

MADRIANO CHRISTILIS DA ROCHA SANTOS

**ADIÇÃO DO COMPLEXO CICLODEXTRINA-COLESTEROL NA  
CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN CAPRINO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2013

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação a Biblioteca Central da UFV

T

S237a  
2013

Santos, Madriano Christilis da Rocha, 1982-  
Adição do complexo ciclodextrina-colesterol na  
criopreservação do sêmen caprino / Madriano Christilis da  
Rocha Santos. – Viçosa, MG, 2013.  
xiv, 76 f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Ciro Alexandre Alves Torres.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Caprino - Reprodução. 2. Caprino - Espermatozoides.  
3. Células - Membranas. 4. Colesterol. I. Universidade Federal de  
Viçosa. Departamento de Zootecnia. Programa de Pós-  
Graduação em Zootecnia. II. Título.

CDD 22. ed. 636.3082

MADRIANO CHRISTILIS DA ROCHA SANTOS

**ADIÇÃO DO COMPLEXO CICLODEXTRINA-COLESTEROL NA  
CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN CAPRINO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 21 de agosto de 2013.

---

Dra. Cristina Mattos Veloso

---

Dr. Tarcísio A. Rêgo de Paula

---

Dr. Giancarlo Magalhães dos Santos

---

Dr. Giovanni Ribeiro de Carvalho  
(Coorientador)

---

Dr. Ciro Alexandre Alves Torres  
(Orientador)

*À “Mainha”, que foi, é e sempre será  
minha fonte de inspiração.*

*A tua única verdadeira limitação é aquela que você aceita e define em sua própria mente.*

**Napoleon Hill**

*Compartilhem seu conhecimento. É uma das maneiras de atingir a imortalidade.*

**Dalai-Lama**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, por todos os momentos que passei, sendo bons ou adversos, pois estes moldaram o meu caráter.

A todos os animais que, direta ou indiretamente, contribuíram para meu aprendizado e minha formação, muito obrigado; utilizarei os conhecimentos adquiridos em prol dos seus semelhantes.

À minha mãe, Creuza, uma mulher guerreira e amorosa, que sempre foi firme na educação dos filhos, buscando sempre o melhor para eles, por todo apoio e ensinamento de vida. “Mainha”, se um dia a senhora sentir por mim um décimo do orgulho que eu tenho da senhora, os meus esforços durante todos estes anos longe de casa terão valido a pena. TE AMO e agradeço por tudo, minha heroína.

Às minhas irmãs, Mariana e Mayane, agradeço pela torcida, pelo incentivo, pelas palavras de carinho e conforto, pelo respeito e pela admiração que sempre tiveram por mim. À Mayane e ao Adriano (cunhado e grande amigo). À Mariana e ao Antônio Carlos (cunhado, grande amigo e compadre), por terem me dado os meus queridos e muito amados sobrinhos. Aos meus sobrinhos Adrian Felipe e Arthur (também afilhado), que hoje, mais que ninguém, enchem minha vida de alegria e amor incondicional por este tio tão coruja.

Ao Anastácio (*in memoriam*), um grande amigo da família que sempre torceu por mim, mas, infelizmente, não está mais entre nós para compartilhar estes momentos felizes que estamos vivendo. Tenho certeza que, onde ele estiver, está feliz por mim. Um grande abraço meu caro amigo.

Um agradecimento especial ao meu avô, Sr. Leobino (*in memoriam*), grande pai e avô amoroso, e à minha avó, Maria Patrícia, mulher de fibra, que apesar de todas as dificuldades conseguiu criar e transformar seus filhos em verdadeiros cidadãos.

Ao meu tio Carlos Alberto (tio Cal) (*in memoriam*), homem forte, trabalhador e honesto; como diria Euclides da Cunha, verdadeiro cidadão nordestino, que soube como poucos aproveitar a vida.

Ao meu tio Mariano (tio Mano), por ter sido e até hoje ser a figura paterna na minha vida, e à Rejane, sua companheira de todas as horas.

À minha tia e madrinha, Cristiane, mulher admirável, forte, vibrante e de muita fé, que não tem medo do desconhecido, que tem por mim o amor de mãe e sempre acreditou em minha capacidade. Aos meus primos Livston (meu primo-irmão), Jaílams, Leon Jhonatan, Anderson, Pedro Henrique e aos gêmeos João Pietro e João Vitor. Agradeço também a todos os outros primos – apesar de vocês não terem sido nominalmente citados, sintam-se homenageados da mesma forma.

Ao tio Nando e Marcelo e às suas respectivas companheiras.

Um agradecimento mais do que especial à Flávia Reis Gomes, mulher maravilhosa, que tem sido minha namorada e companheira de todas as horas, e por me fazer muito feliz. Muito obrigado minha “neguinha” linda, e que sejamos ainda muito mais felizes juntos. Agradeço também aos seus pais e familiares, por terem me acolhido com muito carinho – um grande abraço a todos.

Ao grande amigo da família, Renato, que sempre torceu por mim – um abraço meu amigo.

Ao professor Ciro Torres, pela orientação, pela confiança e pelas conversas descontraídas.

Ao professor José Domingos Guimarães (JD ou J), pela orientação, coorientação, confiança, pela força em todos os momentos que precisei e pela amizade. “Muito obrigado J”.

Aos professores Giancarlo Magalhães dos Santos, Giovanni Ribeiro de Carvalho, Cristina Mattos Veloso e Tarcisio A. Rêgo de Paula, que junto com o professor Ciro fizeram parte da minha banca examinadora.

Ao professor Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo, por meio de seu funcionário Márcio, por me ajudarem seu laboratório.

Ao Júlio Dias, Carlos Thiago “*et al.*”, à Camila, pela amizade e por me ajudarem nas atividades da tese, e também a todos os estagiários que me ajudaram em algum momento deste período. A todos os amigos não citados; vocês são muitos, e para não esquecer ninguém, agradeço a todos de todo o coração.

Gostaria de agradecer também ao professor Marcelo Teixeira Rodrigues, pela confiança e oportunidade de poder estar à frente dos planejamentos reprodutivos do capril do DZO-UFV desde 2009 até agora, onde graças a Deus

e muito trabalho obtivemos resultados de fertilidade acima do esperado.  
Agradeço também aos funcionários do capril.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa.



## **BIOGRAFIA**

MADRIANO CHRISTILIS DA ROCHA SANTOS, filho de José da Rocha Santos e de Creuza Inácio Rocha Santos, nasceu em 11 de setembro de 1982, na cidade de Propriá, SE.

Em 1998, ingressou na Escola Agrotécnica Dom Avelar Brandão Vilela, atual IFE – Sertão, na cidade de Petrolina, PE, concluindo o curso de técnico agrícola, com habilitação em Zootecnia, em 2001.

Em 2003, ingressou no curso de Medicina Veterinária na Universidade Federal Rural de Pernambuco, graduando-se em 2008.

Em 2008, ingressou no curso de pós-graduação de Mestrado em Zootecnia, na área de reprodução animal, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais, concluindo-o em fevereiro de 2010.

Em março de 2010, ingressou no curso de pós-graduação de Doutorado em Zootecnia, na área de reprodução animal, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), concluindo-o em dezembro de 2013.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
LISTA DE TABELAS .....	x
RESUMO .....	xii
ABSTRACT .....	xvi
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1. Espermatozoides .....	3
2.2. Morfologia espermática.....	3
2.3. Membrana espermática.....	4
2.4. Alterações nas membranas celulares decorrentes do resfriamento e congelamento seminal .....	5
2.5. Plasma seminal caprino .....	8
2.6. Coleta e avaliação de sêmen caprino .....	9
2.7. Diluentes .....	10
2.8. Crioprotetores .....	12
2.9. Criopreservação seminal.....	14
2.10. Colesterol .....	15
2.11. Ciclodextrina .....	16
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	17

### Artigo 1

Avaliação da inclusão do colesterol carregado pela ciclodextrina à membrana plasmática do espermatozoide caprino, antes do congelamento...	26
Resumo.....	26
Abstract.....	27
1. Introdução .....	28
2. Material e métodos.....	29
2.1. Comissão de ética.....	29
2.2. Data e local .....	29
2.3. Delineamento experimental.....	23
2.4. Preparo do complexo Ciclodextrina-Colesterol (CCC) .....	30
2.5. Animais .....	30
2.6. Método de coleta do sêmen .....	30
2.7. Exames do sêmen .....	31
2.8. Volume seminal.....	31
2.9. Coloração seminal .....	31
2.10. Aspecto seminal.....	32

	<b>Página</b>
2.11. Turbilhonamento espermático .....	32
2.12. Motilidade espermática .....	32
2.13. Vigor espermático .....	32
2.14. Concentração espermática .....	32
2.15. Congelamento do sêmen .....	33
2.16. Teste de coloração supravital .....	33
2.17. Teste hiposmótico .....	34
2.18. Análise estatística .....	34
3. Resultados e discussão .....	34
4. Conclusão .....	40
Referências bibliográficas .....	41

## Artigo 2

Avaliação da integridade e funcionalidade da membrana espermática após a inclusão do complexo ciclodextrina-colesterol ao sêmen caprino	44
Resumo .....	44
Abstract .....	46
1. Introdução .....	48
2. Material e métodos .....	49
2.1. Comissão de ética animal .....	49
2.2. Local .....	49
2.3. Animais .....	50
2.4. Delineamento experimental .....	50
2.5. Preparo do Complexo Ciclodextrina-Colesterol (CCC) .....	50
2.6. Método de coleta do sêmen .....	51
2.7. Exames do sêmen .....	52
2.8. Volume seminal .....	52
2.9. Coloração seminal .....	52
2.10. Aspecto seminal .....	52
2.11. Turbilhonamento espermático .....	52
2.12. Motilidade espermática .....	52
2.13. Vigor espermático .....	53
2.14. Concentração espermática .....	53
2.15. Congelamento do sêmen .....	53
2.16. Teste de coloração supravital .....	54
2.17. Teste hiposmótico .....	54
2.18. Teste de coloração por sondas fluorescentes .....	54
2.19. Análise estatística .....	55
3. Resultados e discussão .....	56
4. Conclusão .....	71
Referências bibliográficas .....	72
3. CONCLUSÃO GERAL .....	76

## LISTA DE TABELAS

	<b>Página</b>
<b>Artigo 1</b>	
1 Médias, erro-padrão das médias do aspecto, coloração, concentração, volume, turbilhonamento, motilidade e vigor espermáticos do sêmen fresco .....	35
2 Médias e erro-padrão das médias da motilidade espermática do sêmen descongelado .....	37
3 Médias e erro-padrão das médias do vigor espermático do sêmen descongelado .....	37
4 Médias e erro-padrão das médias da análise de funcionalidade de membrana do espermatozoide, por meio do teste supravital do sêmen descongelado .....	38
5 Médias e erro-padrão das médias da análise de integridade espermatozoide, por meio do teste hiposmótico do sêmen descongelado.....	39
6 Correlações simples de Pearson entre aspectos físicos do sêmen <i>in natura</i> e descongelado .....	40
<b>Artigo 2</b>	
1 Médias, erro-padrão da média do volume, aspecto, coloração, turbilhonamento, motilidade, vigor e concentração e espermáticos do sêmen fresco .....	56
2 Médias, erro-padrão das médias e coeficiente de variação da motilidade espermática do sêmen descongelado .....	58
3 Médias, erro-padrão das médias e coeficiente de variação do vigor espermático do sêmen descongelado.....	59
4 Médias, erro-padrão das médias e coeficiente de variação do teste hiposmótico .....	60
5 Médias, erro-padrão das médias e coeficiente de variação do teste supravital.....	61
6 Médias, erro-padrão das médias e coeficiente de variação do teste com sonda de imunofluorescência (JC – 1), verificando células com alta produção da bainha mitocondrial.....	61

	<b>Página</b>
7 Médias, erro-padrão das médias e coeficiente de variação do teste com sonda de imunofluorescência (FITC – PSA), verificando integridade de membrana acrossomal .....	62
8 Médias, erro-padrão das médias e coeficiente de variação do teste com sondas de imunofluorescência (Iodeto de propídio e Dicarboxifluorosceína), verificando integridade de membrana plasmática.....	64
9 Correlações simples de Pearson entre aspectos físicos do sêmen <i>in natura</i> e descongelado, teste supravital e testes com sondas fluorescentes (iodeto de propídio+dicarboxifluorosceína; FITC-PSA; JC-1) .....	65

## RESUMO

SANTOS, Madriano Christilis da Rocha, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2013. **Adição do complexo ciclodextrina-colesterol na criopreservação do sêmen caprino.** Orientador: Ciro Alexandre Alves Torres. Coorientadores: José Domingos Guimarães e Giovanni Ribeiro de Carvalho.

Os objetivos do presente estudo foram: Capítulo 1 – analisar, por meio da motilidade e do vigor espermáticos, a eficácia da adição de seis diferentes concentrações do complexo ciclodextrina-colesterol (CCC) em afetar a capacidade e a intensidade de movimentação das células espermáticas após o processo de congelamento do sêmen caprino, e avaliar a integridade e a funcionalidade da membrana plasmática do sêmen caprino descongelado. Capítulo 2 – avaliar a integridade e a funcionalidade da membrana plasmática de espermatozoide após a adição do complexo ciclodextrina-colesterol (CCC) diluído em extensores à base de Tris-Glicerol ou à base de Tris-Etilenoglicol-gema de ovo ao sêmen caprino, e avaliar a forma de inclusão desse complexo (junto com o diluente ou pré-incubado por 15 minutos). No experimento descrito no Capítulo 1, cinco ejaculados foram coletados e fracionados de cinco reprodutores caprinos, saudáveis e com fertilidade comprovada. Uma fração foi utilizada como tratamento controle negativo ( $T_{\text{controle}}$ ), onde não foi incluído o CCC. Adicionou-se nas demais alíquotas o diluente de congelamento (à base de Tris-glicerol) junto com o CCC nas concentrações de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; e 3,0 mg, que foram consideradas como os tratamentos:  $T_{0,5}$ ;  $T_{1,0}$ ;  $T_{1,5}$ ;  $T_{2,0}$ ;  $T_{2,5}$ ; e  $T_{3,0}$ , respectivamente, com uma concentração espermática de  $[ ] = 200 * 10^6/\text{mL}$ . Após o congelamento foram feitas as avaliações de motilidade e vigor espermáticos, o teste hiposmótico e o teste supravital. No experimento descrito no Capítulo 2, foram coletados três ejaculados de cada um dos quatro bodes, totalizando 12 ejaculados. Cada ejaculado foi avaliado, e aqueles considerados aptos para o congelamento, segundo os parâmetros mínimos de motilidade e vigor espermáticos exigidos pelo CBRA (1998), foram fracionados em seis alíquotas de  $350 * 10^6$  espermatozoides (quantidade suficiente para sete doses de  $50 * 10^6$  de espermatozoides/palhetas de 0,25 mL). Cada alíquota recebeu 1,0 mg de CCC, nos seguintes tratamentos:  $T_{\text{Glicerol}}$  – controle negativo para o diluente à base de Tris-glicerol sem CCC;  $T_{\text{Glicerol} + \text{CCC}}$  – para o diluente à base

de Tris-glicerol + CCC;  $T_{\text{Glicerol} + \text{CCC/pré-incubado}} - \text{CCC}$  diluído em solução isosmótica ao sêmen (soro fisiológico) com 15 minutos de incubação antes da adição do diluente à base de Tris-glicerol;  $T_{\text{Etilenoglicol}}$  – controle negativo para o diluente à base de Tris-Etilenoglicol-gema de ovo;  $T_{\text{Etilenoglicol} + \text{CCC}}$  – para o diluente à base de Tris-Etilenoglicol-gema de ovo + CCC,  $T_{\text{Etilenoglicol} + \text{CCC/pré-incubado}}$  – para o CCC diluído em solução isoosmótica ao sêmen (soro fisiológico) com 15 minutos de incubação antes da adição do diluente à base de Tris-Etilenoglicol-gema de ovo. Capítulo 1 – O valor de  $\alpha$  foi de 5% para todos os parâmetros avaliados. Constatou-se que todos os tratamentos apresentaram diferenças ( $P < 0,05$ ) para o parâmetro motilidade espermática e que os tratamentos  $T_{1,0}$  e  $T_{0,5}$  evidenciaram ser os maiores valores ( $33,45\% \pm 1,07$  e  $32,59\% \pm 0,98$ , respectivamente) em relação a  $28,62\% \pm 1,05$  do  $T_{\text{controle}}$  e estando acima do valor mínimo de 30%, preconizado pelo CBRA (1998) para sêmen descongelado. A motilidade espermática dos tratamentos  $T_{1,5}$ ;  $T_{2,5}$ ;  $T_{2,0}$ ; e  $T_{3,0}$  foram:  $27,41\% \pm 0,96$ ;  $26,55\% \pm 0,94$ ;  $25,89\% \pm 0,99$ ; e  $25,17\% \pm 1,06$ , respectivamente. O vigor espermático não variou ( $P > 0,05$ ) entre tratamentos, sendo:  $T_{\text{controle}}$  ( $2,1 \pm 0,07$ ),  $T_{0,5}$  ( $2,24 \pm 0,07$ ),  $T_{1,0}$  ( $2,4 \pm 0,08$ ),  $T_{1,5}$  ( $2,28 \pm 0,07$ ),  $T_{2,0}$  ( $2,13 \pm 0,07$ ),  $T_{2,5}$  ( $2,19 \pm 0,07$ ) e  $T_{3,0}$  ( $2,26 \pm 0,09$ ). O percentual de células com membrana funcional pelo teste supravital em  $T_{0,5}$  ( $41,5 \pm 0,85$ ) foi superior ( $P < 0,05$ ) ao do  $T_{\text{controle}}$  ( $37,7 \pm 0,94$ ), não tendo havido variações ( $P > 0,05$ ) nos percentuais médios entre os tratamentos:  $T_{2,0}$ ;  $T_{2,5}$ ;  $T_{1,0}$ ; e  $T_{3,0}$  ( $38,06 \pm 0,91$ ;  $38,06 \pm 1,0$ ;  $36,33 \pm 0,81$ ;  $35,54 \pm 0,81$ ; e  $34,77 \pm 1,13$ , respectivamente), em relação ao do  $T_{\text{controle}}$ . O percentual de membrana funcional do tratamento  $T_{1,5}$  ( $30,65 \pm 0,98$ ) foi inferior ( $P < 0,05$ ) ao dos demais tratamentos. Não foram observadas diferenças ( $P > 0,05$ ) na integridade de membrana plasmática por meio do teste hiposmótico para  $T_{\text{controle}}$  ( $28,55 \pm 1,01$ ),  $T_{2,5}$  ( $24,47 \pm 0,76$ ),  $T_{0,5}$  ( $24,21 \pm 0,82$ ),  $T_{1,0}$  ( $23,74 \pm 0,85$ ),  $T_{1,5}$  ( $21,92 \pm 1,18$ ),  $T_{2,0}$  ( $21,24 \pm 0,87$ ) e  $T_{3,0}$  ( $19,68 \pm 0,88$ ), pelo teste de Kruskal-Wallis. Capítulo 2 – O valor de  $\alpha$  foi de 5% para todos os parâmetros avaliados. As médias da motilidade espermática diferiram ( $P < 0,05$ ) entre todos os tratamentos  $T_{\text{Glicerol} + \text{CCC/pré-incubado}}$  ( $37,08 \pm 2,17$ ),  $T_{\text{Glicerol} + \text{CCC}}$  ( $35,00 \pm 1,51$ ),  $T_{\text{Glicerol}}$  ( $29,55 \pm 2,81$ ),  $T_{\text{Etilenoglicol} + \text{CCC/pré-incubado}}$  ( $29,17 \pm 4,52$ ),  $T_{\text{Etilenoglicol} + \text{CCC}}$  ( $25,83 \pm 3,98$ ) e  $T_{\text{Etilenoglicol}}$  ( $23,64 \pm 4,10$ ). O vigor espermático do sêmen descongelado não foi afetado pelos tratamentos aplicados ( $P > 0,05$ ),

