A criopreservação do sêmen é uma tecnologia que permite a conservação por longos períodos e a distribuição ao redor do mundo de material genético valioso, sendo que, combinado com a inseminação artificial, a criopreservação do sêmen é o método mais rentável para estabelecimento de genes de interesse em uma população comparado à monta natural ou transferência de embriões (VISHWANATH, 2003). Porém, os processos de congelação/descongelação podem causar injúrias celular e molecular aos espermatozoides, as quais resultam em redução do potencial fecundante dos espermatozoides descongelados em comparação com o uso de sêmen fresco (BERNARDINI *et al.*, 2011).

Pesquisas têm demonstrado que a incorporação do colesterol na membrana espermática, protege a célula espermática durante o resfriamento, além de reduzir os danos celulares decorrentes da criopreservação (MORAES *et al.*, 2015; SOUZA *et al.*, 2016). Adicionalmente, o colesterol promove a estabilização e modulação da fluidez da membrana à temperatura corpórea (LEE *et al.*, 2015). Esses efeitos benéficos e protetivos devem-se ao fato de que o colesterol é essencial à membrana celular dos mamíferos, desempenhando um papel na homeostase celular (OGAWA e TANAKA, 2016).

O colesterol pode ser incorporado às membranas plasmáticas utilizando a ciclodextrina (ZIDOVETZKI e LEVITAN, 2007), caracterizada por ser um oligossacarídeo cíclico, capaz de inserir ou remover pequenas moléculas e possuir uma superfície externa hidrofílica e uma cavidade interna lipofílica (BANCHERO *et al.*, 2013). As membranas plasmáticas dos espermatozoides podem ter seu conteúdo de colesterol modificado usando o colesterol carregado com ciclodextrina (CCC), que promoverá um efluxo de colesterol que pode resultar em aumento da vida útil da célula espermática criopreservada (PURDY e GRAHAM, 2004). Essa tecnologia tem sido realizada em várias espécies com sucesso, tais como suína (MAO *et al.*, 2005), bovina (AMORIM *et al.*, 2009), caprina (SALMON *et al.*, 2016; SOUZA *et al.*, 2016) e equina (SOUZA *et al.*, 2018). Assim, o objetivo deste estudo foi analisar a eficácia da adição de diferentes concentrações do CCC sobre as células espermáticas no processo de congelação do sêmen ovino.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Local de execução

O experimento foi realizado durante os meses de maio a junho de 2019. Os animais ficaram alojados no setor de Ovinocultura e as avaliações espermáticas desenvolvidas no Centro de Pesquisa em Suínos, Espécies Nativas e Silvestre (CPSENS), ambos localizados no Campus de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Vale do São Francisco (Univasf), situados no município de Petrolina-PE (latitude 09°23'55" Sul e a uma longitude 40°30'03" Oeste). O presente estudo foi realizado após a aprovação institucional da Univasf, sob o protocolo nº 0002/150317, estando de acordo com os princípios éticos de experimentação animal adotados pelo Comitê de Ética e Deontologia em Estudos e Pesquisas da Univasf.

### Animais

Foram utilizados 10 carneiros adultos, sendo seis da raça Dorper e quatro da raça Santa Inês, com idade entre dois e três anos, selecionados por meio de exame andrológico,

apresentando características espermáticas acima dos padrões mínimos para a espécie, conforme estabelecido pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013).

### **Preparo do colesterol**

O CCC foi preparado como descrito por Moraes *et al.* (2010). Utilizou-se 200mg de colesterol que foram dissolvidos em 1mL de clorofórmio e 1g de metil- $\beta$ -ciclodextrina dissolvido em 2mL de metanol. Em seguida, alíquota de 0,45mL da solução de colesterol foi adicionada à solução de ciclodextrina e agitada até a combinação das soluções ficarem clara. A solução resultante foi colocada em placa de Petri de vidro e colocada para secar em placa aquecedora por 24 horas para remoção dos solventes. Logo após, os cristais resultantes foram estocados em tubos de vidro a 22 °C. A solução de trabalho de CCC foi preparada pela adição de 50mg de CCC em 1mL de Tris a 37 °C e homogeneizada por agitação com auxílio do agitador de tubos.

### **Coleta, processamento e descongelação do sêmen**

Foram coletados 2 ejaculados de cada carneiro (n=20), por meio de vagina artificial para ovinos. Após a coleta, o ejaculado foi mantido em banho maria a 32 °C, sendo subdivididos em seis tubos de ensaio e diluídos em Tris-Gema de ovo, para a concentração final de 200 x10<sup>6</sup> spz/mL e mantidos em banho maria a 32 °C.

