

CONSTRUINDO SABERES, FORMANDO PESSOAS E TRANSFORMANDO A PRODUÇÃO ANIMAL

**COLESTANOL CARREGADO POR CICLODEXTRINA NO SÊMEN DE  
CARNEIROS SOBRE A MOTILIDADE TOTAL E INTEGRIDADE DA MEMBRANA  
PLASMÁTICA APÓS CRIOPRESERVAÇÃO<sup>1</sup>**

<sup>1\*</sup>Maria Lilian gomes LOIOLA, <sup>2</sup>Wildelfrancys Lima de SOUZA, <sup>3</sup>Elenice Andrade MORAES, <sup>1</sup>Illa Carla Santos CARVALHO, <sup>3</sup>Jair Correia MATOS, <sup>1</sup>Jarmerson de Carvalho FERREIRA, <sup>4</sup>Pedro Humberto Félix de SOUSA, <sup>2</sup>Ricardo Toniolli  
Maria Lilian gomes LOIOLA, [lilianloiola33@gmail.com](mailto:lilianloiola33@gmail.com)

<sup>1</sup>Graduação em Zootecnia, Universidade Federal do Vale do São Francisco (Univasf), Petrolina, Pernambuco, Brasil

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza, Ceara, Brasil

<sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Univasf, Petrolina, Pernambuco, Brasil.

<sup>4</sup>Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais (DTCS), Universidade do Estado da Bahia (UnEB), Juazeiro, Bahia, Brasil

**Abstract:** During cryopreservation, damage occurs in the different structural components of spermatozoa. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effect of cyclodextrin-loaded cholestanol (CCC) on total motility and sperm membrane integrity after cryopreservation. 30 ejaculates were submitted to the following treatments: control; 0.5 mg; 0.75 mg; 1.0 mg and 1.5 mg CCC. The samples were conditioned in a cold room, then packed, sealed and conditioned under liquid nitrogen vapors, and then immersed. Thawing was at 30 sec / 37 ° C. Samples were evaluated for total motility and plasma membrane integrity. The variables were evaluated with ANOVA and Tukey's test (P <0.05). The percentage of total sperm motility was higher in the cholestanol samples when compared to the

Promoção e Realização:

Apoio Institucional:

Organização:

CONSTRUINDO SABERES, FORMANDO PESSOAS E TRANSFORMANDO A PRODUÇÃO ANIMAL

control group ( $P < 0.05$ ). The addition of CCC in semen neutralized the adverse effects of the freeze-thaw process on the integrity of the plasma membrane of sheep spermatozoa when compared to the other concentrations of CCC and the control group ( $P < 0.05$ ). It is concluded that the addition of CCC in sheep semen improves the percentage of total motility after thawing and protects the sperm plasma membrane against structural damage caused during temperature reduction in the cryopreservation process.

**Palavras-chave:** congelação, crioprotetor, espermatozóide

### Introdução

Durante o processo de congelamento-descongelamento é estimada uma perda em torno de 50% de células espermáticas, ocasionada por danos nos diferentes componentes estruturais do espermatozóides, como a membrana plasmática, que devido as crioinjúrias sofre modificações morfológicas na organização e composição dos lipídeos das membranas dos espermatozóide, reduzindo sua capacidade de garantir a homeostase célula cuja é essencial para manter a viabilidade espermática (SALAMON; MAXWELL, 1995).

Portanto, objetivou-se avaliar o efeito da adição do colestanol carregado por ciclodextrina sobre a motilidade total e integridade da membrana espermática após a criopreservação.

### Material e Métodos

O experimento foi realizado no Campus de Ciências Agrárias da Univasf. Foram utilizados 10 carneiros adultos, sendo sete da raça Dorper e três da raça Santa Inês. Foram coletados 2 ejaculados de cada carneiro ( $n=30$ ), por meio de vagina artificial para ovinos. Após a coleta, o ejaculado foi subdividido em seis tubos de ensaio e diluídos em Tris-Gema de ovo, para a concentração final de  $200 \times 10^6$  espermatozóides/mL e mantidos em banho maria a  $32 \text{ }^\circ\text{C}$ . Para determinação dos

Promoção e Realização:



Apoio Institucional:



Organização:



CONSTRUINDO SABERES, FORMANDO PESSOAS E TRANSFORMANDO A PRODUÇÃO ANIMAL

tratamentos experimentais, o CCC foi adicionado ao sêmen diluído, estabelecendo assim os tratamentos: controle (sem adição de CCC); 0,5 mg CCC; 0,75 mg CCC; 1,0 mg CCC e 1,5 mg CCC. Após adição do CCC, as amostras de cada tratamento foram acondicionadas em câmara fria a 5 °C por um período de duas horas. Depois, as amostras de cada tratamento foram envasadas em palhetas de 0,5 mL, lacradas e acondicionadas sob vapores do nitrogênio líquido, por 15 minutos, a 8 cm da lâmina líquida e posteriormente imersas no nitrogênio líquido e estocadas em botijão criogênico para posterior análise. A descongelação foi feita em 30 segundos a 37 °C. Amostras descongeladas de cada tratamento foram avaliadas para a motilidade espermática total utilizando o sistema de análise computadorizada (CASA<sup>®</sup>), equipado com o SpermVision<sup>®</sup>, onde alíquotas de 8 µL de cada amostra foram avaliadas em lâmina e lamínula pré-aquecidas a 37°C. A integridade da membrana plasmática (iMP) dos espermatozóides descongelados foi realizada utilizando duas sondas fluorescentes, iodeto de propídio (IP) e Hoechst 33342 (H33342). Dez microlitros de cada amostra descongelada dos tratamentos foram colocados em microtubos de 1,5 mL, onde foram adicionados 2 µL de IP e de H33342, e depois incubado em banho Maria a 37 °C durante 8 minutos. Em seguida, foram retirados 10 µL da amostra que foi incubada e colocada entre lâmina e lamínula pré-aquecidas a 37 °C para ser avaliado em microscópio de fluorescência (AXIO Image A2<sup>®</sup>) quanto ao percentual de espermatozoides com membrana plasmática íntegra: íntacta (apresentavam o núcleo corado de azul) ou lesada (núcleo corado de rosa). Para cada amostra analisada, um total de 200 células foi contado em campos aleatórios. A variável foi submetida à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa estatístico SAEG.

## .Resultados e Discussão

Promoção e Realização:



Apoio Institucional:



Organização:



CONSTRUINDO SABERES, FORMANDO PESSOAS E TRANSFORMANDO A PRODUÇÃO ANIMAL

O efeito do colestanol carregado com ciclodextrina sobre a motilidade total dos espermatozoides são apresentados na Tabela 1. Observa-se que a porcentagem de motilidade total dos espermatozoides foi maior nas amostras tratadas com colestanol, quando comparado ao grupo controle (Tabela 1;  $P < 0,05$ ).

**Tabela 1-** Motilidade total de espermatozoides de carneiros criopreservados com adição de diferentes concentrações de colestanol carregado com ciclodextrina.

TRT	Motilidade Total
Controle	25.38 <sup>B</sup>
0,5 CCC	42.19 <sup>A</sup>
0,75 CCC	41.10 <sup>A</sup>
1,0 CCC	43.12 <sup>A</sup>
1,5 CCC	40.57 <sup>A</sup>

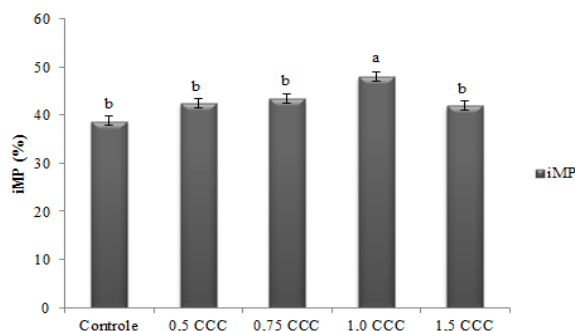
<sup>A,B</sup> Médias com letras maiúsculas diferentes sobrescritas na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

Mostrando assim o efeito positivo do colestanol contra os danos causados aos espermatozoides no processo de congelamento.

O efeito da adição colestanol carregado com ciclodextrina em diferentes concentrações sobre a porcentagem de células com membrana plasmática íntegra são apresentados na Figura 1. Os resultados demonstram que a adição de 1,0 mg de CCC no sêmen diluído antes da congelação, neutralizou os efeitos adversos do processo de congelação-descongelação sobre a integridade da membrana plasmática dos espermatozoides de carneiros, quando comparado as demais concentrações de CCC e o grupo controle (Figura 1;  $P < 0,05$ ).



CONSTRUINDO SABERES, FORMANDO PESSOAS E TRANSFORMANDO A PRODUÇÃO ANIMAL



**Figura 1.** Percentual de integridade da membrana plasmática (iMP) dos espermatozoides descongelados de ovinos, tratados com colestanol carregado com ciclodextrina.

A adição, portanto, do CCC ao meio diluente de sêmen de contribui para a melhoria da qualidade espermática durante protocolo de congelamento. Sendo assim, atribuído à redução do efeito deletério do estresse osmótico, responsável pela crioinjúria, durante o congelamento e descongelamento.

### Conclusões

Conclui-se que a adição de colestanol carregado com ciclodextrina no sêmen de carneiros melhora o percentual de motilidade total após a descongelação e protege a membrana plasmática dos espermatozoides contra os danos estruturais provocados durante a redução de temperatura no processo de criopreservação.

### Referências

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen I. processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 37, p.185-249, 1995.