apresentando as seguintes médias  $T_{\text{Etilenoglicol} + \text{CCC/pré-incubado}}$  ( $2,96 \pm 0,31$ ),  $T_{\text{Etilenoglicol} + \text{CCC}}$  ( $2,91 \pm 0,12$ ),  $T_{\text{Glicerol} + \text{CCC/pré-incubado}}$  ( $2,75 \pm 0,2$ ),  $T_{\text{Etilenoglicol}}$  ( $2,59 \pm 0,35$ ),  $T_{\text{Glicerol} + \text{CCC}}$  ( $2,29 \pm 0,18$ ),  $T_{\text{Glicerol}}$  ( $2,22 \pm 0,18$ ). Não foram observadas diferenças ( $P > 0,05$ ) nos percentuais médios para integridade de membrana pelo teste hiposmótico dos tratamentos  $T_{\text{Glicerol} + \text{CCC/pré-incubado}}$  ( $52,0 \pm 4$ ),  $T_{\text{Etilenoglicol} + \text{CCC/pré-incubado}}$  ( $49,65 \pm 5,9$ ),  $T_{\text{Glicerol} + \text{CCC}}$  ( $45,05 \pm 4,83$ ),  $T_{\text{Glicerol}}$  ( $44,8 \pm 2,31$ ),  $T_{\text{Etilenoglicol}}$  ( $44,39 \pm 4,66$ ) e  $T_{\text{Etilenoglicol} + \text{CCC}}$  ( $39,6 \pm 4,96$ ). Diferenças não foram observadas ( $P > 0,05$ ) entre as médias dos tratamentos  $T_{\text{Etilenoglicol} + \text{CCC/pré-incubado}}$  ( $29,0 \pm 3,82$ ),  $T_{\text{Etilenoglicol} + \text{CCC}}$  ( $26,96 \pm 4,73$ ),  $T_{\text{Glicerol} + \text{CCC/pré-incubado}}$  ( $24,5 \pm 4,2$ ),  $T_{\text{Glicerol} + \text{CCC}}$  ( $23,54 \pm 4,49$ ),  $T_{\text{Glicerol}}$  ( $20,79 \pm 3,35$ ),  $T_{\text{Etilenoglicol}}$  ( $19,45 \pm 4,08$ ), para funcionalidade da membrana plasmática, pelo teste supravital. Foram observadas diferenças ( $P < 0,05$ ) na produção de ATP na bainha mitocondrial nos tratamentos  $T_{\text{Etilenoglicol} + \text{CCC}}$  ( $62,92 \pm 8,34$ ),  $T_{\text{Etilenoglicol} + \text{CCC/pré-incubado}}$  ( $62,72 \pm 8,79$ ),  $T_{\text{Etilenoglicol}}$  ( $59,19 \pm 9,57$ ),  $T_{\text{Glicerol} + \text{CCC/pré-incubado}}$  ( $11,92 \pm 6,89$ ),  $T_{\text{Glicerol}}$  ( $11,64 \pm 5,43$ ) e  $T_{\text{Glicerol} + \text{CCC}}$  ( $7,76 \pm 3,31$ ). Foram constatadas diferenças ( $P < 0,05$ ) na integridade de membrana acrossomal nos tratamentos  $T_{\text{Etilenoglicol}}$  ( $78,19 \pm 5,82$ ),  $T_{\text{Etilenoglicol} + \text{CCC/pré-incubado}}$  ( $74,43 \pm 6,31$ ),  $T_{\text{Etilenoglicol} + \text{CCC}}$  ( $70,68 \pm 5,77$ ),  $T_{\text{Glicerol}}$  ( $47,06 \pm 4,31$ ),  $T_{\text{Glicerol} + \text{CCC}}$  ( $46,88 \pm 6,58$ ) e  $T_{\text{Glicerol} + \text{CCC/pré-incubado}}$  ( $44,6 \pm 8,57$ ). Não foram encontradas diferenças ( $P > 0,05$ ) na integridade de membrana plasmática por meio das sondas fluorescentes (IP + Dietilcarboxifluorosceína) nos tratamentos  $T_{\text{Glicerol}}$  ( $63,98 \pm 8,4$ ),  $T_{\text{Glicerol} + \text{CCC}}$  ( $63,08 \pm 9,05$ ),  $T_{\text{Glicerol} + \text{CCC/pré-incubado}}$  ( $52,24 \pm 9,47$ ), T5 ( $52,09 \pm 10,88$ ),  $T_{\text{Etilenoglicol} + \text{CCC/pré-incubado}}$  ( $44,37 \pm 8,96$ ) e  $T_{\text{Etilenoglicol}}$  ( $37,19 \pm 10,81$ ).

Capítulo 1 – Conclui-se que a adição de 0,5 mg do CCC ao sêmen com a concentração espermática de  $200 \times 10^6$  /mL diminui as perdas de integridade e funcionalidade da membrana plasmática. No entanto, a adição de 1,0 mg de CCC ao sêmen com a concentração espermática de  $200 \times 10^6$  /mL propicia melhor resultado na motilidade espermática após o descongelamento do sêmen. Capítulo 2 – Diante dos resultados observados, conclui-se que a adição de 1,0 mg do complexo ciclodextrina-colesterol no sêmen com a concentração espermática de  $200 \times 10^6$  /mL não altera a integridade e/ou a funcionalidade da membrana plasmática do espermatozoide caprino. O diluidor à base de Tris-gema de ovo-etileno glicol não altera a funcionalidade da membrana plasmática ou o vigor espermático, embora influencie positivamente a integridade da membrana



acrossomal afete negativamente a motilidade espermática do sêmen descongelado, comparado ao diluente à base de Tris-Glicerol. A pré-incubação do sêmen com o complexo ciclodextrina-colesterol não altera as características de vigor espermático, nem a integridade e a funcionalidade da membrana plasmática dos espermatozoides, mas afeta positivamente a motilidade espermática do sêmen descongelado.

## ABSTRACT

SANTOS, Madriano Christilis da Rocha, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, August of 2013. **Addition of ciclodextrina-cholesterol compound on cryopreservation of goat semen.** Adviser: Ciro Alexandre Alves Torres. Co-advisers: José Domingos Guimarães and Giovanni Ribeiro de Carvalho.

Chapter 1 – The objective of this study was to analyze by spermatic motility and vigor the accuracy of six different of Ciclodextrin-Cholesterol Compound (CCC) concentrations on the spermatic motility and vigor effect after goat semen cryopreservation process and to evaluate the plasma membrane function and integrity of thawed goat semen. Chapter 2 – The objective of this study was to evaluate the functionality and integrity of plasma membrane of thawed goat semen after addition of Ciclodextrin-Cholesterol Compound (CCC) diluted in tris glycerol or tris ethylene glycol + yolk hen's egg diluent to goat semen. And further, to evaluate the way of inclusion of the CCC (together with diluent or preincubated for 15 minutes). Chapter 1 – Five Billy goats were used and five samples were collected from each and then fractionated in seven aliquots. One aliquot did not receive the CCC been considered a negative control ( $T_{\text{control}}$ ), the others received the CCC in the following concentrations: 0.5; 1.0; 1.5; 2.0; 2.5; 3.0 mg for spermatic concentration of  $[ ] = 200 * 10^6/\text{mL}$ , being called treatments:  $T_{0.5}$ ;  $T_{1.0}$ ;  $T_{1.5}$ ;  $T_{2.0}$ ;  $T_{2.5}$ ; and  $T_{3.0}$ , respectively. The spermatic motility and vigor and the supravital and hypoosmotic test were applied to the post-thaw semen. Chapter 2 – Four billy goats were used and three samples were collected from each with a total of twelve ejaculates. Each ejaculate was evaluated and the ones good to be frozen by the minimum requirements of motility and vigor by the Brazilian College of Animal Reproduction (CBRA, 1998) were fractionated in six aliquots of  $350 * 10^6$  spermatozoa (enough for 7 doses with  $50 * 10^6$  spermatozoa/semen straw). Each aliquot received 1.0 mg of CCC in the following treatment:  $T_{\text{Glycerol}}$  – negative control for Tris glycerol diluent without CCC;  $T_{\text{Glycerol} + \text{CCC}}$  – Tris glycerol diluent + CCC;  $T_{\text{Glycerol} + \text{CCC} + \text{preincubated}}$  – CCC diluted in isosmotic solution (normal saline) 15 minutes before addition of the Tris glycerol diluent;  $T_{\text{Ethylene glycol}}$  – negative control for Tris ethylene glycol diluent without CCC;  $T_{\text{Ethylene glycol} + \text{CCC}}$  – Tris ethylene glycol + yolk hen's egg diluent + CCC;  $T_{\text{Ethylene glycol} + \text{CCC} + \text{preincubated}}$  – CCC diluted in isosmotic solution

(normal saline) 15 minutes before addition of the Tris ethylene glycol + yolk hen's egg diluent. Chapter 1 – Treatments were considered to be different if ( $P < 0.05$ ). The spermatic motility was affected by all treatments ( $P < 0.05$ ),  $T_{1.0}$  e  $T_{0.5}$  values were higher ( $33.45\% \pm 1.07$  and  $32.59 \pm 0.98$ , respectively) than  $28.62 \pm 1.05$  for the  $T_{\text{control}}$  and above the minimum value of 30%, required by CBRA (1998) for thawed semen. The motility for treatments:  $T_{1.5}$ ;  $T_{2.0}$ ;  $T_{2.5}$  and  $T_{3.0}$  were  $27.41 \pm 0.96$ ;  $26.55\% \pm 0.94$ ;  $25.89\% \pm 0.99$  e  $25.17\% \pm 1.06$ , respectively. The sperm vigor was not affected by the treatments ( $P > 0.05$ ), and their mean values were:  $T_{\text{control}}$  ( $2.1 \pm 0.07$ ),  $T_{0.5}$  ( $2.24 \pm 0.07$ ),  $T_{1.0}$  ( $2.4 \pm 0.08$ ),  $T_{1.5}$  ( $2.28 \pm 0.07$ ),  $T_{2.0}$  ( $2.13 \pm 0.07$ ),  $T_{2.5}$  ( $2.19 \pm 0.07$ ),  $T_{3.0}$  ( $2.26 \pm 0.09$ ). The percentage of cells with functional membrane in the supravital test in  $T_{0.5}$  ( $41.5 \pm 0.85$ ) was higher ( $P < 0.05$ ) than  $T_{\text{control}}$  ( $37.7 \pm 0.94$ ). The percentage of plasma membrane functionality did not change ( $P > 0.05$ ) among the treatments  $T_{2.0}$ ;  $T_{2.5}$ ;  $T_{1.0}$ ;  $T_{3.0}$  ( $38.06 \pm 0.91$ ;  $38.06 \pm 1.0$ ;  $36.33 \pm 0.81$ ;  $35.54 \pm 0.81$ ;  $34.77 \pm 1.13$ , respectively) as compared to  $T_{\text{control}}$  ones. The percentage of plasma membrane functionality for treatment  $T_{1.5}$  ( $30.65 \pm 0.98$ ) was lower ( $P < 0.05$ ) than all the others. No difference was found ( $P > 0.05$ ) in the integrity of plasma membrane by hypoosmotic test among  $T_{\text{control}}$  ( $28.55 \pm 1.01$ ),  $T_{2.5}$  ( $24.47 \pm 0.76$ ),  $T_{0.5}$  ( $24.21 \pm 0.82$ ),  $T_{1.0}$  ( $23.74 \pm 0.85$ ),  $T_{1.5}$  ( $21.92 \pm 1.18$ ),  $T_{2.0}$  ( $21.24 \pm 0.87$ ),  $T_{3.0}$  ( $19.68 \pm 0.88$ ). Chapter 2 – It was found difference among the averages of all treatments for the spermatic motility ( $P < 0.05$ )  $T_{\text{Glycerol} + \text{CCC} + \text{preincubated}}$  ( $37.08 \pm 2.17$ ),  $T_{\text{Glycerol} + \text{CCC}}$  ( $35.00 \pm 1.51$ ),  $T_{\text{Glycerol}}$  ( $29.55 \pm 2.81$ ),  $T_{\text{Ethylene glycol} + \text{CCC} + \text{preincubated}}$  ( $29.17 \pm 4.52$ ),  $T_{\text{Ethylene glycol} + \text{CCC}}$  ( $25.83 \pm 3.98$ ),  $T_{\text{Ethylene glycol}}$  ( $23.64 \pm 4.10$ ). The vigor of thawed semen was not affected by treatments used ( $P > 0.05$ ), whose averages are:  $T_{\text{Ethylene glycol} + \text{CCC} + \text{preincubated}}$  ( $2.96 \pm 0.31$ ),  $T_{\text{Ethylene glycol} + \text{CCC}}$  ( $2.91 \pm 0.12$ ),  $T_{\text{Glycerol} + \text{CCC} + \text{preincubated}}$  ( $2.75 \pm 0.2$ ),  $T_{\text{Ethylene glycol}}$  ( $2.59 \pm 0.35$ ),  $T_{\text{Glycerol} + \text{CCC}}$  ( $2.29 \pm 0.18$ ),  $T_{\text{Glycerol}}$  ( $2.22 \pm 0.18$ ). No difference was found ( $P > 0.05$ ) on the percentage plasma membrane integrity by hypoosmotic test on treatments  $T_{\text{Glycerol} + \text{CCC}/\text{preincubated}}$  ( $52.0 \pm 4$ ),  $T_{\text{Ethylene glycol} + \text{CCC}/\text{preincubated}}$  ( $49.65 \pm 5.9$ ),  $T_{\text{Glycerol} + \text{CCC}}$  ( $45.05 \pm 4.83$ ),  $T_{\text{Glycerol}}$  ( $44.8 \pm 2.31$ ),  $T_{\text{Ethylene glycol}}$  ( $44.39 \pm 4.66$ ),  $T_{\text{Ethylene glycol} + \text{CCC}}$  ( $39.6 \pm 4.96$ ). The functionality of the plasma membrane by supravital test was not affected by the treatments ( $P > 0.05$ ). The treatments averages were:  $T_{\text{Ethylene glycol} + \text{CCC}/\text{preincubated}}$  ( $29.0 \pm 3.82$ ),  $T_{\text{Ethylene glycol} + \text{CCC}}$  ( $26.96 \pm 4.73$ ),  $T_{\text{Glycerol} + \text{CCC}/\text{preincubated}}$  ( $24.5 \pm 4.2$ ),

$T_{\text{Glycerol} + \text{CCC}}$  ( $23.54 \pm 4.49$ ),  $T_{\text{Glycerol}}$  ( $20.79 \pm 3.35$ ),  $T_{\text{Ethylene glycol}}$  ( $19.45 \pm 4.08$ ). The ATP production by mitochondrial sheath was affected by treatments ( $P < 0.05$ ) and their means were:  $T_{\text{Ethylene glycol} + \text{CCC}}$  ( $62.92 \pm 8.34$ ),  $T_{\text{Ethylene glycol} + \text{CCC}/\text{preincubated}}$  ( $62.72 \pm 8.79$ ),  $T_{\text{Ethylene glycol}}$  ( $59.19 \pm 9.57$ ),  $T_{\text{Glycerol} + \text{CCC}/\text{preincubated}}$  ( $11.92 \pm 6.89$ ),  $T_{\text{Glycerol}}$  ( $11.64 \pm 5.43$ ),  $T_{\text{Glycerol} + \text{CCC}}$  ( $7.76 \pm 3.31$ ). The acrosomal membrane integrity means by treatments were:  $T_{\text{Ethylene glycol}}$  ( $78.19 \pm 5.82$ ),  $T_{\text{Ethylene glycol} + \text{CCC}/\text{preincubated}}$  ( $74.43 \pm 6.31$ ),  $T_{\text{Ethylene glycol} + \text{CCC}}$  ( $70.68 \pm 5.77$ ),  $T_{\text{Glycerol}}$  ( $47.06 \pm 4.31$ ),  $T_{\text{Glycerol} + \text{CCC}}$  ( $46.88 \pm 6.58$ ),  $T_{\text{Glycerol} + \text{CCC}/\text{preincubated}}$  ( $44.6 \pm 8.57$ ) and were influenced by the treatments ( $P < 0.05$ ). The plasma membrane integrity by fluorescent probes (Propidium iodide + diethyl carboxyfluorescein) were not affected by treatments ( $P > 0.05$ ) and their means were:  $T_{\text{Glycerol}}$  ( $63.98 \pm 8.4$ ),  $T_{\text{Glycerol} + \text{CCC}}$  ( $63.08 \pm 9.05$ ),  $T_{\text{Glycerol} + \text{CCC}/\text{preincubated}}$  ( $52.24 \pm 9.47$ ),  $T_5$  ( $52.09 \pm 10.88$ ),  $T_{\text{Ethylene glycol} + \text{CCC}/\text{preincubated}}$  ( $44.37 \pm 8.96$ ),  $T_{\text{Ethylene glycol}}$  ( $37.19 \pm 10.81$ ). Chapter 1 – It is concluded that the addition of 0.5 mg of CCC at spermatic concentration of  $200 \times 10^6/\text{mL}$  reduced the loss of integrity and functionality of the plasma membrane. However, the addition of 1.0 mg of CCC at the spermatic concentration  $200 \times 10^6/\text{mL}$  showed better results for sperm cell motility in post-thawed semen. Chapter 2 – It is concluded based on the results that the addition of 1.0 mg of CCC on the spermatic concentration of  $200 \times 10^6/\text{mL}$  did not affect the integrity neither the functionality of plasma membrane of goat sperm. The Tris + Ethylene glycol + yolk egg hen's yolk diluent did not alter the functionality of plasma membrane or vigor. Although it has a positive influence on the acrosomal membrane integrity, negatively affects the motility of the thawed sperm compared to solvent-based Tris-glycerol. The preincubation of sperm with CCC does not alter the characteristics of sperm vigor, and integrity and functionality of the plasma membrane, but positively affect the motility of the thawed sperm.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Assim como em outros segmentos do agronegócio brasileiro, na caprinocultura existe demanda crescente pela aplicação de inovações tecnológicas que proporcionem melhorias na atividade. Essa demanda tem estimulado a realização de fóruns e o estabelecimento de redes de trabalho com esse enfoque, como é o caso da Rede de Inovação Tecnológica da Caprinocultura e Ovinocultura do Nordeste, formada em 2010, com a qual dialogam a Embrapa e as instituições de pesquisa de alguns estados nordestinos (TEIXEIRA *et al.*, 2013). Apesar das dificuldades, as técnicas de reprodução assistida como inseminação artificial (IA), superovulação e transferência de embriões têm sido ferramentas usadas no melhoramento genético de caprinos e, também, para aumentar a eficiência reprodutiva (PARAMIO, 2010). A IA em combinação com outras técnicas conhecidas, como a indução ou sincronização do cio, permite a produção de crias, carne e leite em períodos do ano em que não ocorreriam naturalmente, pelo fato de os caprinos serem poliêstricos estacionais de dias curtos (CORTEEL *et al.*, 1988). Esta técnica visa ao uso intensivo de reprodutores portadores de genes desejáveis, pois propaga os genes com maior rapidez, o que facilita a avaliação genética de um indivíduo de forma eficiente, quando comparada à monta natural (HERMAN *et al.*, 1994).