Para determinação dos tratamentos experimentais, o CCC foi adicionado ao sêmen diluído, estabelecendo os tratamentos: controle (sem adição do CCC); 1,5mg de CCC; 3,0mg de CCC e 6,0mg de CCC/120 x10<sup>6</sup> spz/mL. Após adição do CCC, as amostras de cada tratamento foram colocadas em Becker de 100mL com água a 32 °C, ficando acima do volume das amostras, e então acondicionadas em câmara fria a 5 °C por duas horas. Depois, as amostras de cada tratamento foram envasadas em palhetas de 0,5mL e lacradas com seladora (UltraSeal<sup>®</sup>) e acondicionadas sob vapores do nitrogênio líquido, por 15 minutos, a 8 cm da lâmina líquida. Decorrido este tempo, as palhetas foram imersas no nitrogênio líquido e estocadas em botijão criogênico para posterior análise.

Após 24 horas de estocagem em botijão criogênico, duas palhetas com amostras de cada tratamento foram descongeladas a 37 °C durante 30 segundos, utilizando o descongelador automático (Cryofarm<sup>®</sup>, IMV, São Paulo, São Paulo, Brasil).

### **Análises do sêmen:**

#### **Motilidade espermática**

Amostras (duas palhetas/tratamento) descongeladas foram avaliadas quanto à motilidade espermática (total e progressiva) utilizando o CASA, conforme descrito anteriormente.

#### **Integridade da membrana plasmática**

A integridade da membrana plasmática dos espermatozoides descongelados foi realizada utilizando duas sondas fluorescentes, iodeto de propídio (IP) e Hoechst 33342 (H33342), conforme descrito por Graham *et al.* (1990). Brevemente, 10 $\mu$ L da amostra descongelada de cada tratamento foi colocado em microtubo (1,5mL), adicionado 2 $\mu$ L de cada

corante (IP e H33342) e, incubado por 8 minutos em banho maria a 37 °C. Após incubação foi colocado 10µL de cada amostra entre lâmina e lamínula pré-aquecidas a 37 °C para se avaliar a integridade da membrana plasmática dos espermatozoides utilizando microscópio de fluorescência (AXIO Image A2<sup>®</sup>, Carl Zeiss, Berlim, Alemanha), sendo classificado em espermatozoides com membrana plasmática: intacta (aqueles que apresentam o núcleo corado de azul) e lesada (aqueles que apresentam o núcleo corado de rosa). Para cada amostra analisada foi contado um total de 200 células em campos aleatórios.

### **Membrana acrossomal**

A integridade do acrossoma foi avaliada utilizando o fluorocromo (isotiocianato de fluoresceína – FITC), conjugado a uma lecitina (*peanut agglutinin* – PNA) e associado IP (SOUZA *et al.*, 2016). Assim, alíquota de 10µL da amostra descongelada de cada tratamento foi adicionada em microtubo (1,5mL) e, adicionado 10µL de cada corante (FITC-PNA e IP) e incubado por 20 minutos em banho maria a 37 °C. Após incubação, foi retirado 10µL e colocado entre lâmina e lamínula pré-aquecidas a 37 °C para avaliar a integridade da membrana acrossomal dos espermatozoides em microscópio de fluorescência (AXIO Image A2<sup>®</sup>, Carl Zeiss, Berlim, Alemanha).

Foram classificados os espermatozoides em: mortos com acrossoma intacto (quando corados de vermelho); mortos com acrossoma reagido ou danificado (quando corados de vermelho e com região acrossomal corada de verde); vivos com acrossoma intacto (quando não observados em fluorescência, apenas em campo claro); vivos com acrossoma reagido ou danificado (quando corados de verde). Para cada amostra analisada foi contado um total de 200 células em campos aleatórios.

### **Atividade mitocondrial**

A atividade mitocondrial (AM) foi determinada utilizando a sonda Rodamina 123 (R123), transportada e acumulada no interior das mitocôndrias com respiração ativa (mitocôndrias funcionais), emitindo fluorescência verde (GRAHAM *et al.* 1990).

Das amostras (duas palhetas) de cada tratamento descongeladas, alíquota de 10µL foram retiradas e colocadas em microtubo de 1,5mL, onde foram adicionados 2µL de R123, e incubadas em banho maria a 37 °C durante 8 minutos. Em seguida, 10µL de cada amostra incubada foi adicionado entre lâmina e lamínula pré-aquecidas a 37 °C e avaliadas em microscópio de fluorescência (AXIO Image A2<sup>®</sup>, Carl Zeiss, Berlim, Alemanha), utilizando filtro de fluoresceína de excitação de 400-570 e de emissão de 460-610nm. Um total de 200 espermatozoides por amostra em campos aleatórios da lâmina foi considerado para determinar as avaliações.