Sob esse ponto de vista, é interessante desenvolver técnicas que preservem o sêmen por longo tempo (LIMA *et al.*, 1994). Outra vantagem da IA é o congelamento do sêmen, que é uma das alternativas de aproveitamento de reprodutores nos casos de quiescência sexual do macho (WESTHUYSEN, 1978). De acordo com Traldi (1994), nas inseminações artificiais o sêmen de caprino pode ser utilizado fresco, resfriado ou congelado. O autor afirmou que o sêmen congelado pode ser preservado por longo período, mantido em nitrogênio líquido (-196 °C), tornando-se de maior aplicabilidade quando comparado ao sêmen resfriado, cuja viabilidade máxima seria de aproximadamente 24 horas. No entanto, o processo de criopreservação seminal é deletério aos espermatozoides, devido à formação de cristais de gelo intracelular e à instabilidade da membrana plasmática, que leva à perda de integridade,

motilidade e funcionalidade normal da célula espermática. A desestabilização da membrana ocorre na transição da fase fluida para a fase gel, durante a diminuição da temperatura no processo de criopreservação. Alguns danos podem ser diminuídos pela adição de lipídios ao sêmen antes dos processos de resfriamento e congelamento (SMITH; POLGE, 1950).

Na incubação com células em cultura, a ciclodextrina transfere o colesterol abaixo de gradiente de concentração, da membrana plasmática da célula para dentro da sua região hidrofóbica. Esta retirada de colesterol causa alterações da estrutura e funcionalidade da membrana (ATGER *et al.*, 1997; OHVO *et al.*, 1997). Ciclodextrinas incubadas com espermatozoides, medeiam a remoção de colesterol que induz à capacitação (CHOI; TOYODA, 1998; CROSS, 1999; VISCONTI *et al.*, 1999). Alternativamente, se são carregadas com colesterol, as ciclodextrinas transferem-no abaixo do gradiente de concentração para a membrana plasmática do espermatozoide, resultando em aumento dos níveis de colesterol da membrana (KLEIN *et al.*, 1995; PURDY; GRAHAM, 2004; MOORE *et al.*, 2005).

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Espermatozoides**

A espermatogênese e a maturação espermática são processos típicos de diferenciação celular. Essas modificações reestruturam os componentes celulares e transformam a célula imóvel em uma espermátide oval e, em seguida, em um espermatozoide com motilidade (YAFFE, 1997).

Os espermatozoides são formados por duas partes funcionais e morfológicamente distintas: a cabeça e a cauda, ligadas pelo colo, sendo esta uma peça de conexão. Adquirem suas formas características na fase pós-meiótica (espermiogênese), caracterizada pelo extensivo remodelamento das espermátides, com formação do acrossoma espermático, condensação nuclear, desenvolvimento do flagelo e perda de grande parte do citoplasma. Como resultado desses eventos, tem-se uma célula altamente diferenciada em estrutura e função, com capacidade de se combinar com o ovócito para iniciar um novo indivíduo (KNOBIL; NEILL, 2006).

### **2.2. Morfologia espermática**

Os espermatozoides são células haploides especializadas que têm habilidade limitada para biossíntese e regeneração celular (AMANN; GRAHAN, 1993). Cada região tem sua importância funcional na fertilização dos oócitos: a cabeça possui núcleo, acrossoma, região pós-acrossomal e membrana plasmática; o núcleo do espermatozoide possui DNA altamente condensado, que é rodeado por um envelope nuclear (AMANN; GRAHAN, 1993); o colo, peça intermediária, principal e terminal, compõe a cauda do espermatozoide. O colo conecta a cabeça à peça intermediária, e forma uma placa basal que se ajusta dentro de uma depressão na superfície posterior do núcleo; e as três peças que formam a cauda são responsáveis pela motilidade espermática (KNOBIL; NEILL, 2006).

### 2.3. Membrana espermática

A membrana plasmática é formada por uma bicamada lipídica, com proteínas integrais e periféricas, glicoproteínas de superfície e glicolipídios organizados em um mosaico fluido. As proteínas integrais e periféricas estão entremeadas ao longo da bicamada lipídica. As membranas são impermeáveis a grande parte dos solutos polares, porém são permeáveis a substâncias apolares (SINGER; NICHOLSON, 1972). Os lipídios são responsáveis pela integridade estrutural, enquanto as proteínas são as principais responsáveis pela ocorrência de vários processos dinâmicos e os carboidratos têm papel importante na interação das células (AMANN; GRAHAM, 1993). Os fosfolipídios formam uma bicamada onde as regiões apolares das moléculas lipídicas de cada camada interagem entre si na parte interior da bicamada e as regiões polares interagem na fase aquosa, ou seja, na fase externa (WATSON, 1981). Essa barreira hidrofóbica previne a entrada de água e outras moléculas. Em temperatura corporal, a membrana plasmática encontra-se em estado fluido e o arranjo lamelar permite a movimentação dos fosfolipídios ao longo da bicamada (AMANN; GRAHAM, 1993).

A composição lipídica da membrana plasmática varia entre os mamíferos, mas, em geral, possui cerca de 70% de fosfolipídios, 25% de lipídios neutros e 5% de glicolipídios, estando distribuídos assimetricamente entre os dois folhetos da bicamada. A relação entre colesterol e fosfolipídio é o que determina a fluidez da membrana. As regiões de membrana com elevado teor de colesterol possuem menor fluidez. A relação colesterol/fosfolipídio da membrana plasmática dos espermatozoides de carneiros e bodes aumenta durante o trânsito epididimário (PARKS; HAMMERSTEDT, 1985; RANA *et al.*, 1991), mas diminui em ratos e garanhões (HALL *et al.*, 1991) e não se altera em cachacos (NIKOLOPOULOU *et al.*, 1985). Segundo Darin-Bennet *et al.* (1977), as espécies que possuem maior concentração de colesterol apresentam menores danos causados à membrana, durante o procedimento de congelamento. Com isto, observa-se que o colesterol é o componente da membrana plasmática mais variável, possuindo relação direta com a reação acrossômica (HARRISON; GADELLA, 2005).



A relação entre colesterol e fosfolipídios na espécie ovina é de 0,85 (HOLT; NORTH, 1985); 0,83 na espécie humana (MACK *et al.*, 1986); 0,36 na espécie equina (AMANN; GRAHAM, 1993); 0,20 em suínos (PARKS; GRAHAM, 1992); e em bovinos varia entre 0,51 e 0,53 (PARKS *et al.*, 1991). Quando a relação entre o colesterol e fosfolipídio é alterada, ou seja, a relação encontra-se menor que 1:2, o processo de resfriamento causa um rearranjo devido à fase de transição do estado líquido para o cristalino (AMANN; PICKETT, 1987). Essa mudança nas membranas celulares ocorre quando a temperatura alcança o ponto de transição, conseqüentemente para adquirir uma boa taxa de sobrevivência dos espermatozoides após o congelamento, devem-se estabelecer velocidades de resfriamento e aquecimento adequadas (MAZUR, 1984).

#### **2.4. Alterações nas membranas celulares decorrentes do resfriamento e congelamento seminal**

Essas injúrias ocorrem porque a 37 °C os lipídios encontram-se dispostos de forma aleatória e em estado de fluidez. Durante o resfriamento as membranas celulares passam pela fase termotrófica de transição, em que a membrana passa do estado fluido (estado fisiológico) para a forma de gel (WATSON, 1981; MAZUR, 1984), ocorrendo um alongamento das cadeias de ácidos graxos, o que resulta em aumento na rigidez da membrana. Os lipídios que possuem estruturas semelhantes se agrupam, originando estruturas cristalinas com forma hexagonal. Esse arranjo favorece o deslocamento das proteínas para esses locais, que se fundem e formam agregados proteicos que resultam em aumento na permeabilidade da membrana e diminuição do metabolismo celular, sendo esse efeito denominado choque térmico (AMANN; GRAHAM, 1993). As membranas plasmáticas com concentração de colesterol mais elevada em sua composição (humanos 0,99 e coelhos 0,88) têm menor suscetibilidade ao choque térmico (AMORIM, 2008).

Nessa fase, dependendo do grau de saturação de cada classe de fosfolipídios e glicolipídios, a gelificação ocorre em diferentes temperaturas. Se a taxa de resfriamento for alta, esse efeito é exacerbado e as categorias dessas moléculas tendem a se agrupar, desarranjando a estrutura da

membrana. Como consequência, algumas dessas moléculas perdem a forma de bicamada durante o reaquecimento e formam uma estrutura circular, em monocamada, chamada de hexagonal II. Essa estrutura aumenta a permeabilidade da membrana, levando à perda de conteúdo celular, ATP, ácidos nucleicos, fosfolípidios, enzimas metabólicas e potássio, além de aumentar a permeabilidade da membrana aos cátions e à água (PARKS; GRAHAM, 1992; WATSON, 1995; WATSON, 2000).

As alterações da fase lipídica e/ou o aumento na peroxidação lipídica da membrana plasmática têm como consequências a redução na velocidade e na porcentagem de espermatozoides móveis, além de alterações no volume da água intracelular. Como resultado dessas modificações, ocorre o estresse mecânico na membrana devido à desestabilização de sua bicamada lipídica e às alterações dos componentes da membrana celular, como: desnaturação das proteínas da membrana e alteração no metabolismo energético celular, na osmolaridade e no pH (WATSON, 2000). A peroxidação ocorre porque os espermatozoides possuem em suas membranas grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados e baixas concentrações de enzimas antioxidantes, como consequência os danos peroxidativos induzem à formação de espécies reativas ao oxigênio (ROS), o que leva à redução da viabilidade e fertilidade dos espermatozoides. Para proteção do efeito da formação excessiva de ROS a célula possui um sistema de defesa antioxidante no plasma seminal, porém para a criopreservação há necessidade da prévia diluição do sêmen e, conseqüentemente, de diminuição de antioxidantes fisiológicos (HSU *et al.*, 1998).

Para minimizar esses efeitos, recomenda-se resfriamento lento para o sêmen ovino, principalmente entre 15 e 5 °C (SALAMON; MAXWELL, 1995), visto que, o resfriamento rápido entre 30 e 15 °C aparentemente não afeta sua viabilidade após o descongelamento (FISER; FAIRFULL, 1986). O início do estresse sofrido pelos espermatozoides ocorre durante o resfriamento a 5 °C; esta fase caracteriza-se pela transição da membrana do estado líquido cristalino para o estado de gel. Com o objetivo de amenizar o choque térmico, a taxa de resfriamento deve ser controlada e os lípidios ou as lipoproteínas devem ser adicionados ao diluente, além da utilização da taxa de resfriamento de forma lenta (-0,05 °C/min; MEDEIROS *et al.*, 2002). Outra fase crítica de

temperatura é durante o congelamento, de -15 a -60 °C (MAZUR, 1984). Entre -5 e -15 °C, ocorre formação de cristais de gelo no meio extracelular, porém o conteúdo celular ainda permanece resfriado. Com a formação dos cristais a concentração dos solutos extracelulares aumenta e, conseqüentemente, a célula perde água para o meio externo. Entre -15 e -60 °C, a taxa de congelamento irá predizer o grau de desidratação celular. Se a taxa de congelamento for lenta, haverá tempo suficiente para a célula perder água por exosmose e, assim, evitar a cristalização no interior da célula. Ao contrário, altas taxas de congelamento não permitem desidratação suficiente, o que leva à formação de cristais de gelo intracelulares. Esses cristais lesam as membranas espermáticas, provocando, muitas vezes, a morte celular (MAZUR, 1984). No entanto, Byrne *et al.* (2000) demonstraram que quando submetidos a uma taxa de congelamento rápida os espermatozoides possuem maior capacidade de fecundação *in vitro* e maiores taxas de fecundação após inseminação, quando comparados com os congelados de forma lenta.

Pequenos cristais de gelo são termodinamicamente instáveis e, durante o descongelamento, tendem a se fundir, formando cristais de gelo maiores. Esse fenômeno é chamado “recristalização”, e quando ocorre no meio intracelular, dependendo do tamanho e da quantidade de cristais, pode levar a lesões de membrana e morte celular (MAZUR, 1984). Daí a importância do método de descongelamento, que deve ser rápido o suficiente para impedir a recristalização, sem reduzir a viabilidade espermática. Paulenz *et al.* (2007) trabalharam com duas temperaturas de descongelamento de sêmen de ovinos (a 50 °C por 9 s e a 35 °C por 12 s) e não encontraram diferença na fertilidade após a inseminação no fundo de saco vaginal. Nordstoga *et al.* (2009) também não encontraram diferença nas taxas de fertilidade após a inseminação, quando descongelaram o sêmen de ovinos a 35 °C por 20 s ou a 70 °C por 9 s. Assim, não havendo diferença na fertilidade, a temperatura de descongelamento mais frequentemente utilizada é de 35 a 37 °C, por ser fácil de ser atingida a campo e por não haver perigo de morte celular por prolongado tempo de exposição às altas temperaturas.

Constata-se, então, que tanto o congelamento quanto o descongelamento do sêmen promovem alterações no espermatozoide, devido à cristalização da água e a mudanças osmóticas no meio extracelular, o que leva

ao aumento da permeabilidade da membrana, reduz a atividade metabólica e causa danos no acrossoma e em outras estruturas, além de alterações nas concentrações de eletrólitos intracelulares. Como consequência dessas alterações, ocorre a perda da fertilidade dos espermatozoides (HOFMO; ALMLID, 1990).

## **2.5. Plasma seminal caprino**

Várias técnicas de preservação de sêmen bovino foram adaptadas empiricamente para a conservação do sêmen caprino, sem obtenção de muito sucesso. Utilizaram-se diluentes à base de gema de ovo ou leite por décadas para esse propósito, com sucesso limitado (AMOA; GELAYE, 1997). A diluição do sêmen caprino em diluentes contendo gema de ovo ou leite desnatado poderia ser nociva para as células espermáticas (IRITANI e NISHIKAWA, 1963). Segundo Roy (1957), corroborado por Gibbons (2002), a secreção da glândula bulbouretral possui uma enzima (EYCE) que coagula a gema de ovo. Os autores ainda afirmaram que na presença de cálcio a enzima EYCE, que é uma fosfolipase A, atua como catalisadora e hidrolisa a lecitina da gema de ovo em ácidos graxos e lisolecitina. Uma atividade fusogênica na membrana dos espermatozoides é promovida pela reação hidrolítica, induzindo à reação acrossômica e à descondensação da cromatina. Uma fração glicoproteica do plasma seminal de caprinos (SBUIII), também originada das glândulas bulbouretrais, interage com o diluente à base de leite, provocando inibição da motilidade espermática, ruptura do acrossoma e morte celular espermática. A SBUIII, identificada por Nunes (1982), é responsável por hidrolisar triglicerídeos de membrana plasmática e também os triglicerídeos contidos no leite desnatado, resultando em um ácido graxo, o ácido oleico, que é tóxico aos espermatozoides (PELLICER-RUBIO *et al.*, 1997).

Segundo Nunes (1982), o efeito deletério do plasma seminal se deve à secreção de grandes quantidades de fosfolipase A, agindo sobre os fosfolípidos dos diluentes. O autor demonstrou que o congelamento do sêmen caprino diluído em leite, contendo acima de 10 mg de fosfolípidos, causa a morte de todos os espermatozoides.

O método convencional de superar as interações prejudiciais do plasma seminal e das proteínas da gema de ovo ou do leite é diluir a amostra de sêmen caprino em um diluente tamponado e, então, separar o plasma seminal dos espermatozoides pelo meio de centrifugação a 550-950 x g, durante 10 a 15 minutos (PURDY, 2006). Entretanto, Aboagla e Terada (2004a) sugerem a centrifugação do sêmen caprino diluído em Tris (Tris-hidroximetil-aminometano -  $\text{H}_2\text{NC}(\text{CH}_2\text{OH})_3$ ) citrato-glucose a 1.600 x g, em duas etapas de 30 minutos cada. No entanto, ainda não se chegou a um consenso no que diz respeito à necessidade de retirada do plasma seminal.

Ritar e Salamon (1982) sugerem que o diluente à base de Tris, gema de ovo e glicerol deve ser adicionado ao sêmen caprino sem a retirada do plasma seminal, sendo a proporção de gema de ovo e glicerol de 2 e 4 %, respectivamente. Chauhan e Anand (1990) constataram que a criopreservação do sêmen caprino em diluente à base de Tris-gema de ovo, sem a remoção do plasma seminal, produz altas taxas de fertilidade. Azeredo *et al.* (2001) verificaram que a motilidade dos espermatozoides sofre aumento quando o plasma seminal está presente, e que a percentagem de espermatozoides com membranas lesadas aumenta com a retirada do plasma seminal por centrifugação, sendo acentuada, ainda, pelos processos de criopreservação e descongelamento, o que indica que a remoção do plasma seminal seria prejudicial para o sêmen caprino criopreservado. Abad *et al.* (2007) constataram que quando o plasma seminal é adicionado ao sêmen descongelado ocorre a “reversão” da capacitação precoce induzida pelo processo de criopreservação. No entanto nenhum aumento de fertilidade, após a inseminação artificial, foi observado.

## **2.6. Coleta e avaliação de sêmen caprino**

A coleta de sêmen caprino geralmente é realizada com o uso de vagina artificial, mas pode-se fazer também pelo eletro ejaculador, ou ainda pelo acesso cirúrgico à cauda do epidídimo (KUNDU *et al.*, 2002). Segundo Lima (2008), a eletro ejaculação é um método pouco utilizado para a coleta de sêmen na espécie caprina, ficando reservado às situações em que o animal encontra-se impossibilitado de realizar a monta por problemas ou defeitos adquiridos. A vagina artificial é um instrumento que simula as condições de

pressão e temperatura de uma vagina natural. Para a coleta, é necessário utilizar uma cabra com estro induzido ou natural como manequim, para que o macho realize o salto. É extremamente importante a manutenção do sêmen sob a proteção da luz solar e poeira, além de evitar agitações bruscas (GRANADOS *et al.*, 2006).

Gibbons (2002) ressalta que para obter ejaculados de melhor qualidade é preciso estabelecer um programa de coleta semanal de sêmen caprino, que geralmente consiste na realização de uma coleta por dia, durante cinco dias, com descanso de 48 horas, utilizando-se bodes a partir de setea oito meses de idade. No entanto, vários outros modelos de programas também são sugeridos e cabe ao pesquisador ou operador adotar o que melhor lhe atender. Após a coleta, o sêmen caprino deve ser avaliado de acordo com parâmetros macro e microscópicos.

## **2.7. Diluentes**

Os ejaculados da maioria dos animais domésticos contêm mais espermatozoides que o necessário para uma fecundação. O sêmen diluído pode ser utilizado para uma série de inseminações, devendo-se considerar o número mínimo de espermatozoides móveis como parâmetro para determinar o número de doses inseminantes do ejaculado, potencializando seu uso (AZEVEDO *et al.*, 2000).

De acordo com Neves *et al.* (1983), a elevada concentração espermática seria extremamente prejudicial à célula espermática, por determinar uma intensa atividade metabólica com rápido acúmulo de catabólitos no plasma seminal. A diminuição da concentração, até certo limite, poderia resultar em maior proporção diluente/espermatozoide, aumentando a proteção celular. Por outro lado, elevadas diluições podem resultar em congelabilidade inadequada do sêmen (AZEVEDO *et al.*, 2000).

As principais características de um diluente são: a extensão do volume, buscando-se aumentar a quantidade de doses inseminantes e conseqüentemente o número de animais inseminados; o efeito tamponante, visto que os espermatozoides possuem fraca resistência contra alterações de pH; a manutenção da pressão osmótica, mantendo o diluente o mais próximo

possível da pressão do plasma seminal (285 mOsm), pela adição de substâncias como açúcares; o substrato energético, sendo também os açúcares que provêm energia para espermatozoides; e por último a atividade antimicrobiana, que consiste na adição de antibióticos, a fim de reduzir a transmissão de bactérias patogênicas e a carga de bactérias não patogênicas que contaminam o sêmen (WATSON, 1979).

Gibbons (2002) sugere que um diluente para ser usado na criopreservação do sêmen caprino deve ser constituído por substâncias tampão, como o Tris e o citrato de sódio; fontes energéticas, como a glicose e a frutose; crioprotetores externos como a gema de ovo ou o leite, ou internos, como o glicerol e o etileno glicol; e antibióticos, sendo a penicilina e a estreptomina as mais utilizadas. O Tris é o principal componente básico dos diluentes de sêmen caprino utilizados rotineiramente (CHOE *et al.*, 2006). É uma substância solúvel em água, disponível comercialmente em um alto grau de pureza na forma de cristais. Atua como tampão iônico bipolar em pH entre 7,0 e 9,0 (MCPHAIL; GOODMAN, 1984). Kober (1985), citado por Rodrigues (1997), reportou que o Tris não apenas apresenta atividade tamponante, mas também atua na redução do metabolismo da frutose pela célula espermática, contribuindo assim para a preservação de sua energia.

Campos (1999), em um estudo para verificar a viabilidade da água de coco em pó como diluente para o congelamento do sêmen caprino, constatou que, quando o sêmen foi criopreservado a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ , ela se comportou como ótimo diluidor.

O leite é um líquido orgânico com importante propriedade biológica para a conservação dos espermatozoides, por possuir certa capacidade tampão, ação bactericida, viscosidade adequada para manutenção dos espermatozoides no meio líquido e abundância de carboidratos que seriam utilizados pelos espermatozoides na produção de energia, sendo também uma boa alternativa como diluente (BETINI *et al.*, 1998). A lactose também age como elemento energético, e a caseína é uma substância capaz de potencializar a atividade cinética dos espermatozoides (CUNHA, 2002). Souza *et al.* (2006) citam o uso de um diluente à base de leite em pó desnatado para o congelamento do sêmen de caprinos, mas recomendam a adição do antibiótico gentamicina na concentração de 13,3 mg/mL, visando controlar a

contaminação bacteriana nas amostras. Dorado *et al.* (2007) demonstraram que amostras de sêmen caprino congeladas nesse diluente promovem taxas de gestação superiores àquelas obtidas com o Tris.

Aboagla e Terada (2004a) estudaram o uso de um diluente à base de Trealose e gema de ovo para criopreservação do sêmen de caprinos e verificaram, após descongelamento, motilidade espermática de 73 % e motilidade progressiva de 57 %, enquanto os resultados para Tris-citrato-gema ficaram em 59 e 46 %, sendo o seu uso uma alternativa viável. Porém, os autores reportam a necessidade de maiores estudos com este diluente.

## **2.8. Crioprotetores**

A criopreservação do sêmen altera as características das membranas dos espermatozoides, interferindo na sua capacidade fertilizante. Durante as fases de congelamento e descongelamento, ocorrem flutuações no volume celular, que contribuem para o dano celular quando os limites de tolerância das membranas são ultrapassados (BECKER-SILVA, 2004).

Os espermatozoides submetidos a essa técnica sofrem injúrias e morte, devido à formação de cristais de gelo no seu interior. Este fenômeno físico ocorre quando rápidas taxas de resfriamento são usadas. Além disso, ocorre o desenvolvimento de regiões com elevada concentração de soluto, que desidratam a célula quando taxas lentas de resfriamento são usadas (AZEVEDO *et al.*, 2000).

Buscando reduzir as injúrias causadas às células durante o processo de criopreservação, diversas substâncias foram estudadas e mostraram-se úteis como agentes crioprotetores. Os crioprotetores mais utilizados nos diluentes de sêmen são as macromoléculas, como a caseína do leite, as proteínas da gema de ovo e o glicerol (EVANS; MAXWELL, 1987). Conforme Gil *et al.* (2003), o uso de aditivos de origem animal como gema de ovo e leite na diluição pode implicar riscos sanitários, não apenas pela inclusão de agentes microbiológicos, mas também por contaminantes que podem comprometer a qualidade do produto.

Os agentes crioprotetores podem ser classificados em não penetrantes, aqueles que aumentam a osmolaridade do meio extracelular, sendo responsá-



veis pela passagem da água do interior da célula espermática para o meio extracelular, impedindo, assim, a formação de cristais de gelo em seu interior durante a criopreservação; e em agentes crioprotetores penetrantes, que são substâncias ou fármacos que diminuem as lesões de origem química ou mecânica que a criopreservação causa sobre a célula. As características físico-químicas ideais que devem possuir são: baixo peso molecular, alta solubilidade em meio aquoso e baixa toxicidade celular (GONZALEZ, 2004).

A gema de ovo de galinha protege a membrana plasmática da célula espermática, restaurando fosfolípidios perdidos durante o choque térmico oriundo da mudança de temperatura que ocorre durante o resfriamento do sêmen. Acredita-se que essa proteção possa ser devido à presença de uma lipoproteína chamada fosfatidilcolina. Durante o choque térmico as lipoproteínas interagem com a estrutura lipídica da membrana plasmática das células espermáticas e propiciam a proteção (FOULKES, 1977). Aboagla e Terada (2004b) sugerem que a adição de gema de ovo aos diluentes para o sêmen de caprino aumenta a proporção de espermatozoides móveis recuperados após o descongelamento. Os autores citam que a combinação de gema de ovo e glicerol promove injúria ao acrossoma, mas quando estes componentes são usados separadamente não há tamanha injúria.

Segundo Aboagla e Terada (2004a), a adição de dodecil-sulfato de sódio (SDS) aumenta a solubilização das substâncias contidas na gema de ovo, fazendo com que se tornem mais acessíveis aos espermatozoides, melhorando a congelabilidade do sêmen caprino. Bittencourt (2006) ressalta que a adição do Equex STM, que possui o SDS como substância ativa, promove melhoria na viabilidade espermática do diluente pós-descongelamento.

O glicerol, quimicamente considerado um álcool, é o principal crioprotetor utilizado para espermatozoides. Seu efeito se relaciona com a sua capacidade de ligação com a água e com a baixa dissociação com sais. Estas propriedades são favorecidas por sua capacidade de atravessar facilmente a membrana celular espermática, mantendo a osmolaridade interna e externa (GONZALEZ, 2004). Interage também com as cabeças polares dos fosfolípidios da membrana, baixando a temperatura de transição de fase dos lipídios da membrana e diminuindo a adesão entre as células (KUNDU *et al.*, 2001). Esse efeito crioprotetor do glicerol parece se estabelecer em menos de

5 minutos após sua adição (BECKER-SILVA, 2004). Apesar de seus efeitos protetores, em determinadas situações o glicerol pode ser tóxico à célula espermática, sendo importante determinar sua concentração ideal em cada diluente, para que possa proporcionar um efeito benéfico ao sêmen. O glicerol, o dimetil-sulfóxido (DMSO) e o etileno glicol são utilizados em concentrações que variam de 1 a 8 %, obtendo-se melhores resultados quando se utiliza o glicerol a 6% (TULI; HOLTZ, 1994). Bittencourt *et al.* (2004) estudaram o efeito do etileno glicol como crioprotetor para o sêmen caprino, e constataram que seus efeitos tóxicos comprometem a qualidade do sêmen após o descongelamento. Já Silva *et al.* (2006) demonstraram que a dimetilformamida isolada ou associada ao glicerol não traz benefícios para a criopreservação de sêmen caprino.

A associação do glicerol com o dimetilsulfóxido também já foi estudada, tendo apresentado resultados positivos na criopreservação do sêmen desses animais (KUNDU *et al.*, 2001). Kundu *et al.* (2002) reportaram a associação de um polímero dextran ao glicerol e ao dimetil-sulfóxido e observaram incremento na motilidade do sêmen caprino coletado no epidídimo após a criopreservação.

## **2.9. Criopreservação seminal**

A criopreservação mantém a vida fértil do sêmen por um período indefinido à temperatura de -196 °C em nitrogênio líquido, entretanto grande quantidade de espermatozoides é morta no processo de congelamento e descongelamento do sêmen (NOAKES *et al.*, 2001).

A velocidade de congelamento é responsável pela cristalização e vitrificação da água intraespermática. Se há um congelamento mais lento, a cristalização da água livre extraespermática dá origem a uma exosmose e desidrata a célula espermática. O congelamento rápido evita essa desidratação dos espermatozoides e, conseqüentemente, promove menos danos à célula (AZEVEDO *et al.*, 2000).

É bem conhecido que o resfriamento rápido do sêmen dos ungulados, entre 30 e 0 °C, induz ao estresse letal para algumas células, sendo este proporcional à taxa de resfriamento, ao intervalo de temperatura e ao limite de

temperatura. Esse processo é conhecido como choque térmico, que afeta variavelmente as espécies (WATSON, 2000).

Portanto, a taxa de resfriamento adequada é necessária para prevenir danos estruturais, bioquímicos e biofísicos à membrana. Rovay *et al.* (2006) mostraram a maior eficiência do resfriamento não linear antes do congelamento, apresentando motilidade total e percentagem de células vivas maiores que quando submetidas ao resfriamento linear. A diminuição significativa da motilidade total e progressiva dos espermatozoides, assim como a fragmentação do DNA, pode ocorrer no sêmen criopreservado, quando comparado ao sêmen fresco. Os espermatozoides, quando congelados, são capazes de gerar espécies reativas ao oxigênio (ROS), e esta geração tem papel importante na capacitação espermática (LECLERC *et al.*, 1997), na reação acrossomal (de LAMIRANDE, 1998), na hiperativação (de LAMIRANDE; GAGNON, 1995) e na fusão do espermatozoide com o ovócito (AITKE *et al.*, 1995).

## **2.10. Colesterol**

O colesterol atua estabilizando a membrana plasmática e diminuindo o ponto transitivo característico ( $T_c$ ), no qual a membrana sofre mudança de fase, passando da fluida-cristalina para a fase gel (KIRK *et al.*, 2001). Além disso, a perda de colesterol pode causar capacitação prematura em células criopreservadas, reduzindo a viabilidade de espermatozoides criopreservados (WATSON, 1995).

A perda de colesterol da membrana plasmática de células criopreservadas tem sido observada em suínos (50%) e garanhões (28%) (MOORE *et al.*, 2005). Essa perda pode causar capacitação prematura em células criopreservadas, reduzindo a viabilidade de espermatozoides criopreservados na reprodução de fêmeas (WATSON, 1995).

Combes *et al.* (1998) constataram que o sêmen de alguns garanhões tratados com o complexo ciclodextrina-colesterol apresentou maior motilidade espermática e viabilidade seminal pós congelamento que o sêmen não tratado com o complexo ciclodextrina-colesterol. Os autores associaram essa maior viabilidade seminal à maior integridade de membrana espermática causada pela redução do tempo de transição entre a fase fluida e a fase gel.

Em estudo com células de levedura cultivada incorporadas com colesterol à membrana plasmática, constatou-se que o tempo de transição não ocorreu, diminuindo drasticamente os danos às membranas celulares (ROTTEN *et al.*, 1973).

## 2.11. Ciclodextrina

Ciclodextrinas são açúcares circulares, oligossacarídeos cíclicos, capazes de incorporar um lipídio (colesterol) no centro do círculo que compõe a estrutura, colocando o colesterol em um formato que permite sua incorporação à membrana plasmática do espermatozoide. Portanto, é um método conveniente para alterar o conteúdo de colesterol da célula (ATGER *et al.*, 1997; OHVO *et al.*, 1997).

Das múltiplas formas de ciclodextrinas, a  $\beta$ -ciclodextrina tem maior eficiência em aceitar o colesterol e aumentar a solubilidade da água quando metilada (YANCEY *et al.*, 1996). Metil- $\beta$ -ciclodextrinas removem o colesterol mais eficazmente, diminuindo a energia de ativação necessária para a saída de colesterol. As ciclodextrinas têm diminuição na energia de ativação porque as moléculas de colesterol da membrana são incorporadas na ciclodextrina sem formar uma fase intermediária aquosa. O colesterol pode passar diretamente da membrana plasmática para o núcleo hidrofóbico, sem entrar na fase aquosa. Essa propriedade permite que as ciclodextrinas sejam eficientes doadoras e receptoras de colesterol (CHRISTIAN *et al.*, 1997; CROSS, 1999).

A ciclodextrina carregada com colesterol tem sido utilizada para aumentar a viabilidade espermática em bovinos (PURDY; GRAHAM, 2004; MOCÉ; GRAHAM, 2006; AMORIM *et al.*, 2009), em garanhões (MOORE *et al.*, 2005; AMORIM, 2008) e em suínos (MAO *et al.*, 2005). Segundo Amorim *et al.* (2007), quando ocorre a incubação do complexo ciclodextrina-colesterol no sêmen de touros, há maior percentagem de células móveis e viáveis após o processo de criopreservação e descongelamento.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAD, M.; SPRECHER, D. J.; FRIENDSHIP, R. M.; KIRKWOOD, R. N. Effect of sperm cryopreservation and supplementing semen doses with seminal plasma on the establishment of a sperm reservoir in gilts. **Reprod. Dom. Anim.**, v.42, p.149-152, 2007.
- ABOAGLA, E. M. E.; TERADA, T. Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. **Theriogenology**, v. 62, p. 1160-1172, 2004b.
- ABOAGLA, E. M. E.; TERADA, T. Effects of the supplementation of the trehalose extender containing egg yolk with sodium dodecyl sulfate on the freezability of goat spermatozoa. **Theriogenology**, v. 62, p. 809-818, 2004a.
- AITKEN, R. J.; BUCKINIGHAM, D. W.; BRINDLE, J.; GOMES, E.; BAKER, H. W.; IRVINE, D. S. Analysis of sperm movement in relation to the oxidative stress created by leukocytes in washed sperm preparations and seminal plasma. **Hum. Reprod.**, v.10, p.2061-2071, 1995.
- AITKEN, R. J.; HARKISS, D.; BUCKINIGHAM, D. W. Relationship between iron-catalyzed lipid peroxidation potential and human sperm function. **J. Reprod. Fertil.**, v.98, p.257-265, 1993.
- AMANN, R. P.; GRAHAM, J. K. Spermatozoa function. In: McKINNON, A. O.; VOSS, J. L. (Ed.) **Equine reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p. 715- 745.
- AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Equine Veterinary Science**, v. 7, n. 3, p. 145-173, 1987.
- AMOAH, E. A.; GELAYE, S. Biotechnological advances in goat reproduction. **J. Anim. Sci.**, v. 75, p. 578-585, 1997.
- AMORIM, E. A.; GRAHAM, J. D.; SPIZZIRI, B. *et al.* The effect of adding Cholesteryl-Heptanoate – Palmitate – Pelargonate, or stearate loaded cyclodextrin on bull sperm cryosurvival. In: 40<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction (SSR), Proceeding 40<sup>th</sup> Annual Meeting of the SSR, July, San Antonio – TX – EUA, 2007.
- AMORIM, E. A. M. **Alteração da membrana espermática de suínos, bovinos e equinos na qualidade do sêmen**. 2008. 174 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2008.

AMORIM, E. A. M.; GRAHAM, J. K.; SPIZZIRI, B.; MEYER, 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.

ATGER, V. M.; DE LA LLERA MOYA, M.; STOUT, G. W.; RODRIGUEZ, W. V.; PHILLIPS, M. C.; ROTHBLAT, G. H. Cyclodextrins as catalysts for the removal of cholesterol from macrophage foam cells. **J. Clin. Invest.**, v. 99, p. 773-789, 1997.

AZEREDO, G. A.; ESPER, C. R.; RESENDE, K. T. Evaluation of plasma membrane integrity of frozen-thawed goat spermatozoa with or without seminal plasma. **Small Rum. Rese.**, v.41, p.257-263, 2001.

AZEVEDO, H. C.; MACHADO, R.; SIMPLÍCIO, A. A.; SOARES, A. T. Características do sêmen caprino congelado: influência do tipo de palheta e concentração espermática. **Rev. Cient. Rur.** v.5, n. 2, p.148- 157, 2000.

BECKER-SILVA, S. C. **Limites de tolerância do espermatozoide caprino a soluções hiperosmóticas de sacarose e taxa de sobrevivência após criopreservação em diluentes contendo sacarose ou trealose e concentrações reduzidas de crioprotetores permeantes.** 2004. 121 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2004.

BETINI, C. M.; MORAES, G. V.; RIGOLON, L. P. Efeito da congelação vertical e horizontal na qualidade do sêmen caprino. **Acta Sci.**, v. 20, p. 361-365, 1998.

BITTENCOURT, R. F.; RIBEIRO, A. L.; SANTOS, A. D. F.; FURST R.; TEIXEIRA, R. B. S.; CHALOUN, M.; PORTELA, A. P.; ALVES, S. G. G.; ALMEIDA, A. K.; GUIMARÃES, J. D. Utilização de glicerol e etilenoglicol com crioprotetores na congelação do sêmen caprino. **Ci. Anim. Bras.**, v. 5, p. 17-32, 2004.

BITTENCOURT, R. F. **Criopreservação de sêmen caprino: influência dos diluidores de congelação, tempos de equilíbrio e curvas de resfriamento.** 2006. 88 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2006.

BYRNE, G. P.; LONERGAN, P.; WADE, M. *et al.* Effect of freezing rate of ram spermatozoa on subsequent fertility in vivo and in vitro. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 265-275, 2000.

CAMPOS, A. C. N. **A água de coco criopreservada, proveniente de frutos de diferentes variedades e idades de maturação como diluidor do sêmen caprino.** 1999. 45 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 1999.