### **Viabilidade espermática**

Alíquotas de 100µL das amostras de cada tratamento foram colocadas em microtubo (1,5mL) colocando 2,5µL da solução corante SYBR-14/PI (LIVE/DEAD Sperm Viability<sup>®</sup> - Molecular probes). Em seguida, alíquota de 8µL foi retirada e colocada entre lâmina e lamínula pré-aquecida a 37 °C para avaliar a viabilidade dos espermatozoides em microscópio de fluorescência (AXIO Image A2<sup>®</sup>, Carl Zeiss, Berlim, Alemanha). Os espermatozoides foram classificados como viável (quando apresentam a região nuclear dos espermatozoides coradas

em verde) e inviável (quando apresentam a região nuclear corada em vermelho). Para cada amostra foi contado um total de 200 células em campos aleatórios.

### **Teste de ligação**

A capacidade dos espermatozoides de ovino se ligar à membrana de oócitos foi avaliada utilizando a membrana perivitelina da gema de ovo de galinha (CEPM) conforme descrito por Souza *et al.* (2016). Tubos de ensaio contendo as MPVs e foram inseminadas com adição de 50.000 espermatozoides descongelados de cada tratamento. Após a inseminação, os tubos contendo as MPV inseminadas foram incubadas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 90 minutos, e a cada 30 minutos os tubos foram lentamente agitados para que a membrana permanecesse aberta. Passados 70 minutos de incubação, 10µL de Hoechst 33342 (1mg/mL em PBS) foi adicionado em cada tubo para corar os espermatozoides em azul e permitir a visualização em microscopia de fluorescência. Ao final do período de incubação, as MPVs foram transferidas para outro tubo contendo 1mL de Tris e procedida a lavagem (adição de 1mL de Tris seguido de agitação e retirada), por pelo menos 5 vezes, para remoção dos espermatozoides que não se ligaram.

Para avaliação em microscópio de fluorescência, as MPVs foram abertas em lâmina e coberta com lamínula, observada em microscópio de fluorescência (AXIO Image A2<sup>®</sup>, Carl Zeiss, Berlim, Alemanha), e a capacidade de ligação dos espermatozoides de cada tratamento foi obtida pelo número de espermatozoides ligados à MPV determinado pela contagem em seis campos aleatórios de cada fragmento da MPV. A eficiência de ligação à MPV foi calculada pela divisão do número total de espermatozoides ligados àquela em particular MPV pelo número de espermatozoides ligados a mesma membrana pelo grupo controle.

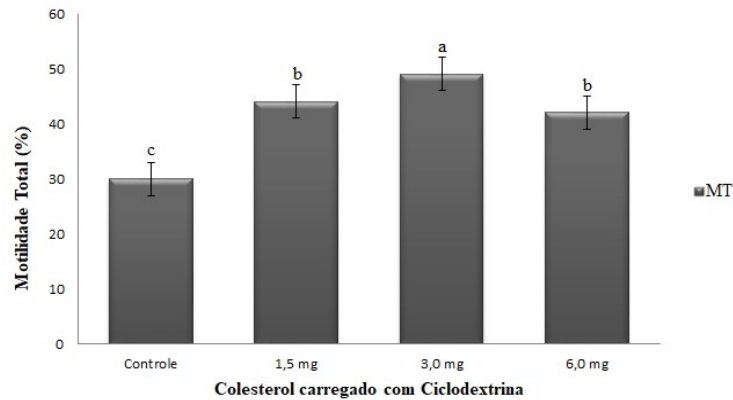
### **Análise Estatística**

As análises dos parâmetros foram avaliadas utilizando-se o programa SAS 9.2 2002-2008 by SAS Institute Inc. (Cary, NC, USA). Todas as variáveis foram submetidas aos testes de normalidade (Teste de Lilliefors) e homocedacidade (Teste de Cochran e Bartlett), posteriormente as variáveis de distribuição normal foram submetidas à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey com nível de significância de 5% (p<0,05).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados demonstraram que a adição de 3,0mg de CCC resultou em maior percentual de motilidade espermática após a criopreservação, quando comparado aos demais tratamentos com CCC e controle (Fig. 01).

Os espermatozoides de carneiros são sensíveis ao choque térmico oriundo da criopresevação devido à sua menor relação colesterol: fosfolipídio em comparação com outras espécies. Essa vulnerabilidade, favorece a formação de cristais de gelo intracelular, proporcionando danos estruturais na membrana plasmática durante a fase de transição (MOCE e GRAHAM, 2008). Por esta razão, é importante minimizar os danos as estruturas dos espermatozoides, por exemplo, aumentando o conteúdo de colesterol na membrana celular.