- CHAUHAN, M. S.; ANAND, S. R. Effect of egg yolk lipids on the freezing of goat semen. **Theriogenology**, v. 34, p. 1003-1013, 1990.
- CHOI, Y. H.; TOYODA, Y. Cyclodextrin removes cholesterol from mouse sperm and induces capacitation in a protein free medium. **Biol. Reproduction**, v. 59, p. 1328-1333, 1998.
- CHRISTIAN, A. E.; HAYNES, M. P.; PHILLIPS, M. C.; ROTHBLAT, G. H. Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. **J. Lipid Res.**, v. 38, p. 2264-2272, 1997.
- COMBES, G. B.; VARNER, D. D.; SCHROEDER, F.; BURGHARDT, R. C.; BLANCHARD, T. L. Effect of supplemental cholesterol on post-thaw motility and plasma membrane integrity of equine spermatozoa. In: PROCEEDINGS OF THE SEVENTH INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EQUINE REPRODUCTION, Pretoria, South Africa, 1998. p. 35-36.
- CORTEEL, J. M.; LEBOEUF, B.; BARIL, G. Artificial breeding of adult goats and kids induced with hormones to ovulate outside the breeding season. **Small Ruminant Research**, v.1, p. 19-35, 1988.
- CROSS, N. L. Effect of methyl-beta-cyclodextrin on the acrosomal responsiveness of human sperm. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 53, p. 92-98, 1999.
- CUNHA, I. C. N. **Criopreservação do sêmen de cães**. 2002. 149 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 2002.
- DARIN-BENNETT, A.; WHITE, I. G. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. **Cryobiology**, v. 14, p. 466-470, 1977.
- DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. **Hum. Reprod.**, v.10(suppl. 1), p.15-21, 1995.
- DE LAMIRANDE, E.; TSAI, C.; HARAKAT, A.; GAGNON, C. Involvement of reactive oxygen species in human sperm acrosome reaction induced by A23187, lysophosphatidylcholine, and biological fluidultrafiltrates. **J. Androl.**, v. 19, p. 585-594, 1998.
- DORADO, J.; RODRIGUEZ, I.; HIDALGO, M. Cryopreservation of goat spermatozoa: comparison of two based extenders based on post-thaw sperm quality and fertility rates after artificial insemination. **Theriogenology**, v. 68, p. 168-177, 2007.

- EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. Frozen storage of semen. In: **Salamon's artificial insemination of sheep and goats**. Wellington: Butterworths, 1987. p. 122-141.
- FISER, P. S.; FAIRFULL, R. W. Combined effects of glycerol concentration, cooling velocity, and osmolality of skim milk diluents on cryopreservation of ram spermatozoa. **Theriogenology**, v. 25, p. 473-484, 1986.
- FOULKES, J. A. The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on the motility and integrity of bovine spermatozoa. **J. Reprod. Fertil.**, v. 49, p. 277-284, 1977.
- GIBBONS, A. Inseminacion artificial con semen congelado en cabras da raza angora. **Rev. Taurus**, v.4, n. 16, p.24-32, 2002.
- GONZALEZ, R. A. F. **Efeito da criopreservação usando diferentes técnicas de congelação e crioprotetores sob parâmetros espermáticos e a integridade de membranas no espermatozoide bovino**. 2004. 94 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP, 2004.
- GRANADOS, L. B. C.; DIAS, A. J. B.; SALES, M. P. **Aspectos gerais da reprodução de caprinos e ovinos**. Campos dos Goytacazes, RJ: Projeto Proex/UENF, 2006. 54 p.
- HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. 7.ed. Barueri: Manole Ltda., 2004. 513p.
- HALL, J. C.; HADLEY, J.; DOMAN, T. Correlation between changes in rat sperm membrane lipids, protein, and membrane physical state during epididymal maturation. **J. Androl.**, v.12, p.76-87, 1991.
- HARRISON, R. A.; GADELLA, B. M. Bicarbonate-induced membrane processing in sperm capacitation. **Theriogenology**, v. 63, p. 342-351, 2005.
- HERMAN, H. A.; MITCHELL, J. R.; DOAK, G. A. **The artificial insemination and embryo transfer of dairy and beef cattle**. 8. ed. Danville: Interstate Publishers, 1994. 382 p.
- HOFMO, P. O.; ALMLID, T. Recents developments in freezing of boar semen with special emphasis on cryoprotectants. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 26, p. 111-122, 1990.
- HOLT, W. V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. **Theriogenology**, v. 53, p. 47-58, 2000.



- HOLT, W. V.; NORTH, R.D. Determination of liquid components and thermal phase transition temperature in an enriched plasma membrane fraction from spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 73, p. 285-294, 1985.
- HSU, P. C.; LIU, M. Y.; HSU, C. C. *et al.* Effects of vitamin E and/or C on reactive oxygen species-related lead toxicity in rat sperm. **Toxicology**, v. 128, p. 169-179, 1998.
- IRITANI, A.; NISHIKA, W. A. Studies on the egg-coagulating enzyme in goat semen; IV. On the position of yolk constituents attacked by the coagulating enzyme. **Jpn. J. Anim. Reprod.**, v. 8, p.113-117, 1963.
- KIRK, E. S.; GRAHAM, J. K.; SQUIRES, E. L. Increasing membrane cholesterol content benefits the motility of cooled equine semen. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v. 68, p. 317-318, 2001.
- KLEIN, U.; GIMPL, G.; FAHRENHOLZ, F. Alteration of the myometrial plasma membrane cholesterol content with beta-ciclodextrina modulates the binding affinity of the oxytocin receptor. **Biochemistry**, v. 34, n. 42, p. 3784-93, 1995.
- KNOBIL, E.; NEILL, J. D. **Physiology of reproduction**. 3. ed. Elsevier Academic Press, 2006. 589 p.
- KUNDU, C. N.; CHAKRABORTY, J.; DUTTA, P.; BHATTACHARYYA, D.; GHOSH, A.; MAJUMDER, G. C. Effect of dextrans on cryopreservation of goat cauda epididymal spermatozoa using a chemically defined medium. **Reproduction**, v. 123, p. 907-913, 2002.
- KUNDU, C. N.; DAS, K.; MAJUMDER, G. C. Effect of amino acids on goat cauda epididymal sperm cryopreservation using a chemically defined model system. **Cryobiology**, v. 41, p. 21-27, 2001.
- LECLERC, P.; DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Regulation of protein-tyrosine phosphorylation and human sperm capacitation by reactive oxigen derivatives. **Free Rad. Biol.Med.**, v. 22, p. 643-656, 1997.
- LIMA, A. J. **Coleta, conservação de sêmen e inseminação artificial de caprinos e ovinos**. 2008. Disponível em: <<http://www.serratalhada.net/meioambiente/mostra.asp?noticia=noticia22.asp>>. Acesso em: 29 jan. 2010.
- LIMA, S.; MORAES, G. V.; MOREIRA, H. L. M.; MACEDO, F. A. F.; MACEDO, L. G. P. Avaliação de épocas do ano sobre as características do sêmen de caprinos antes e após a congelação. **Rev. Unimar**, v. 16, n. 1, p. 181-194, 1994.
- MACK, S. R.; EVERINGHAM, J.; ZANEVELD, L. J. D. Isolation and partial characterization of the plasma membrane from human spermatozoa. **Journal of Experimental Zoology**, v. 240, n.1, p. 125-136, 1986.

- MAO, J.; WU, G. M.; PRATHER, R. S., SMITH, M. F.; CANTLEY, T.; RIEKE, A.; DIDION, B. A.; DAY, B. N. Effect of methyl- $\beta$ -cyclodextrina treatment of pig spermatozoa on in vitro fertilization and embryo development in the absence or presence of caffeine. **Theriogenology**, v. 64, p. 1913-1927, 2005.
- MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **American Journal of Physiology**, v. 247, p. 125-142, 1984.
- MAZUR, P.; RALL, W. F.; LEIBO, T. S. P. Kinetics of water loss and likelihood of intracellular freezing in mouse ova: influence of the method of calculating the temperature dependence of water permeability cell. **Biophysical Journal**, v. 6, p. 197-214, 1984.
- McPHAIL, D. B.; GOODMAN, B. A. Tris buffer – a case for caution in its use for cooper containing systems. **Biochem. J.**, v. 221, p. 559-560, 1984.
- MEDEIROS, A. S. L.; GOMES, G. M.; CARMO, M. T. *et al.* Cryopreservation of stallion sperm using different amides. **Theriogenology**, v. 58, p. 1-4, 2002.
- MOORE, A. I.; SQUIRES, E. L.; GRAHAM, J. K. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. **Cryobiology**, v. 51, p. 241-249, 2005.
- MORAES, E. A.; TORRES, C. A. A.; GUIMARÃES, J. D. *et al.* Fontes de óleo e níveis de suplementação de vitamina E na ração sobre a qualidade do sêmen suíno acondicionado a 17 e 5 °C. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 1450-1456, 2010.
- NEVES, J. P.; BLAYA, M. C. R.; TEIXEIRA, P. R. Efeitos da concentração espermática na dose de sêmen ovino congelado em minitubos. **A Hora Vet.**, v. 14, p. 11-14, 1983.
- NIKOLOPOULOU, M.; SOUCEK, D. A.; VARY, J. C. Changes in the lipid content of boar sperm plasma membranes during epididymal maturation. **Biochim Biophys**, v. 815, p. 486-498, 1985.
- NOAKES, D. E.; PARKISON, T. J.; ENGLAND, G. C. W. **Arthur's veterinary reproduction and obstetris**. 8. ed. London: Saunders, 2001. 868 p.
- NORDSTOGA, A. B.; SODERQUIST, L.; ÅDNØY, T. *et al.* Effect of different packages and freezing/thawing protocols on fertility of ram semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, Issue 3, June 2009.
- NUNES J. **Etude des effets du plama séminal sur la survie in vitro des spermatozoides de bouc**. 1982. 33 f. These de Doctorat, Université Pierre et Marie Curie, Paris 1982.

NUNES, J. F.; COMBARNOUS, Y. Utilização da água de coco e suas frações ativas como diluidor do sêmen dos mamíferos domésticos. In: ANAIS DO SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA DA REPRODUÇÃO DE ANIMAIS DOMÉSTICOS, Fortaleza, 1995. p. 53-64.

OHVO, H.; OLSIO, C.; SLOTTE, J. P. Effects of sphingomyelin and phosphatidylcholine degradation on ciclodextrina mediated cholesterol efflux in cultured fibroblasts. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 1349, p. 131-141, 1997.

PARAMIO, M. T. In vivo and in vitro embryo production in goats. **Small Ruminant Research**, v. 89, p. 144-148, 2010.

PARKS, J. E.; HAMMERSTEDT, R. H. Developmental changes occurring in lipids of ram epididymal spermatozoa plasma membranes. **Biol. Reprod.**, v. 32, p. 653-668, 1985.

PARKS, J. E.; MEACHAM, T. N.; SAACKE, R. G. Cholesterol and phospholipids of bovine spermatozoa. I. Selection of a PIPES – buffered diluents for evaluating the effect of egg yolk lipoproteins on sperm cholesterol and phospholipids. **Biology of Reproduction**, v. 24, n. 2, p. 393-398, 1981.

PARKS, J. E.; GRAHAM, J. K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v. 38, p. 209-222, 1992.

PAULENZ, H.; ÅDNØY, T.; SÖDERQUIST, L. Comparison of fertility results after vaginal insemination using different thawing procedures and packages for frozen ram semen. **Acta Veterinaria Scandinavica**, 2007. Disponível em: <<http://www.actavetscand.com/content/49/1/26>>. Acesso em: 12 out. 2013.

PELLICER-RUBIO, M. T.; MAGALLON, T.; COMBARNOUS, Y. Deterioration of goat sperm viability in milk extenders is due to a bulbourethral 60-kilodalton glycoprotein with triglyceride lipase activity. **Biol. Reprod.**, v. 57, p. 1023-1031, 1997.

POULOS, A.; VOGLMAYR, J. K.; WHITE, J. G. Phospholipid changes in spermatozoa during passage through the genital tract of the bull. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 306, p. 194-202, 1973.

PURDY, P. H. The post-thaw quality of ram sperm held for 0 to 48h at 5°C prior to cryopreservation. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 93, p. 114-123, 2006.

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

RANA, A. P.; MAJUMDER, G. C.; MISRA, S.; GHOSH, A. Lipid changes of goat sperm plasma membrane during epididymal maturation. **Biochim Biophys**, v. 1061, p. 185-196, 1991.

RITAR, A. J.; SALAMON, S. Effects of seminal plasma and of its removal and of egg yolk in the diluent on the survival of fresh and frozen-thawed spermatozoa of the Angora goat. **Aust. J. Biol. Sci.**, v. 35, p. 305-312, 1982.

RODRIGUES, B. A. **Efeito do diluidor à base de albumina sérica bovina (BSA) sobre a viabilidade *in vitro* do sêmen canino criopreservado.** 1997. 176 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre,RS, 1997.

ROTTEN, S.; YASHOUV, J.; NE´EMAN, A.; RAZIN, A. composition, ultra-structure and biological properties of membrane from mycoplasma mycoides var. capri cells adapted to grow with low cholesterol concentrations. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 323, p. 495-508, 1973.

ROVAY, H. **Efeitos de diferentes curvas de resfriamento, tempos de equilíbrio e crioprotetores permeáveis no congelamento de espermatozoides de caprinos.** 2006. 73 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2006.

ROY, A. Egg yolk coagulating enzyme in the semen and Cowper's gland of the goat. **Nature**, v. 179, p. 318–319, 1957.

SALAMON, S.; MAXWELL, W. M. C. Review. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. **Animal Reproduction Science**, v. 37, p. 185-249, 1995.

SILVA, A. F.; COSTA, E. P.; OLIVEIRA, F. A.; TORRES, C. A. A.; HASS, G. T. S.; NASCIMENTO, V. A. Uso da dimetil-formamida associada ou não com glicerol na criopreservação de sêmen caprino. **Rev. Bras. Zootec.**, v. 36, n. 2, p. 452-456, 2006.

SIMTH, A. F.; POLGE, C. Survival of spermatozoa at low temperature. **Nature**, v. 166, p. 668-671, 1950.

SINGER, S. J.; NICOLSON, G. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. **Science**, v. 175, p. 720-31, 1972.

SOUZA, A. F.; GUERRA, M. M. P.; COLETO, Z. F.; MOTA, R. A.; SILVA L. B. G.; LEÃO, A. E. D. S.; SOBRINHO, E. S. N. Avaliação microbiológica do sêmen fresco e congelado de reprodutores caprinos. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 43, p. 329-336, 2006.

TEIXEIRA, I. A. M.; GOMES, R. A.; CASTAGNINO, D. S. *et al.* Inovações tecnológicas na caprinocultura. **Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.** [online], v. 14, n. 1, p. 104-120, 2013.

TRALDI, A. S. **Tópicos em reprodução e inseminação artificial em caprinos.** São Paulo: [s.n.], 1994. 53 p. (apostila).

TULI, R. K.; HOLTZ, W. Effect of glycerolization procedure and removal of seminal plasma on post-thaw survival and GOT release from Boer goat spermatozoa. **Theriogenology**, v. 42, p. 547-555, 1994.

VISCONTI, P. E.; GALANTINO-HOMER, H.; NING, X.; MOORE, G. D.; VALENZUELA, J. P.; JORGEZ, C. J. Cholesterol efflux mediated signal transduction in mammalian sperm: beta-cyclodextrins initiate transmembrane signaling leading to an increase in protein tyrosine phosphorylation and capacitation. **Journal Biol. Chem.**, v. 274, p. 3235-42, 1999.

WATSON, P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction of Fertility Development**, v. 7, p. 871-891, 1995.

WATSON, P. F. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 °C by egg yolk lipoprotein. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 62, p. 483-492, 1981.

WATSON, P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post thawing function. **Reproduction Fertility and Development**, v. 7, p. 871-91, 1995.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 481-492, 2000.

WATSON, P. F. The preservation of semen in mammals. **Rev. Reprod. Biol.**, Oxford, v. 1, p. 183-350, 1979.

WESTHUYSEN, J. M. van der. Observations on the deep freezing of Angora goat semen. **S. Afr. J. Anim. Sci.**, v. 8, p. 11-113, 1978.

YAFFE, M. P. Mitochondrial morphogenesis: fusion factor for fly fertility. **Curr. Biol.**, v. 7, p. 782-783, 1997.

YAMASHIRO, H.; WANG, H.; YAMASHITA, Y.; KUMAMOTO, K.; TERADA, T. Enhanced freeze ability of goat spermatozoa collected into tubes containing extender supplemented with bovine serum albumin (BSA). **J. Reprod. Devel.**, v. 52, p. 407-414, 2006.

YANCEY, P. G.; RODRIGUEZA, W. V.; KILSDONK, E. P.; STOUT, G. W.; JOHNSON, W. J.; PHILLIPS, M. C.; ROTHBLAT, G. H. Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. Demonstration of kinetic pools and mechanism of efflux. **Journal Biology Chem.**, v. 271, n. 27, p. 16026-34, 1996.

**Avaliação da inclusão do colesterol carregado pela ciclodextrina à membrana plasmática do espermatozoide caprino, antes do congelamento**

**Resumo:** O objetivo deste estudo foi analisar, por meio da motilidade e do vigor espermáticos, a eficácia da adição de seis diferentes concentrações do complexo ciclodextrina-colesterol (CCC) em afetar a capacidade e intensidade de movimentação das células espermáticas após o processo de congelamento do sêmen caprino e também avaliar a integridade e funcionalidade da membrana plasmática do sêmen caprino descongelado. Cinco ejaculados foram coletados e fracionados de cinco reprodutores caprinos, saudáveis e com fertilidade comprovada. Uma fração foi utilizada como tratamento controle negativo ( $T_{controle}$ ), onde não foi incluído o CCC. Nas demais alíquotas adicionou-se o diluente de congelamento (à base de Tris-glicerol) junto com o CCC nas concentrações de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; e 3,0 mg, que foram consideradas como os tratamentos:  $T_{0,5}$ ;  $T_{1,0}$ ;  $T_{1,5}$ ;  $T_{2,0}$ ;  $T_{2,5}$ ; e  $T_{3,0}$ , respectivamente, com uma concentração espermática de  $[ ] = 200 * 10^6 / \text{mL}$ . Após o congelamento foram feitas as avaliações de motilidade e vigor espermáticos, o teste hiposmótico e o teste supravital. O valor de  $\alpha$  foi de 5% para todos os parâmetros avaliados. Constatou-se que todos os tratamentos apresentaram diferenças ( $P < 0,05$ ) para o parâmetro motilidade espermática e que os tratamentos  $T_{1,0}$  e  $T_{0,5}$  mostraram os maiores valores ( $33,45\% \pm 1,07$  e  $32,59\% \pm 0,98$ , respectivamente) em relação a  $28,62\% \pm 1,05$  do  $T_{controle}$  e acima do valor mínimo de 30%, preconizado pelo CBRA (1998) para sêmen descongelado. A motilidade espermática dos tratamentos  $T_{1,5}$ ;  $T_{2,5}$ ;  $T_{2,0}$  e  $T_{3,0}$  foram:  $27,41\% \pm 0,96$ ;  $26,55\% \pm 0,94$ ;  $25,89\% \pm 0,99$  e  $25,17\% \pm 1,06$ , respectivamente. O vigor espermático não variou ( $P > 0,05$ ) entre tratamentos, sendo:  $T_{controle}$  ( $2,1 \pm 0,07$ ),  $T_{0,5}$  ( $2,24 \pm 0,07$ ),  $T_{1,0}$  ( $2,4 \pm 0,08$ ),  $T_{1,5}$  ( $2,28 \pm 0,07$ ),  $T_{2,0}$  ( $2,13 \pm 0,07$ ),  $T_{2,5}$  ( $2,19 \pm 0,07$ ) e  $T_{3,0}$  ( $2,26 \pm 0,09$ ). O percentual de células com membrana funcional pelo teste supravital em  $T_{0,5}$  ( $41,5 \pm 0,85$ ) foi superior ( $P < 0,05$ ) ao do  $T_{controle}$  ( $37,7 \pm 0,94$ ), não tendo havido variações ( $P > 0,05$ ) nos percentuais médios entre os tratamentos:  $T_{2,0}$ ;  $T_{2,5}$ ;  $T_{1,0}$ ;  $T_{3,0}$  ( $38,06 \pm 0,91$ ;  $38,06 \pm 1,0$ ;  $36,33 \pm 0,81$ ;  $35,54 \pm 0,81$ ; e  $34,77 \pm 1,13$ , respectivamente), em relação ao  $T_{controle}$ . O percentual de membrana funcional do tratamento  $T_{1,5}$  ( $30,65 \pm 0,98$ ) foi inferior, ( $p < 0,05$ ) ao dos demais tratamentos. Diferenças não foram observadas ( $P > 0,05$ ) na integridade de membrana plasmática por meio do teste hiposmótico para  $T_{controle}$  ( $28,55 \pm 1,01$ ),  $T_{2,5}$  ( $24,47 \pm 0,76$ ),  $T_{0,5}$  ( $24,21 \pm 0,82$ ),  $T_{1,0}$  ( $23,74 \pm 0,85$ ),  $T_{1,5}$  ( $21,92 \pm 1,18$ ),  $T_{2,0}$  ( $21,24 \pm 0,87$ ) e  $T_{3,0}$  ( $19,68 \pm 0,88$ ), pelo teste de Kruskal-Wallis. Conclui-se que a adição de 0,5 mg do CCC ao sêmen com a concentração espermática de  $200 * 10^6 / \text{mL}$  diminui as perdas de integridade e funcionalidade da membrana plasmática. No entanto, a adição de 1,0 mg de CCC ao sêmen com a concentração espermática de  $200 * 10^6 / \text{mL}$  propicia melhor resultado na motilidade espermática após o descongelamento do sêmen.

**Palavras-chave:** caprinos; ciclodextrina-colesterol; membrana plasmática; sêmen.

## Evaluation of the addition of ciclodextrina-cholesterol compound to goat sperma plasma membrane, before cryopreservation

**Abstract:** The objective of this study was to analyze by spermatic motility and vigor the accuracy of six different of Ciclodextrin-Cholesterol Compound (CCC) concentrations on the spermatic motility and vigor effect after goat semen cryopreservation process and to evaluate the plasma membrane function and integrity of thawed goat semen. Five Billy goats were used and five samples were collected from each and then fractionated in seven aliquots. One aliquot did not receive the CCC been considered a negative control ( $T_{\text{control}}$ ), the others received the CCC in the following concentrations: 0.5; 1.0; 1.5; 2.0; 2.5; 3.0 mg for spermatic concentration of  $[ ] = 200 * 10^6/\text{mL}$ , being called treatments:  $T_{0.5}$ ;  $T_{1.0}$ ;  $T_{1.5}$ ;  $T_{2.0}$ ;  $T_{2.5}$ ; and  $T_{3.0}$ , respectively. The spermatic motility and vigor and thesupravital and hypoosmotic test were applied to the post-thaw semen. Treatments were considered to be different if ( $P < 0.05$ ). The spermatic motility was affected by all treatments ( $P < 0.05$ ),  $T_{1.0}$  e  $T_{0.5}$  values were higher ( $33.45\% \pm 1.07$  and  $32.59 \pm 0.98$ , respectively) than  $28.62 \pm 1.05$  for the  $T_{\text{control}}$  and above the minimum value of 30%, required by CBRA (1998) for thawed semen. The motility for treatments:  $T_{1.5}$ ;  $T_{2.0}$ ;  $T_{2.5}$  and  $T_{3.0}$  were  $27.41 \pm 0.96$ ;  $26.55\% \pm 0.94$ ;  $25.89\% \pm 0.99$  e  $25.17\% \pm 1.06$ , respectively. The sperm vigor was not affected by the treatments ( $P > 0.05$ ), and their mean values were:  $T_{\text{control}}$  ( $2.1 \pm 0.07$ ),  $T_{0.5}$  ( $2.24 \pm 0.07$ ),  $T_{1.0}$  ( $2.4 \pm 0.08$ ),  $T_{1.5}$  ( $2.28 \pm 0.07$ ),  $T_{2.0}$  ( $2.13 \pm 0.07$ ),  $T_{2.5}$  ( $2.19 \pm 0.07$ ),  $T_{3.0}$  ( $2.26 \pm 0.09$ ). The percentage of cells with functional membrane in the supravital test in  $T_{0.5}$  ( $41.5 \pm 0.85$ ) was higher ( $P < 0.05$ ) than  $T_{\text{control}}$  ( $37.7 \pm 0.94$ ). The percentage of plasma membrane functionality did not change ( $P > 0.05$ ) among the treatments  $T_{2.0}$ ;  $T_{2.5}$ ;  $T_{1.0}$ ;  $T_{3.0}$  ( $38.06 \pm 0.91$ ;  $38.06 \pm 1.0$ ;  $36.33 \pm 0.81$ ;  $35.54 \pm 0.81$ ;  $34.77 \pm 1.13$ , respectively) as compared to  $T_{\text{control}}$  ones. The percentage of plasma membrane functionality for treatment  $T_{1.5}$  ( $30.65 \pm 0.98$ ) was lower ( $P < 0.05$ ) than all the others. No difference was found ( $P > 0.05$ ) in the integrity of plasma membrane by hypoosmotic test among  $T_{\text{control}}$  ( $28.55 \pm 1.01$ ),  $T_{2.5}$  ( $24.47 \pm 0.76$ ),  $T_{0.5}$  ( $24.21 \pm 0.82$ ),  $T_{1.0}$  ( $23.74 \pm 0.85$ ),  $T_{1.5}$  ( $21.92 \pm 1.18$ ),  $T_{2.0}$  ( $21.24 \pm 0.87$ ),  $T_{3.0}$  ( $19.68 \pm 0.88$ ). It is concluded that the addition of 0.5 mg of CCC at spermatic concentration of  $200 * 10^6/\text{mL}$  reduced the loss of integrity and functionality of the plasma membrane. However, the addition of 1.0 mg of CCC at the spermatic concentration  $200 * 10^6/\text{mL}$  showed better results for sperm cellmotility in post-thawed semen.

**Key words:** caprine; cholesterol; ciclodextrina; plasmatic membrane; semen.

## 1. Introdução

A inseminação artificial aumenta o aproveitamento do potencial genético dos machos, nas diferentes espécies de produção (SELAIVE-VILARROEL, 1991). O desenvolvimento da inseminação artificial em caprinos, nos últimos 30 anos, associado ao aperfeiçoamento dos protocolos de indução e sincronização de estro, tornou possível um controle efetivo da reprodução nessa espécie sazonal, com todas as vantagens (e potenciais desvantagens) da aceleração do ritmo reprodutivo e de transferência de material genético (SIMÕES *et al.*, 2008).

A IA permite a testagem de jovens bodes sobre a sua descendência, por meio da inseminação de fêmeas de diversos rebanhos; facilita a difusão de genes dos melhores reprodutores machos; e aumenta a descendência dos machos selecionados, uma vez que um só ejaculado permite a inseminação de 20 a 40 fêmeas (SIMÕES *et al.*, 2008). Essa técnica tem seu potencial na difusão do material genético multiplicado pelo uso do sêmen congelado, uma vez que o uso do sêmen *in natura* ou resfriado é limitado pelo tempo de viabilidade relativamente curto (LANGFORD *et al.*, 1979). No entanto, o processo de congelamento do sêmen é deletério à célula espermática (PARKS; GRAHAN, 1992), embora o aumento da relação de colesterol – fosfolípídeo da membrana plasmática possa diminuir da ação deletéria do processo de congelamento seminal, por aumentar a estabilidade dessa membrana (COMBES *et al.*, 1998). Esse colesterol pode ser incorporado à membrana plasmática, sendo carregado por oligossacarídeos cíclicos de glicose que possuem um centro hidrofóbico capaz de incorporar lipídios, por exemplo as ciclodextrinas, aumentando a viabilidade espermática no descongelamento (AMORIM *et al.*, 2009). Com isto, acredita-se que o processo de congelamento seminal induz a alterações e lesões na constituição das membranas que levam à diminuição da viabilidade do sêmen. Por sua vez, a adição do colesterol controla essas alterações na estrutura da membrana celular, e em baixas temperaturas permite sua maior estabilidade. A ciclodextrina é capaz de incorporar o colesterol à membrana celular, com conseqüente maior proteção à integridade e funcionalidade da membrana plasmática dos espermatozoides durante o processo de congelamento seminal.



O objetivo deste estudo foi analisar, por meio da motilidade e do vigor espermáticos, a eficácia da adição de seis diferentes concentrações do complexo ciclodextrina-colesterol em diminuir as perdas de capacidade e intensidade de movimentação das células espermáticas após o processo de congelamento do sêmen caprino. Objetivou-se também avaliar a integridade e a funcionalidade da membrana plasmática do sêmen caprino descongelado.

## **2. Material e métodos**

### **2.1. Comissão de ética**

O estudo foi aprovado pela comissão de ética da Universidade Federal de Viçosa, sob o número de registro do projeto: 50553400777.

### **2.2. Data e local**

O estudo foi conduzido entre janeiro e março de 2011, no setor de Caprinocultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa. Viçosa localiza-se a 20°46'23" de latitude sul e 42°51'53" de longitude oeste, tem altitude média de 692,74 m e clima Cwa pela classificação de Köppen (inverno seco e verão úmido), com temperatura média anual de 19,4 °C e precipitação pluviométrica anual de 1.221 mm<sup>3</sup>.

### **2.3. Delineamento experimental**

Cinco partidas (ejaculados) foram coletadas e fracionadas de cinco reprodutores caprinos, saudáveis e com fertilidade comprovada. Uma fração foi utilizada como tratamento controle negativo ( $T_{\text{controle}}$ ), onde não foi incluído o complexo ciclodextrina-colesterol. Para as demais alíquotas foi adicionado o diluente de congelamento (à base de Tris-glicerol) junto com o complexo, nas concentrações de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; e 3,0 mg, para uma concentração espermática de  $[ ] = 200 \times 10^6/\text{mL}$ . Cada concentração do complexo formou um tratamento, sendo  $T_{0,5}$ ,  $T_{1,0}$ ,  $T_{1,5}$ ,  $T_{2,0}$ ,  $T_{2,5}$  e  $T_{3,0}$ , respectivamente. Após o congelamento foram feitas as avaliações de motilidade e vigor espermáticos, assim como os testes hiposmótico e supravital.

## 2.4. Preparo do complexo Ciclodextrina-Colesterol (CCC)

A metil- $\beta$ -ciclodextrina foi carregada com colesterol, tendo sido adotada a metodologia descrita por Purdy e Graham (2004), em que 200 mg de colesterol ( $C_{30}H_{48}O$ ; Sigma) foram dissolvidos em 1 mL de clorofórmio (JT-Baker), em um tubo de vidro. Em um béquer foi dissolvido 1 g de metil- $\beta$ -ciclodextrina (C4555; Sigma) em 2 mL de metanol (SYNTH). Em seguida, uma alíquota de 0,45 mL da solução de colesterol + clorofórmio foi adicionada à solução de ciclodextrina, e a mistura foi agitada até ficar clara. Depois, a mistura foi colocada em uma placa de Petri de vidro e os solventes foram removidos por evaporação, usando placa aquecedora à temperatura de 40 °C, por um período de 48 horas. Os cristais resultantes foram removidos da placa por raspagem, com auxílio de uma espátula, e estocados em tubos de vidro a 22 °C. A solução de trabalho de CCC foi preparada pela adição de 50 mg de CCC em 1 mL de diluidor BTALP a 37 °C e homogeneizada por agitação com auxílio de um agitador vortex. Essa solução foi mantida congelada a -80 °C até sua utilização, quando foi aquecida a 37 °C e homogeneizada antes da incubação com sêmen.

## 2.5. Animais

Foram utilizados machos das raças Saanen (2) e Pardo Alpina (3), com idades entre 3 e 7 anos, com simetria testicular e escroto sem qualquer alteração, prepúcio e pênis normais e boa libido, sendo todos considerados clinicamente normais.

## 2.6. Método de coleta do sêmen

O sêmen foi coletado por meio de vagina artificial, constituída por um cilindro rijo, aberto em ambas as extremidades; uma válvula controladora de entrada e saída de água e ar; uma mucosa de borracha, revestida internamente por um saco plástico (camisinha – dimensões externas: h = 26 cm; b = 25 cm; c = 10 cm, **Figura 1**), cuja extremidade de menor dimensão estava acoplada ao tubo de coleta graduado; e uma proteção de tecido escuro (modificado de MIES FILHO, 1987). A vagina foi preenchida com água a 60 °C e ar, até a obtenção da pressão necessária para a coleta do



**Figura 1** – Vagina artificial utilizada para coleta de sêmen nos bodes (modelo artesanal).

sêmen, obtendo-se a temperatura interna média de 41 °C (40 a 42 °C) no ato da coleta. Além disso, o tubo de coleta foi revestido com o saco de tecido escuro, para proteger o sêmen das variações térmicas e da radiação solar ultravioleta. Foram utilizadas cabras em estro natural como manequim, colocadas em um tronco de contenção, para coletas em dias alternados.

### **2.7. Exames do sêmen**

O sêmen coletado foi colocado em banho-maria a 37 °C, para preservação dos espermatozoides durante as análises. Os materiais utilizados no experimento, como lâminas, lamínulas, pipetas e recipientes, foram colocados sobre uma placa aquecedora a 37 °C, evitando, assim, que os espermatozoides passassem por variações térmicas.

### **2.8. Volume seminal**

A determinação do volume do ejaculado foi realizada no laboratório, por meio de leitura no tubo de coleta graduado, antes da colocação no banho-maria.

### **2.9. Coloração seminal**

A cor do sêmen foi determinada visualmente, de acordo com Mies Filho (1987).

## **2.10. Aspecto seminal**

O aspecto seminal foi classificado em aquoso (1), leitoso (2) ou cremoso (3) (MIES FILHO, 1987).

## **2.11. Turbilhonamento espermático**

Na avaliação do turbilhonamento, foram colocados 10  $\mu$ L de sêmen recém-coletado sobre lâmina a 37 °C, levando-a, então, ao microscópio de contraste de fase, com aumento de 10x. A interpretação foi subjetiva, sendo considerada a escala de 0 a 5 pontos (FONSECA *et al.*, 1992).

## **2.12. Motilidade espermática**

A motilidade espermática do sêmen fresco foi determinada ao colocar 10  $\mu$ L de sêmen sobre a lâmina escavada, adicionando-se 100  $\mu$ L do diluente de congelamento a 37 °C. O material foi homogeneizado, em seguida foram retirados 10  $\mu$ L, que foram então colocados sobre a lâmina a 37 °C e cobertos com lamínula. Esse material foi levado ao microscópio de contraste de fase, com aumento de 40 vezes. A avaliação foi subjetiva, considerando-se variações de 0 a 100 % de células móveis. A diluição não foi utilizada para a avaliação do sêmen congelado.

## **2.13. Vigor espermático**

O vigor espermático foi avaliado a partir da mesma lâmina preparada para motilidade espermática e classificado em uma escala de 0 a 5 pontos, em que os valores mais elevados indicaram sêmen com espermatozoides apresentando maior intensidade de movimentação (FONSECA *et al.*, 1992).

## **2.14. Concentração espermática**

Para determinação da concentração espermática, foi utilizada a câmara hematocimétrica, modelo de Neubauer, em que o sêmen foi diluído em água destilada, na proporção de 1:200 (água: diluidor), utilizando-se a pipeta de volume variável. Preenchida a câmara de Neubauer, o material foi levado ao microscópio de contraste de fase em aumento de 40 vezes; foram contados

cinco quadrados dos 25 presentes na câmara (FONSECA *et al.*, 1992). Em seguida, aplicou-se a fórmula:

$$[ ]_{\text{sptz}} = \frac{N}{1/5 * 1/10 * 1/200}$$

em que

[ ]<sub>sptz</sub> = concentração espermática; e

N = número de espermatozoides contados.

### **2.15. Congelamento do sêmen**

As amostras foram congeladas, utilizando-se o meio comercial à base de Tris (Bioxcell – IMV). O sêmen foi envasado em palhetas de 0,25 mL; essas palhetas foram colocadas em tubo de ensaio de 20 mL revestido por refil (saco plástico), colocado dentro de recipiente de plástico com capacidade de 240 mL, contendo 125 mL de álcool etílico absoluto. O recipiente foi então colocado na posição horizontal dentro da geladeira, com temperatura interna entre 4 e 5 °C, durante 60 minutos.

O congelamento foi realizado durante 15 minutos em vapor de nitrogênio líquido, colocando-se as palhetas sobre suporte de aço inoxidável, a 5 cm acima da superfície de nitrogênio líquido, acondicionadas em caixa de isopor com 40 cm de comprimento x 32 cm de altura x 20 cm de largura, contendo uma camada de 5 cm de altura de nitrogênio em seu interior. Após esse período, as palhetas foram imersas no nitrogênio, para o congelamento final do sêmen. Em seguida, foram colocadas em raques, devidamente identificadas, ainda submersas no nitrogênio. As raques foram estocadas em botijão com nitrogênio líquido, para análises posteriores.

### **2.16. Teste de coloração supravital**

O teste de coloração supravital foi realizado com 10 µL do corante eosina-nigrosina, adicionado a 10 µL de sêmen, homogeneizado, a 37 °C. Em seguida, foi realizado um esfregaço em lâmina, que, após secar, foi levada para leitura em microscópio ótico com aumento de 40 vezes. Foram consideradas com membranas funcionais as células coradas, e as de cor rósea foram consideradas sem funcionalidade de membrana.

### **2.17. Teste hiposmótico**

O teste hiposmótico foi realizado em solução de frutose a 100 mOsm/L. Para esse procedimento, uma alíquota de 20  $\mu$ L de sêmen foi adicionada a um microtubo plástico (capacidade = 2 mL), contendo 1 mL da solução hipoosmótica, e incubada em banho-maria a 37 °C, por 30 minutos. Após o término da incubação, foram adicionados 500  $\mu$ L de formol salino a 10 %, para posterior análise em microscópio ótico com um aumento de 100 vezes. Foram considerados com membrana plasmática íntegra aqueles espermatozoides que durante a incubação sofreram dobramento da cauda, e os que não sofreram dobramento foram considerados com membrana plasmática lesada.

### **2.18. Análise estatística**

A análise estatística seguiu os seguintes critérios: o teste de Lilliefors foi utilizado para verificação de normalidade dos dados. Para avaliar a homocedasticidade das variâncias, empregou-se o teste de Cochran e Bartlett. Nas variáveis quantitativas com distribuição normal foi empregado ANOVA; às variáveis com diferença entre as médias aplicou-se o teste de comparação de médias, escolhido com base no coeficiente de variação (CV), em que para variáveis com CV menor ou igual a 15 % foi escolhido o teste de Tukey, para CV maior que 15 % e menor ou igual a 30 % o teste escolhido foi o teste de Student-Newman-Keuls (SNK). Para CV maior que 30 % o teste adotado foi o de Duncan. Nas variáveis qualitativas e nas variáveis quantitativas que não apresentaram distribuição normal foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. A correlação simples de Pearson foi feita entre todas as variáveis estudadas. O valor de  $\alpha$  foi de 5 % para todos os parâmetros avaliados.