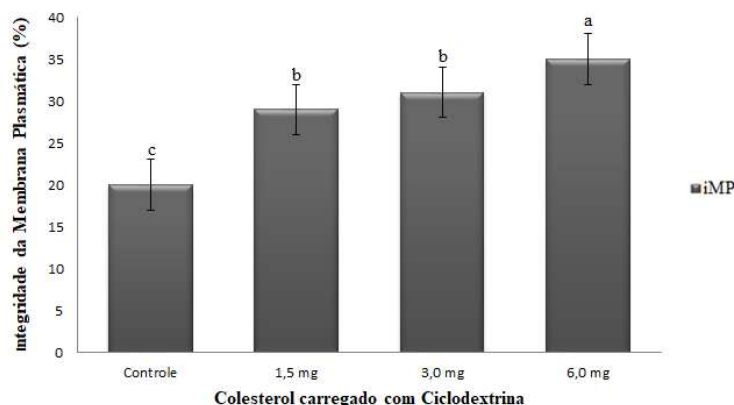


**Figura 01:** Motilidade total (MT - média±DP) de espermatozoides descongelados de carneiros tratados com colesterol carregado com ciclodextrina (CCC).

<sup>A,B,C</sup>Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Portanto os resultados desse trabalho demonstraram que em todas as amostras tratadas com CCC, o percentual de motilidade total manteve-se elevado ao comparar com o percentual do grupo controle. E as amostras tratadas com 3,0mg de CCC, mantiveram o percentual de motilidade total após a descongelação acima dos 45% (47,34), quando comparado aos grupos controle, 1,5 e 6,0mg, que apresentaram valores de motilidade inferiores (29,23; 43,23; 41,91), respectivamente, corroborando com estudos anteriores (ZENG e TERADA, 2001; PURDY e GRAHAM, 2004; MOORE *et al.*, 2005). Nesse sentido, o aumento da relação colesterol: fosfolípido com a adição do CCC em protocolos rotineiros de diluição e congelação do sêmen ovino, pode proporcionar aos espermatozoides um efeito protetor à criosobrevivência.

O efeito do colesterol carregado com ciclodextrina sobre a integridade da membrana plasmática após a congelação/descongelação nos espermatozoides de carneiros são apresentados na Fig. 02. Observou-se que os espermatozoides tratados com 6,0mg de CCC, apresentaram maior percentual de integridade de membrana plasmática em comparação aos demais tratamentos.

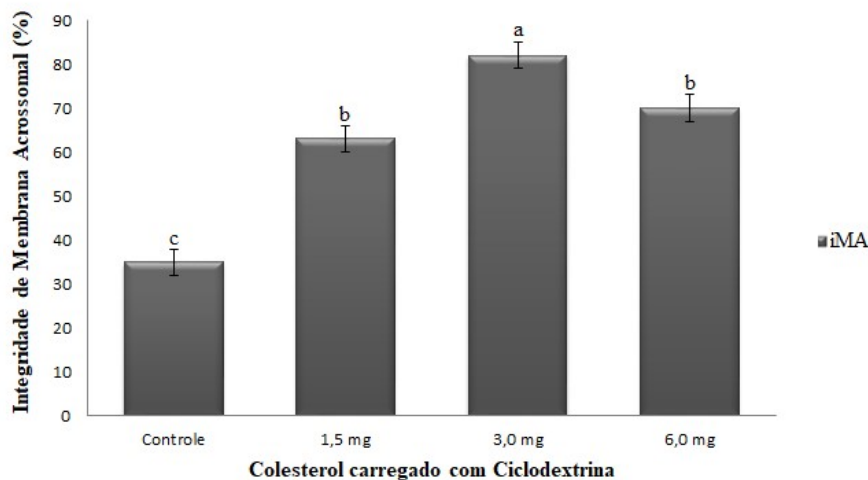


**Figura 02:** Percentual de integridade da membrana plasmática (iMP - média±DP) dos espermatozoides descongelados de ovinos, tratados com colesterol carregado com ciclodextrina.

<sup>A,B,C</sup>Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



A adição de 3,0mg e 6,0mg de colesterol carregado com ciclodextrina no sêmen ovino melhorou ( $p < 0,05$ ) a integridade da membrana acrossomal dos espermatozoides quando comparado aos demais tratamentos (Fig. 03).