## **3. Resultados e discussão**

Para comparação dos dados observados neste estudo com os encontrados na literatura consultada e realização da inferência destes dados com a população, criou-se um intervalo de confiança de 95% de certeza de conter a média real da população para todas as variáveis analisadas e calculou-se também o erro-padrão da média dos dados observados da

literatura, sendo estes expressos quando comparados aos dados deste estudo. Os valores médios, com seus respectivos erros-padrão da média (Média  $\pm$  S<sub>x</sub>), referentes ao aspecto do sêmen (ASPEC), à coloração seminal (COL), ao volume do ejaculado (VOL), à concentração espermática (CONC), à motilidade (MT) e ao vigor espermático (VIG) do sêmen a fresco e à motilidade (MT) e ao vigor espermático (VIG) do sêmen descongelado encontram-se na **Tabela 1**. Não houve variação (P>0,05) entre os animais utilizados em qualquer variável estudada.

**Tabela 1** – Médias, erro-padrão das médias do aspecto, coloração, concentração, volume, turbilhonamento, motilidade e vigor espermáticos do sêmen fresco

Descrição	Média	S <sub>x</sub>
ASPEC	2,10	0,56
COL	1,72	0,53
CONC	3,76	0,09
VOL	1,16	0,04
TURB	3,38	0,06
MOTF	80,69	0,49
VIGF	3,03	0,03

ASPEC = aspecto do sêmen; COL = coloração seminal; CONC = concentração espermática (SPTZs \* 10<sup>9</sup>/mL; VOL = volume do sêmen (mL); TURB = turbilhonamento espermático (0-5); MOTF = motilidade espermática do sêmen fresco (%); e VIGF = vigor espermático do sêmen fresco (0-5).

O aspecto e a coloração seminais estavam entre os considerados normais para a espécie (CBRA, 1998).

O volume médio de sêmen coletado foi 1,16  $\pm$  0,04 mL, igual ao 1,1  $\pm$  0,15 mL coletado por Santos (2010) e 1,06  $\pm$  0,02 mL por Siqueira (2006); superior ao 0,7  $\pm$  0,05 mL coletado por Martins *et al.* (2006); e coerente com os valores considerados normais para bodes durante a estação reprodutiva (KARATZAS *et al.*, 1997). Segundo Hafez e Hafez (2004), o volume do sêmen varia de acordo com o método de coleta, a idade do animal, a estação e a frequência das coletas, variando entre 0,5 e 2 mL em animais adultos e entre 0,5 e 0,7 mL nos jovens.

A concentração espermática média foi de  $3,76 \pm 0,09 * 10^9$  espermatozoides/mL, igual aos resultados de  $3,45 \pm 0,2 \times 10^9$  espermatozoides/mL obtidos por Martins *et al.* (2006); e superiores aos resultados obtidos por Santos (2010),  $1,94 \pm 0,21 \times 10^9$  espermatozoides, por Siqueira (2006),  $2,02 \pm 0,15 \times 10^9$  espermatozoides/mL e por Rovay (2006),  $2,2 \pm 0,16 \times 10^9$  espermatozoides/mL, o que demonstra a alta variabilidade da concentração espermática de caprinos na literatura consultada.

Observou-se turbilhonamento médio de  $3,38 \pm 0,06$ , igual a  $3,6 \pm 0,23$  observado por Santos (2010), diferindo de  $3,83 \pm 0,13$  reportado por Siqueira (2006), de  $4,06 \pm 0,1$  observado por Martins *et al.* (2006) e de  $4,0 \pm 0,12$  constatado por Castilho (2008).

Constatou-se motilidade espermática do sêmen fresco de  $80,7 \pm 0,49$ , igual a  $77,5 \pm 1,37$  observado por Santos (2010), a  $72,00 \pm 11,59$  reportado por Bittencourt *et al.* (2007), a  $82,87 \pm 1,15$  por Martins *et al.* (2006), a  $83,0 \pm 1,17$  por Siqueira (2006) e inferior a  $86,0 \pm 0,89$  constatado por Rovay (2006). Esses valores são classificados como normais para a espécie, de acordo com os valores mínimos de motilidade espermática preconizados para a espécie, pelo CBRA (1998).

Os valores médios do vigor espermático do sêmen fresco foram  $3,03 \pm 0,03$ , corroborando com  $3,35 \pm 0,07$  observado por Martins *et al.* (2006), diferindo de  $3,8 \pm 0,09$  constatado por Santos (2010), de  $4,14 \pm 0,11$  por Siqueira (2006), de  $4,0 \pm 0,17$  por Rovay (2006) e de  $4,1 \pm 0,06$  por Castilho (2008), estando dentro do valor mínimo preconizado pelo CBRA (1998).

Os resultados referentes às características do sêmen fresco apresentaram qualidade satisfatória para a realização dos congelamentos e o seguimento do estudo.

Os resultados das análises de motilidade espermática do sêmen descongelado estão sumariados na **Tabela 2**.

Todos os tratamentos apresentaram diferenças ( $P < 0,05$ ) para o parâmetro motilidade espermática, sendo os tratamentos  $T_{1,0}$  e  $T_{0,5}$  os que apresentaram maiores valores ( $33,45 \% \pm 1,07$  e  $32,59 \% \pm 0,98$ , respectivamente) em relação ao  $28,62 \% \pm 1,05$  do  $T_{\text{controle}}$  e acima do valor mínimo de 30 %, preconizado pelo CBRA (1998) para sêmen descongelado. Os tratamentos  $T_{1,5}$ ;  $T_{2,5}$ ;  $T_{2,0}$  e  $T_{3,0}$  apresentaram  $27,41 \pm 0,96 \%$ ;  $26,55 \pm 0,94 \%$ ;



**Tabela 2** – Médias e erro-padrão das médias da motilidade espermática do sêmen descongelado

Tratamento	Média (%)	S <sub>x</sub>
T <sub>controle</sub>	28,62 <sup>c</sup>	1,05
T <sub>0,5</sub>	32,59 <sup>b</sup>	0,98
T <sub>1,0</sub>	33,45 <sup>a</sup>	1,07
T <sub>1,5</sub>	27,41 <sup>d</sup>	0,96
T <sub>2,0</sub>	25,89 <sup>f</sup>	0,99
T <sub>2,5</sub>	26,55 <sup>e</sup>	0,94
T <sub>3,0</sub>	25,17 <sup>g</sup>	1,06

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem entre si (P<0,05), pelo teste de Duncan.

25,89 ± 0,99%; e 25,17 % ± 1,06 %, respectivamente. O resultado do T<sub>controle</sub> foi inferior a 51,0 ± 0,31 % constatado por Bittencourt *et al.* (2004), a 31,33 ± 0,29 % por Betini *et al.* (1998) e a 41,5 ± 2,58 % por Bittencourt *et al.* (2007).

Os resultados das análises do vigor espermático do sêmen descongelado estão sumariados na **Tabela 3**.

**Tabela 3** – Médias e erro-padrão das médias do vigor espermático do sêmen descongelado

Tratamento	Média	S <sub>x</sub>
T <sub>controle</sub>	2,10 <sup>a</sup>	0,07
T <sub>0,5</sub>	2,24 <sup>a</sup>	0,07
T <sub>1,0</sub>	2,40 <sup>a</sup>	0,08
T <sub>1,5</sub>	2,28 <sup>a</sup>	0,07
T <sub>2,0</sub>	2,13 <sup>a</sup>	0,07
T <sub>2,5</sub>	2,19 <sup>a</sup>	0,07
T <sub>3,0</sub>	2,26 <sup>a</sup>	0,09

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem entre si (P<0,05), pelo teste de Kruskal-Wallis.

Não houve variação (P>0,05) nas médias dos tratamentos do parâmetro vigor espermático T<sub>controle</sub> (2,1 ± 0,07), T<sub>0,5</sub> (2,24 ± 0,07), T<sub>1,0</sub> (2,4 ± 0,08), T<sub>1,5</sub> (2,28 ± 0,07), T<sub>2,0</sub> (2,13 ± 0,07), T<sub>2,5</sub> (2,19 ± 0,07), T<sub>3,0</sub> (2,26 ± 0,09). O grupo T<sub>controle</sub> apresentou resultados inferiores a 3,15 ± 0,012 observados por

Bittencourt *et al.* (2004),  $2,46 \pm 0,03$  por Betini *et al.* (1998),  $2,5 \pm 0,03$  por Maia *et al.* (2006) e  $3,2 \pm 0,16$  por Silva *et al.* (2011).

Os resultados da avaliação da funcionalidade de membrana por meio do teste supravital estão sumariados na **Tabela 4**.

**Tabela 4** – Médias e erro-padrão das médias da análise de funcionalidade de membrana do espermatozoide, por meio do teste supravital do sêmen descongelado

Tratamento	Média	S <sub>x</sub>
T <sub>controle</sub>	37,7 <sup>b</sup>	0,94
T <sub>0,5</sub>	41,5 <sup>a</sup>	0,85
T <sub>1,0</sub>	35,54 <sup>b</sup>	0,81
T <sub>1,5</sub>	30,65 <sup>c</sup>	0,98
T <sub>2,0</sub>	38,06 <sup>b</sup>	0,91
T <sub>2,5</sub>	36,33 <sup>b</sup>	1,00
T <sub>3,0</sub>	34,77 <sup>b</sup>	1,13

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ( $P < 0,05$ ), pelo teste de Duncan.

O percentual de células com a membrana funcional pelo teste supravital em T<sub>0,5</sub> ( $41,5 \pm 0,85$ ) foi superior ( $P < 0,05$ ) ao do T<sub>controle</sub> ( $37,7 \pm 0,94$ ); este último foi igual a  $38,53 \pm 2,33$  observado por Dias (2010), inferior a  $61,79 \pm 1,14$  por Oliveira *et al.* (2009), superior a  $29,06 \pm 0,17$  por Betini *et al.* (1998) e  $18,0 \pm 0,98$  por Maia *et al.* (2006). Também não foram constatadas variações ( $P > 0,05$ ) nos percentuais médios dos tratamentos T<sub>2,0</sub>; T<sub>2,5</sub>; T<sub>1,0</sub>; e T<sub>3,0</sub> ( $38,06 \pm 0,91$ ;  $38,06 \pm 1,0$ ;  $36,33 \pm 0,81$ ;  $35,54 \pm 0,81$ ; e  $34,77 \pm 1,13$ , respectivamente), em relação ao do T<sub>controle</sub>. O tratamento T<sub>1,5</sub> ( $30,65 \pm 0,98$ ) foi inferior ( $p < 0,05$ ), aos demais tratamentos. Pode-se observar que a inclusão do complexo colesterol-ciclodextrina na concentração de 0,5 mg/mL propicia melhor funcionalidade de membrana aos espermatozoides de caprino descongelados, aumentando, assim, a viabilidade do sêmen.

Os resultados da avaliação da integridade de membrana por meio do teste hiposmótico estão sumariados na **Tabela 5**.

**Tabela 5** – Médias e erro-padrão das médias da análise de integridade espermatozoide, por meio do teste hiposmótico do sêmen descongelado

Tratamento	Média	S <sub>x</sub>
T <sub>controle</sub>	28,55 <sup>b</sup>	1,01
T <sub>0,5</sub>	24,21 <sup>a</sup>	0,82
T <sub>1,0</sub>	23,74 <sup>b</sup>	0,85
T <sub>1,5</sub>	21,92 <sup>c</sup>	1,18
T <sub>2,0</sub>	21,24 <sup>b</sup>	0,87
T <sub>2,5</sub>	24,47 <sup>b</sup>	0,76
T <sub>3,0</sub>	19,68 <sup>b</sup>	0,88

Médias seguidas por letras diferentes nas colunas diferem entre si ( $P < 0,05$ ), pelo teste de Kruskal-Wallis.

A integridade da membrana plasmática dos espermatozoides por meio do teste hiposmótico não foi afetada pelos tratamentos ( $P > 0,05$ ) T<sub>controle</sub> ( $28,55 \pm 1,01$ ), T<sub>2,5</sub> ( $24,47 \pm 0,76$ ), T<sub>0,5</sub> ( $24,21 \pm 0,82$ ), T<sub>1,0</sub> ( $23,74 \pm 0,85$ ), T<sub>1,5</sub> ( $21,92 \pm 1,18$ ), T<sub>2,0</sub> ( $21,24 \pm 0,87$ ) e T<sub>3,0</sub> ( $19,68 \pm 0,88$ ), pelo teste de Kruskal-Wallis, o que demonstra que a adição de complexo ciclodextrina-colesterol não interferiu na funcionalidade da membrana plasmática dos espermatozoides. O resultado observado para T1 foi inferior a  $55,25 \pm 3,19$  reportado por Alves *et al.* (2006) e a  $34,8 \pm 3,6$  por Oliveira *et al.* (2013).

Os resultados da correlação simples de Pearson nas variáveis estudadas estão sumariados na **Tabela 6**.

O plasma seminal apresenta coloração amarelada, com maior destaque para o sêmen que apresenta maior relação plasma seminal:células espermáticas, característica observada neste estudo pela correlação negativa entre o aspecto e a coloração seminal ( $r = -0,87$ ), volume seminal ( $r = -0,73$ ). Observou-se também correlação negativa da coloração seminal com o vigor do sêmen fresco ( $r = -0,66$ ). A partir dessas correlações pode-se afirmar que quanto mais aquoso o sêmen mais amarelado é, e maior o volume e a intensidade de movimentação das células espermáticas. No entanto, a correlação negativa do volume seminal com o turbilhonamento espermático ( $r = -0,71$ ) e motilidade espermática ( $r = -0,49$ ) sugere que a maior quantidade de plasma pode ter ação deletéria sobre as células espermáticas, diminuindo o percentual de células móveis, o que pode ser corroborado ainda pela

**Tabela 6** – Correlações simples de Pearson entre aspectos físicos do sêmen *in natura* e descongelado

	ASPEC	COL	CONC	VOL	TURB	MOTF	VIGF	MOTD	VIGD
ASPEC	1	-0,87*	0,51*	-0,73*	0,06	0,0	-0,66*	0,11	-0,13
COL		1	-0,5*	0,87*	-0,46*	0,0	0,21	-0,03	0,23
CONC			1	-0,85*	0,61*	0,85*	-0,26	0,09	0,25
VOL				1	-0,71*	-0,49*	0,13	-0,05	0,01
TURB					1	0,57*	0,58*	-0,06	0,03
MOTF						1	0	0,06	0,4*
VIGF							1	-0,17	-0,09
MOTD								1	0,58*
VIGD									1

Números seguidos por (\*) apresentam correlação significativa ( $p < 0,05$ ). ASPEC = aspecto do sêmen; COL = coloração seminal; CONC = concentração espermática; VOL = volume de sêmen; TURB = turbilhamento espermático; MOTF = motilidade do sêmen fresco; VIGF = vigor do sêmen fresco; MOTD = motilidade do sêmen descongelado; e VIGD = vigor do sêmen descongelado.

correlação positiva entre a motilidade espermática do sêmen fresco e a concentração espermática ( $r = 0,85$ ). Esta última apresenta ainda correlação positiva com o turbilhamento espermático ( $r = 0,61$ ), e correlação negativa com a coloração espermática ( $r = -0,5$ ) e volume seminal ( $r = -0,85$ ).

O turbilhamento espermático observado neste estudo é similar aos observados por Bispo (2005) e Santos (2010), com correlação positiva com a motilidade espermática ( $r = 0,57$ ) e o vigor espermático ( $r = 0,58$ ), indicando que os ejaculados de maior turbilhamento espermático apresentaram maior quantidade de espermatozoides móveis e mais vigorosos. Esses resultados diferem dos encontrados por Bezerra e Oliveira (2007), que observaram correlação entre o turbilhamento e a motilidade espermática ( $r = 0,93$ ) e vigor espermático ( $r = 0,94$ ), o que reforça a ideia de realizar o congelamento dos ejaculados que apresentarem os maiores percentuais de células móveis.

#### 4. Conclusão

Conclui-se que a adição de 0,5 mg do complexo ciclodextrina-colesterol no sêmen com a concentração espermática de  $200 \times 10^6/\text{mL}$  diminui as perdas de integridade e funcionalidade da membrana plasmática. No entanto, a adição de 1,0 mg do complexo ciclodextrina-colesterol no sêmen com a concentração

espermática de  $200 \times 10^6$ /mL propicia melhor resultado na motilidade espermática após o descongelamento do sêmen.

### Referências bibliográficas

ALVES, S. G. G. **Avaliação do sêmen de caprinos da raça boer por meio do teste hiposmótico**. 2006. 57 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal nos Trópicos) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA. 2006.

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

BETINI, C. M.; MORAES, G. V.; RIGOLON, L. P. Efeito da congelação vertical e horizontal na qualidade do sêmen caprino. **Acta Scientiarum**, v. 20, n. 3, p. 361-365, 1998.

BEZERRA, F. Q. G.; OLIVEIRA, M. A. L. Avaliação de parâmetros fisiológicos e andrológicos de caprinos jovens da raça Bôer. **Medicina Veterinária**, Recife, v. 1, n.1, p. 99-100, jan./jun. 2007.

BISPO, C. A. S. **Avaliação “in vitro” do sêmen caprino resfriado a 5 °C em função de curvas de resfriamento e diluidores**. 2005. 61 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2005.

BITTENCOURT, R. F.; RIBEIRO, A. L.; SANTOS, A. D. F. *et al.* Utilização de glicerol e etilenoglicol como crioprotetores na congelação do sêmen caprino. **Ciência Animal Brasileira**, v. 5, n. 1, p. 27-32, jan./mar. 2004.

BITTENCOURT, R. F.; RIBEIRO FILHO, A. L.; ALVES, S. G. G.; BISCARDE, C. E.; VASCONCELOS, M. F.; OBA, E. Criopreservação do sêmen caprino: efeito da curva de resfriamento e do tempo de equilíbrio. **Ciência Animal**, v. 17, n. 2, p. 75-82, 2007.

CASTILHO, E. F. **Uso da própolis e do ácido ascórbico na criopreservação do sêmen caprino**. 2008. 63 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2008.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL – CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2. ed., Belo Horizonte, MG, 1998. 49 p. (Manual).

COMBES, G. B.; VARNER, D. D.; SCHROEDER, F.; BURGHARDT, R. C.; BLANCHARD, T. L. Effect of supplemental cholesterol on post-thaw motility and plasma membrane integrity of equine spermatozoa. In: PROCEEDINGS OF THE SEVENTH INTERN. SYMP. ON EQUI. REPROD., Pretoria, South Africa, 1998. p. 35-36.

DIAS, J. C. O. **Adição de ringer lactato, citrato de sódio 2,92 % e solução tris em sêmen caprino descongelado.** Viçosa, MG: UFV, 2010. 40 p.

FONSECA, V. O.; VALE FILHO, V. R.; MIES FILHO, A.; ABREU, J. J. **Procedimentos para exame andrológico e avaliação de sêmen animal.** Belo Horizonte: Editora Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1992. 79 p.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal.** 7. ed. Barueri: Manole, 2004. p. 13-29.