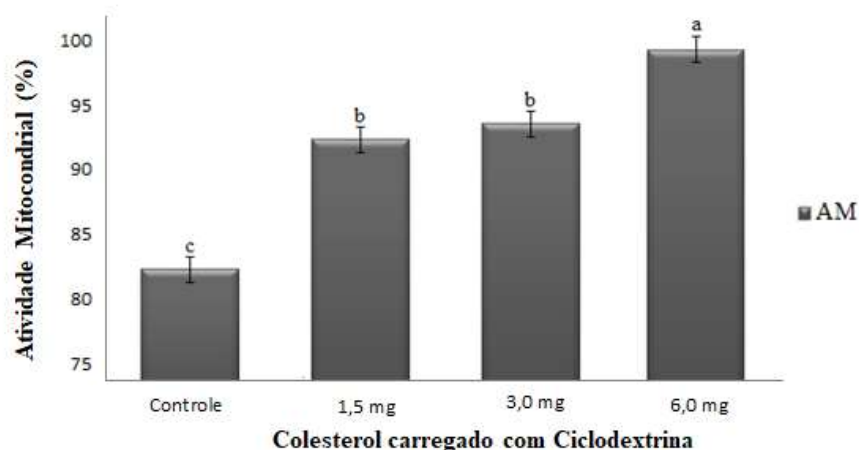
**Figura 03:** Percentual de integridade da membrana acrossomal (iMA - média±DP) dos espermatozoides descongelados de ovinos, tratados com colesterol carregado com ciclodextrina.

<sup>A,B,C</sup> Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Observou-se que a incorporação do CCC à membrana dos espermatozoides de carneiros proporcionou uma preservação da membrana plasmática e acrossomal, conservando a sua integridade durante todo o processo de criopreservação (Fig 03), já que as membranas são altamente instáveis e suscetíveis ao rompimento devido ao assolamento de lipídeos e colesterol (KADIRVEL *et al.*, 2009). Diante disso, podemos considerar que, o tratamento utilizado, o CCC, favoreceu a sua incorporação na membrana espermática, minimizando os danos ocasionados pela rápida reorganização dos fosfolipídios e proteínas da membrana, além de aumentar a tolerância a lesões decorrentes da congelamento/descongelamento.

As amostras adicionadas das diferentes concentrações de CCC no sêmen para criopreservação resultaram em maior atividade mitocondrial, em relação ao tratamento controle (Fig. 04). Houve maior percentual da atividade mitocondrial nas amostras tratadas com 6,0mg de CCC em comparação aos demais tratamentos.

Durante a criopreservação, as células espermáticas sofrem tensões mecânicas provenientes das variações osmóticas na membrana plasmática. Nas células espermáticas existe um grande número de mitocôndrias densamente compactadas em torno das fibras densas que envolvem o axonema, que são responsáveis pela produção de trifostato de adenosina (ATP), sendo que a síntese de ATP mitocondrial depende do alto potencial de membrana mitocondrial, cujo aumento desse potencial resulta em melhoria da função mitocondrial (PERUMAL *et al.*, 2013). Isto explica que os espermatozoides incorporados com 6,0mg de CCC podem ter elevado os níveis de ATP intracelular, sendo que o CCC promove proteção as mitocôndrias e as estruturas flagelares dos espermatozoides contra os danos ocasionados pela congelamento e descongelamento, elevando assim a produção de ATP, explicando o aumento da motilidade espermática e a alta atividade mitocondrial que encontramos.



**Figura 04:** Atividade mitocondrial (AM - média±DP) de espermatozoides descongelados de carneiros tratados com colesterol carregado com ciclodextrina (CCC).

<sup>A,B,C</sup> Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

É comum observar-se que, após o processo de criopreservação espermática, danos nas mitocôndrias, tornando-as incapazes de realizar o metabolismo oxidativo celular de forma correta, ocasionando a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (BALL, 2008). Adicionalmente, pode ocorrer redução da motilidade espermática ou morte celular (BILODEAU *et al.*, 2002), pois as mitocôndrias são organelas altamente especializadas na produção de energia em forma de adenosina trifosfato (ATP) para suprir as proteínas dineína e tubulina, responsáveis pela hidrólise do ATP e promoção do movimento flagelar pelo deslizamento dos microtúbulos presentes na peça intermediária das células espermáticas (GAGNON, 1995).

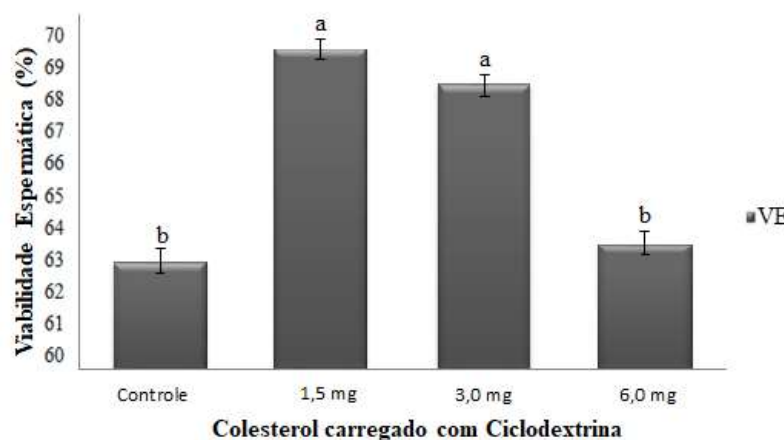
Qualquer injúria na mitocôndria espermática pode comprometer todo o processo de fecundação. Visto que, essa organela apresenta a importante função de promover aporte energético para que ocorra os batimentos flagelares do espermatozoide dentro do trato reprodutivo da fêmea e está envolvida na produção de EROs, o que as configura como um importante indicador para danos causados na criopreservação dos espermatozoides (PEÑA *et al.*, 2016). Nos espermatozoides, a produção de ATP supre várias atividades celulares e eventos bioquímicos, necessários para que a fecundação seja bem sucedida, tais como a capacitação, reação acrossômica e a motilidade espermática (MIKI, 2007).

Dessa forma, a maior disponibilidade de ATP contribuiu para uma maior motilidade espermática, observada após a criopreservação nas amostras tratadas com CCC, em particular a de 3,0mg. Assim, é possível sugerir que a adição do CCC no sêmen atua na proteção da célula espermática contra os danos da criopreservação, melhorando a atividade de mitocôndrias das células espermáticas após o descongelamento, por meio da estabilidade da membrana espermática. Efeitos semelhantes foram observados por Amidi *et al.* (2010) e Farshad *et al.* (2011) com espermatozoides de caprinos após a descongelamento, utilizando 0,75; 1,5; 2,5 e 3mg de CCC/mL.

Os valores percentuais de viabilidade espermática estão apresentados na Fig. 05. Observa-se que a adição de 1,5 e 3,0mg de CCC tiveram o percentual de viabilidade



espermática após a criopreservação, acima de 68%, quando comparado aos demais tratamentos com CCC e controle, que apresentaram valores inferiores a 64%.



**Figura 05:** Viabilidade celular (média±DP) de espermatozoides ovinos descongelados tratados com colesterol carregado com ciclodextrina (CCC).

<sup>A,B</sup>Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Observou-se que a adição de 1,5 e 3,0mg de CCC tiveram um percentual de viabilidade espermática após a criopreservação, acima de 68%, quando comparado aos demais tratamentos com CCC e controle, que apresentaram valores inferiores a 64%. A adição do CCC incorporado na membrana espermática resultou na manutenção da viabilidade dos espermatozoides após a criopreservação, sendo atribuído ao efeito que o colesterol exerce na membrana espermática, como a regulação por meio da redução da permeabilidade à água em baixas temperaturas, regulando assim a passagem de água através da membrana durante a criopreservação (GLAZAR *et al.*, 2009).

Os dados desse trabalho corroboram com os achados de Amidi *et al.* (2010), mostrando que a incorporação de colesterol na membrana dos espermatozoides de caprinos antes da congelação melhorou a motilidade e a integridade do acrossoma, após a congelação. Tais afirmações podem ser justificadas, com base em Salmon *et al.* (2016), pois sugerem que, com o aumento do colesterol na membrana plasmática utilizando CCC, as membranas dos espermatozoides permanecem mais fluidas em baixas temperaturas e menos permeável à água durante mudanças osmóticas, melhorando assim sua tolerância a criopreservação, resultando em menos danos à membrana com níveis de colesterol apropriados, e conseqüentemente, a manutenção da motilidade dos espermatozoides após a criopreservação.

Em relação à capacidade de ligação dos espermatozoides, a adição de colesterol carregado com ciclodextrina resultou em maior número de espermatozoides ligados à membrana perivitelina da gema de ovo que o controle ( $p < 0,05$ ), sendo que a concentração de 3,0mg CCC apresentou o maior número de células ligadas (Tab. 01;  $p < 0,05$ ).

Devido às semelhanças moleculares entre a zona pelúcida do oócito e a membrana perivitelina, os espermatozoides de muitas espécies podem se ligar a ela (MORAES *et al.*, 2015), inclusive os de ovinos. Por outro lado, ensaios de ligação dos espermatozoides à membrana perivitelina do ovo podem também ser úteis para determinar interações entre os

espermatozoides e o oócito, uma parte importante do processo de fecundação (MORAES *et al.*, 2015). Nos resultados do presente trabalho, viu-se que a função espermática após a adição do complexo CCC no sêmen aumentou a capacidade de ligação dos espermatozoides, quando comparada ao controle, principalmente quando foi utilizada a concentração de 3,0mg.

**Tabela 01:** Número (média±D.P) de espermatozoides descongelados de ovinos ligados à membrana perivitelina de gema de ovo (NEL) e sua eficiência de ligação (EFL) após adição de diferentes concentrações de colesterol no sêmen.

Antioxidantes	NEL	EFL	Valor de P
Controle	153,16±3,11 <sup>D</sup>	1,00	p<0,05
1,5 mg	194,65±3,30 <sup>B</sup>	1,27	
3,0 mg	241,21±3,44 <sup>A</sup>	1,57	
6,0 mg	217,23±3,39 <sup>B</sup>	1,42	

<sup>A,B,C,D</sup> Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste Tukey (p<0,05).

Desta forma, foi comprovada a melhoria na qualidade espermática devido ao aumento do número de células espermáticas que se ligaram à membrana perivitelina. Embora, os testes *in vitro* não possam avaliar com total confiabilidade o potencial fecundante dos espermatozoides (MOCÉ e GRAHAM, 2008), a obtenção de dados de fecundação *in vivo* pode ser muito cara e demorada (MORAES *et al.*, 2015). Portanto, a realização de novos testes *in vitro* que permitam avaliar os atributos necessários para os espermatozoides fecundarem, pode ser muito útil para prever a possibilidade de fecundidade (MORAES *et al.*, 2015).

## CONCLUSÕES

A adição 3,0mg de colesterol carregado com ciclodextrina antes do processo de criopreservação preserva a integridade da membrana plasmática, melhorando a fluidez em temperaturas reduzidas, protegendo os componentes celulares, mantendo elevada a atividade mitocondrial dos espermatozoides e consequentemente, favorecendo a resistência contra as crioinjúrias, podendo então, o CCC ser adicionado em protocolos de criopreservação de sêmen ovino, para aperfeiçoar a criopreservação do sêmen dessa espécie e consequentemente a preservação de raças em risco de extinção, através da inseminação artificial.

## AGRADECIMENTOS

A FUNCAPE, pela bolsa de estudo. Ao Centro de Pesquisa em Suínos, Espécies Nativas e Silvestre (CPSENS) do CPGCA/UNIVASF por toda infraestrutura (APQ-1072-5.04/12 e APQ-0227-5.04/10) e (Projeto financiado em Edital 17/2013).

## REFERÊNCIAS

AMIDI, F.; FARSHAD, A.; KHOR, A.K. Effects of cholesterol-loaded cyclodextrin during freezing step of cryopreservation with TCGY extender containing bovine serum albumin on quality of goat spermatozoa. *Cryobiology*, v.61, n.1, p.94-99, 2010.

AMORIM, E.A.M.; GRAHAM, J.K.; SPIZZIRI, B.; MEYERS, M.; TORRES, C.A.A. Effect of cholesterol or cholesteryl conjugates on the cryosurvival of bull sperm. *Cryobiology*, v.58, n.2, p.210-214, 2009.

BALL, B.A. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function and preservation in the horse. *Animal Reproduction Science*, v.107, n.3-4, p.257-267, 2008.

BANCHERO, M.; RONCHETTI, S.; MANNA, L. Characterization of Ketoprofen/Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin complexes prepared using supercritical carbon dioxide. *Journal of Chemistry*, v.2013, p.1-8, 2013.

BERNARDINI, A.; HOZBOR, F.; SANCHEZ, E.; FORNÉS, M.W.; ALBERIO, R.H.; CESARI, A. Conserved ram seminal plasma proteins bind to the sperm membrane and repair cryopreservation damage. *Theriogenology*, v.76, n.3, p.436-447, 2011.

BILODEAU, J.F.; BLANCHETTE, S.; CORMIER, N.; SIRARD, M.A. Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender: protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. *Theriogenology*, v.57, n.3, p.1105-1122, 2002.

CBRA - Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3ª ed., Belo Horizonte 2013. 104p.

FARSHAD, A.; AMIDI, F.; KOOHI KHOR, A.; RASHIDI A. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin in presence and absence of egg yolk during freezing step on quality of Markhoz Buck's spermatozoa. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, v.24, n.2, p.181-189, 2011.

GAGNON, C. Regulation of sperm motility at the axonemal level. *Reproduction, Fertility and Development*, v.7, p.847-855, 1995.

GRAHAM, J.K.; KUNZE, E.; HAMMERSTEDT, R.H. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. *Biology of Reproduction*, v.43, n.1, p.55-64, 1990.

KADIRVEL, G.; KUMAR, S.; KUMARESAN, A.; ATHIRAVAN, P. Capacitation status of fresh and frozen-thawed buffalo spermatozoa in relation to cholesterol level, membrane fluidity and intracellular calcium. *Animal Reproduction Science*, v.116, n.3-4, p.244-253, 2009.

LEE, Y.S.; LEE, S.; LEE, S.H.; YANG, B.K.; PARK, C.K. Effect of cholesterol-loaded-cyclodextrin on sperm viability and acrosome reaction in boar semen cryopreservation. *Animal Reproduction Science*, v.159, p.124-30, 2015.

MAO, J.; WU, G.M.; PRATHER, R.S.; SMITH, M.F.; CANTLEY, T.; RIEKE, A.; DIDION, B.A.; DAY, B.N. Effect of methyl- $\beta$ -cyclodextrin treatment of pig spermatozoa on in vitro fertilization and embryo development in the absence or presence of caffeine. *Theriogenology*, v.64, n.9, p.1913-1927, 2005.

MIKI, K. Energy metabolism and sperm function. *Society for Reproduction and Fertility*. (Suppl.) v.65, p.309-325, 2007.

MOCÉ, E.; GRAHAM, J.K. In vitro evaluation of sperm quality. *Animal Reproduction Science*, v.105, n.1-2, p.104-118, 2008.

MORAES, E.A.; GRAHAM, J.K.; TORRES, C.A.A.; MEYERS, M.; SPIZZIRI, B. Delivering cholesterol or cholestanol to bull sperm membranes improves cryosurvival. *Animal Reproduction Science*, v.118, n.2-4, p.148-154, 2010.

MORAES, E.A.; MATOS, W.C.G.; GRAHAM, J.K.; FERRARI JUNIOR, W.D. Cholestanol-loaded-cyclodextrin improve the quality of stallion spermatozoa after cryopreservation. *Animal Reproduction Science*, v.158, p.19-24, 2015.

MOORE, A.I.; SQUIRES, E.L.; GRAHAM, J.K. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. *Cryobiology*, v.51, n.3, p.241-249, 2005.

OGAWA, Y.A.; TANAKA, M. A fluorescent cholesterol analogue for observation of free cholesterol in the plasma membrane of live cells. *Analytical Biochemistry*, v.492, p.49-55, 2016.

PEÑA, F.J.; ORTEGA-FERRUSOLA, C.; MARTIN, M.P. New flow cytometry approaches in equine andrology. *Theriogenology*, v.86, n.1, p.366-372, 2016.

PERUMAL, P.; VUPRU, K.; RAJKHOWA, C. Effect of addition of taurine on the liquid storage (5 °C) of mithun (*Bos frontalis*) semen. *Veterinary Medicine International*, v.2013, n.4, p.1-7, 2013.

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

SALMON, V.M.; LECLERC, P.; BAILEY, J.L. Cholesterol-loaded cyclodextrin increases the cholesterol content of goat sperm to improve cold and osmotic resistance and maintain sperm function after cryopreservation. *Biology of Reproduction*, v.94, n.4, p.85-92, 2016.

SAS. Statistical Analysis System 2002-2008: System for Windows, Versão 9.2. SAS Institute Inc., Cary, USA, 2009.

SOUZA, W.L.; MORAES, E.A.; COSTA, J.M.S.; GRAHAM, J.K. Cholesterol-loaded cyclodextrin in fresh goat sperm improves cryosurvival rates. *Revista Brasileira de Ciências Veterinárias*, v.23, n.1-2, p.93-98, 2016.

SOUZA, W.L.; MORAES, E.A.; OLIVEIRA, R.P. Colesterol carregado pela ciclodextrina sobre a criopreservação dos espermatozoides de garanhões da raça Nordestina. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.38, n.5, p.991-996, 2018.

VISHWANATH, R. Artificial insemination: the state of the art. *Theriogenology*, v.59, n.2, p.571-584, 2003.

ZENG, W.X.; TERADA, T. Effects of methyl-beta-cyclodextrin on cryosurvival of boar spermatozoa. *Journal of Andrology*, v.22, p.111-118, 2001.

ZIDOVETZKI, R.; LEVITAN, I. Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: evidence, misconceptions and control strategies. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1768, n.6, p.1311-1324, 2007.