KARATZAS, G.; KARAGIANNIDIS, A.; VARSAKELI, S. *et al.* Fertility of fresh and frozen-thawed goat semen during the nonbreeding season. **Theriogenology**, v. 48, n. 6, p. 1049-1059, 1997.

LANGFORD, G. A.; MARCUS, G. J.; HACKETT, A. J.; AINSWORTH, L.; WOLYNETZ, M. S.; PETERS, H. F. A comparison of fresh and frozen semen in the insemination of confined sheep. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 59, p. 685-691, 1979.

MAIA, M. S., MOURA, M. T. M. M.; SOUSA, I. K. F.; LEAL, W. S.; MEDEIROS, I. M. Viabilidade do sêmen caprino congelado em diluente contendo OEP. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 19., 2011, Recife, PE, **Anais...**Belo Horizonte: CBRA, 2011. (CD-ROM). ISSN: 1984-8471.

MARTINS, L. F.; PEREIRA, M. C. B.; GUIMARÃES, J. D.; COSTA, E. P.; SILVEIRA, T. S.; TORRES, C. A. A.; RODRIGUES, M. T.; BRAZ, V. B. Avaliação espermática e da concentração de proteínas solúveis no plasma seminal de bodes da raça Alpina em regime de monta controlada. **R. Bras. Zootec.**, v. 35, n. 4, p. 1653-1659, 2006 (supl.).

MIES FILHO, A. **Inseminação artificial.** Porto Alegre: Livraria Sulina, 1987. v. 2.

MOCÉ, E.; PURDY, P. H.; GRAHAM, J. K. Treating ram sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins improves cryosurvival. **Animal Reproduction Science**, v. 118, p. 236-247, 2010.

NAVRATIL, A. M. *et al.* Constitutive localization of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor to low density membrane microdomains is necessary for GnRH signaling to ERK. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 31593-31602, 2003.

OLIVEIRA, I. R. S., ALVES, H. M., CASTELO, T. S. *et al.* Correlações entre o teste hiposmótico e a avaliação clássica do sêmen de caprinos. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.14, n.2, p. 216-221, abr./jun. 2013.

OLIVEIRA, R. V.; NUNES, J. F.; SALGUEIRO, C. C. M. *et al.* Avaliação morfológica de espermatozoides caprinos diluídos e congelados em meio à base de água de coco em pó (acp-101) ou tris, corados por eosina-nigrosina e azul de bromofenol. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 3, p. 862-869, jul./set. 2009.

PARKS, J. E., GRAHAM, J. K. Effects of cryopreservation procedures on membranes. **Theriogenology**, v. 38, p. 209-222, 1992.

ROVAY, H. **Efeitos de diferentes curvas de resfriamento, tempos de equilíbrio e crioprotetores permeáveis no congelamento de espermatozoides de caprinos**. 2006. 73 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2006.

SANTOS, M. C. R. **Métodos alternativos para análises da capacidade de ligação dos espermatozoides caprinos**. 2010. 37 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2010.

SELAIVE-VILARROEL, A. B. Perdas reprodutivas dos ovinos no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 3, p. 252-256, 1991.

SILVA, E. C. B.; CAJUEIRO, J. F. P.; SILVA, S. V.; GUERRA, M. M. P. Crioprotetores etileno glicol ou acetamida na viabilidade *in vitro* de espermatozoides congelados de ovinos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 6, p. 1083-1088, jun. 2012.

SIMÕES, J.; MASCARENHAS, R.; BARIL, G. **Inseminação artificial em caprinos** – *E-book* para técnicos de expressão portuguesa. Portugal, 2008. Disponível em: <[http://www.veterinaria.com.pt/media//DIR\\_174423/Simoes215.pdf](http://www.veterinaria.com.pt/media//DIR_174423/Simoes215.pdf)>. Acesso em: 30 set. 2013.

SIQUEIRA, A. P. **Inseminação artificial em caprinos com sêmen resfriado**. 2006. 106 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, 2006.

**Avaliação da integridade e funcionalidade da membrana espermática após a inclusão do complexo ciclodextrina-colesterol ao sêmen caprino**

**Resumo:** O objetivo deste estudo foi avaliar a integridade e a funcionalidade da membrana plasmática de espermatozoide após a adição do complexo ciclodextrina-colesterol (CCC), diluído em extensores à base de Tris-Glicerol ou à base de Tris-Etilenoglicol-gema de ovo ao sêmen caprino. Objetivou-se ainda avaliar a forma de inclusão deste complexo (junto com o diluente ou pré-incubado por 15 minutos). Foram coletados três ejaculados de cada um dos quatro bodes, totalizando 12 ejaculados. Cada ejaculado foi avaliado, e aqueles considerados aptos para o congelamento, segundo os parâmetros mínimos de motilidade e vigor espermáticos exigidos pelo CBRA (1998), foram fracionados em seis alíquotas de  $350 \times 10^6$  espermatozoides (quantidade suficiente para sete doses de  $50 \times 10^6$  de espermatozoides/palheta de 0,25 mL). Cada alíquota recebeu 1,0 mg de CCC nos seguintes tratamentos:  $T_{\text{Glicerol}}$  – controle negativo para o diluente à base de Tris-glicerol *without* CCC;  $T_{\text{Glicerol} + \text{CCC}}$  – para o diluente à base de Tris-glicerol + CCC;  $T_{\text{Glicerol} + \text{CCC}/\text{pré-incubado}}$  – CCC diluído em solução isosmótica ao sêmen (soro fisiológico) com 15 minutos de incubação antes da adição do diluente à base de Tris-glicerol;  $T_{\text{Etilenoglicol}}$  – controle negativo para o diluente à base de Tris-Etilenoglicol-gema de ovo;  $T_{\text{Etilenoglicol} + \text{CCC}}$  – para o diluente à base de Tris-Etilenoglicol-gema de ovo + CCC e  $T_{\text{Etilenoglicol} + \text{CCC}/\text{pré-incubado}}$  – para o CCC diluído em solução iso-osmótica ao sêmen (soro fisiológico) com 15 minutos de incubação antes da adição do diluente à base de Tris-Etilenoglicol-gema de ovo. O valor de  $\alpha$  foi de 5% para todos os parâmetros avaliados. As médias da motilidade espermática diferiram ( $P < 0,05$ ) entre todos os tratamentos  $T_{\text{Glicerol} + \text{CCC}/\text{pré-incubado}}$  ( $37,08 \pm 2,17$ ),  $T_{\text{Glicerol} + \text{CCC}}$  ( $35,00 \pm 1,51$ ),  $T_{\text{Glicerol}}$  ( $29,55 \pm 2,81$ ),  $T_{\text{Etilenoglicol} + \text{CCC}/\text{pré-incubado}}$  ( $29,17 \pm 4,52$ ),  $T_{\text{Etilenoglicol} + \text{CCC}}$  ( $25,83 \pm 3,98$ ),  $T_{\text{Etilenoglicol}}$  ( $23,64 \pm 4,10$ ). O vigor espermático do sêmen descongelado não foi afetado pelos tratamentos aplicados ( $P > 0,05$ ), apresentando as seguintes médias  $T_{\text{Etilenoglicol} + \text{CCC}/\text{pré-incubado}}$  ( $2,96 \pm 0,31$ ),  $T_{\text{Etilenoglicol} + \text{CCC}}$  ( $2,91 \pm 0,12$ ),  $T_{\text{Glicerol} + \text{CCC}/\text{pré-incubado}}$  ( $2,75 \pm 0,2$ ),  $T_{\text{Etilenoglicol}}$  ( $2,59 \pm 0,35$ ),  $T_{\text{Glicerol} + \text{CCC}}$  ( $2,29 \pm 0,18$ ) e  $T_{\text{Glicerol}}$  ( $2,22 \pm 0,18$ ). Não foram observadas diferenças ( $P > 0,05$ ) nos percentuais médios para integridade de membrana pelo teste hiposmótico dos tratamentos  $T_{\text{Glicerol} + \text{CCC}/\text{pré-incubado}}$  ( $52,0 \pm 4$ ),  $T_{\text{Etilenoglicol} + \text{CCC}/\text{pré-incubado}}$  ( $49,65 \pm 5,9$ ),  $T_{\text{Glicerol} + \text{CCC}}$  ( $45,05 \pm 4,83$ ),  $T_{\text{Glicerol}}$  ( $44,8 \pm 2,31$ ),  $T_{\text{Etilenoglicol}}$  ( $44,39 \pm 4,66$ ) e  $T_{\text{Etilenoglicol} + \text{CCC}}$  ( $39,6 \pm 4,96$ ). Não foram observadas diferenças ( $P > 0,05$ ) entre as médias dos tratamentos  $T_{\text{Etilenoglicol} + \text{CCC}/\text{pré-incubado}}$  ( $29,0 \pm 3,82$ ),  $T_{\text{Etilenoglicol} + \text{CCC}}$  ( $26,96 \pm 4,73$ ),  $T_{\text{Glicerol} + \text{CCC}/\text{pré-incubado}}$  ( $24,5 \pm 4,2$ ),  $T_{\text{Glicerol} + \text{CCC}}$  ( $23,54 \pm 4,49$ ),  $T_{\text{Glicerol}}$  ( $20,79 \pm 3,35$ ) e  $T_{\text{Etilenoglicol}}$  ( $19,45 \pm 4,08$ ), para funcionalidade da membrana plasmática pelo teste supravital. Foram observadas diferenças ( $P < 0,05$ ) na produção de ATP na bainha mitocondrial nos tratamentos  $T_{\text{Etilenoglicol} + \text{CCC}}$  ( $62,92 \pm 8,34$ ),  $T_{\text{Etilenoglicol} + \text{CCC}/\text{pré-incubado}}$  ( $62,72 \pm 8,79$ ),  $T_{\text{Etilenoglicol}}$  ( $59,19 \pm 9,57$ ),  $T_{\text{Glicerol} + \text{CCC}/\text{pré-incubado}}$  ( $11,92 \pm 6,89$ ),  $T_{\text{Glicerol}}$  ( $11,64 \pm 5,43$ ) e  $T_{\text{Glicerol} + \text{CCC}}$  ( $7,76 \pm 3,31$ ). Foram observadas diferenças ( $P < 0,05$ ) na integridade de membrana acrossomal nos tratamentos  $T_{\text{Etilenoglicol}}$  ( $78,19 \pm 5,82$ ),  $T_{\text{Etilenoglicol} + \text{CCC}/\text{pré-incubado}}$  ( $74,43 \pm 6,31$ ),  $T_{\text{Etilenoglicol} + \text{CCC}}$  ( $70,68 \pm 5,77$ ),  $T_{\text{Glicerol}}$  ( $47,06 \pm 4,31$ ),  $T_{\text{Glicerol} + \text{CCC}}$  ( $46,88 \pm 6,58$ )



e T<sub>Glicerol + CCC/pré-incubado</sub> (44,6 ± 8,57). Não foram observadas diferenças (P>0,05) na integridade de membrana plasmática por meio das sondas fluorescentes (IP + Dietilcarboxifluorosceína) nos tratamentos T<sub>Glicerol</sub> (63,98 ± 8,4), T<sub>Glicerol + CCC</sub> (63,08 ± 9,05), T<sub>Glicerol + CCC/pré-incubado</sub> (52,24 ± 9,47), T5 (52,09 ± 10,88), T<sub>Etilenoglicol+ CCC/pré-incubado</sub> (44,37 ± 8,96) e T<sub>Etilenoglicol</sub> (37,19 ± 10,81). Diante desses resultados, conclui-se que a adição de 1,0 mg de complexo ciclodextrina-colesterol no sêmen com a concentração espermática de 200 \* 10<sup>6</sup>/mL não altera a integridade e/ou a funcionalidade da membrana plasmática do espermatozoide caprino. O diluidor à base de Tris-gema de ovo-etileno glicol não altera a funcionalidade da membrana plasmática ou o vigor espermático. Embora influencie positivamente a integridade da membrana acrossomal, afeta negativamente a motilidade espermática do sêmen descongelado, comparado ao diluente à base de Tris-Glicerol. A pré-incubação do sêmen com o complexo ciclodextrina-colesterol não altera as características de vigor espermático, além de integridade e funcionalidade da membrana plasmática dos espermatozoides, mas afeta positivamente a motilidade espermática do sêmen descongelado.

**Palavras-chave:** caprino; colesterol-ciclodextrina; etilenoglicol; glicerol; sêmen.

## Evaluation of the integrity and functionality of the goat sperma plasma membrane after the addition of the ciclodextrin-cholesterol compound

**Abstract:** The objective of this study was to evaluate the functionality and integrity of plasma membrane of thawed goat semen after addition of Ciclodextrin-Cholesterol Compound (CCC) diluted in tris glycerol or tris ethylene glycol + yolk hen's egg diluent to goat semen. And further, to evaluate the way of inclusion of the CCC (together with diluent or preincubated for 15 minutes). Four billy goats were used and three samples were collected from each with a total of twelve ejaculates. Each ejaculate was evaluated and the ones good to be frozen by the minimum requirements of motility and vigor by the Brazilian College of Animal Reproduction (CBRA, 1998) were fractionated in six aliquots of  $350 \times 10^6$  spermatozoa (enough for 07 doses with  $50 \times 10^6$  spermatozoa/ semen straw). Each aliquot received 1.0 mg of CCC in the following treatment:  $T_{\text{Glycerol}}$  – negative control to Tris glycerol diluent without CCC;  $T_{\text{Glycerol} + \text{CCC}}$  – Tris glycerol diluent + CCC;  $T_{\text{Glycerol} + \text{CCC} + \text{preincubated}}$  – CCC diluted in isosmotic solution (normal saline) 15 minutes before addition of the Tris glycerol diluent;  $T_{\text{Ethylene glycol}}$  – negative control to Tris ethylene glycol diluent without CCC;  $T_{\text{Ethylene glycol} + \text{CCC}}$  – Tris ethylene glycol + yolk hen's egg diluent + CCC;  $T_{\text{Ethylene glycol} + \text{CCC} + \text{preincubated}}$  – CCC diluted in isosmotic solution (normal saline) 15 minutes before addition of the Tris ethylene glycol + yolk hen's egg diluent. Treatments were considered to be different if  $P < 0.05$ . It was found difference among the averages of all treatments for the spermatic motility ( $P < 0.05$ )  $T_{\text{Glycerol} + \text{CCC} + \text{preincubated}}$  ( $37.08 \pm 2.17$ ),  $T_{\text{Glycerol} + \text{CCC}}$  ( $35.00 \pm 1.51$ ),  $T_{\text{Glycerol}}$  ( $29.55 \pm 2.81$ ),  $T_{\text{Ethylene glycol} + \text{CCC} + \text{preincubated}}$  ( $29.17 \pm 4.52$ ),  $T_{\text{Ethylene glycol} + \text{CCC}}$  ( $25.83 \pm 3.98$ ),  $T_{\text{Ethylene glycol}}$  ( $23.64 \pm 4.10$ ). The vigor of thawed semen was not affected by treatments used ( $P > 0.05$ ), whose averages are:  $T_{\text{Ethylene glycol} + \text{CCC} + \text{preincubated}}$  ( $2.96 \pm 0.31$ ),  $T_{\text{Ethylene glycol} + \text{CCC}}$  ( $2.91 \pm 0.12$ ),  $T_{\text{Glycerol} + \text{CCC} + \text{preincubated}}$  ( $2.75 \pm 0.2$ ),  $T_{\text{Ethylene glycol}}$  ( $2.59 \pm 0.35$ ),  $T_{\text{Glycerol} + \text{CCC}}$  ( $2.29 \pm 0.18$ ),  $T_{\text{Glycerol}}$  ( $2.22 \pm 0.18$ ). No difference was found ( $P > 0.05$ ) on the percentage plasma membrane integrity by hypoosmotic test on treatments  $T_{\text{Glycerol} + \text{CCC}/\text{preincubated}}$  ( $52.0 \pm 4$ ),  $T_{\text{Ethylene glycol} + \text{CCC}/\text{preincubated}}$  ( $49.65 \pm 5.9$ ),  $T_{\text{Glycerol} + \text{CCC}}$  ( $45.05 \pm 4.83$ ),  $T_{\text{Glycerol}}$  ( $44.8 \pm 2.31$ ),  $T_{\text{Ethylene glycol}}$  ( $44.39 \pm 4.66$ ),  $T_{\text{Ethylene glycol} + \text{CCC}}$  ( $39.6 \pm 4.96$ ). The functionality of the plasma membrane by supravital test was not affected by the treatments ( $P > 0.05$ ). The treatments averages were:  $T_{\text{Ethylene glycol} + \text{CCC}/\text{preincubated}}$  ( $29.0 \pm 3.82$ ),  $T_{\text{Ethylene glycol} + \text{CCC}}$  ( $26.96 \pm 4.73$ ),  $T_{\text{Glycerol} + \text{CCC}/\text{preincubated}}$  ( $24.5 \pm 4.2$ ),  $T_{\text{Glycerol} + \text{CCC}}$  ( $23.54 \pm 4.49$ ),  $T_{\text{Glycerol}}$  ( $20.79 \pm 3.35$ ),  $T_{\text{Ethylene glycol}}$  ( $19.45 \pm 4.08$ ). The ATP production by mitochondrial sheath was affected by treatments ( $P < 0.05$ ) and theirs means were:  $T_{\text{Ethylene glycol} + \text{CCC}}$  ( $62.92 \pm 8.34$ ),  $T_{\text{Ethylene glycol} + \text{CCC}/\text{preincubated}}$  ( $62.72 \pm 8.79$ ),  $T_{\text{Ethylene glycol}}$  ( $59.19 \pm 9.57$ ),  $T_{\text{Glycerol} + \text{CCC}/\text{preincubated}}$  ( $11.92 \pm 6.89$ ),  $T_{\text{Glycerol}}$  ( $11.64 \pm 5.43$ ),  $T_{\text{Glycerol} + \text{CCC}}$  ( $7.76 \pm 3.31$ ). The acrosomal membrane integrity means by treatments were:  $T_{\text{Ethylene glycol}}$  ( $78.19 \pm 5.82$ ),  $T_{\text{Ethylene glycol} + \text{CCC}/\text{preincubated}}$  ( $74.43 \pm 6.31$ ),  $T_{\text{Ethylene glycol} + \text{CCC}}$  ( $70.68 \pm 5.77$ ),  $T_{\text{Glycerol}}$  ( $47.06 \pm 4.31$ ),  $T_{\text{Glycerol} + \text{CCC}}$  ( $46.88 \pm 6.58$ ),  $T_{\text{Glycerol} + \text{CCC}/\text{preincubated}}$  ( $44.6 \pm 8.57$ ) and were influenced by the treatments ( $P < 0.05$ ). The plasma membrane integrity by fluorescent probes (Propidium iodide + diethyl carboxyfluorescein) were not affected by treatments ( $P > 0.05$ ) and theirs means were:  $T_{\text{Glycerol}}$  ( $63.98 \pm 8.4$ ),  $T_{\text{Glycerol} + \text{CCC}}$  ( $63.08 \pm 9.05$ ),  $T_{\text{Glycerol} + \text{CCC}/\text{preincubated}}$  ( $52.24 \pm 9.47$ ),  $T_5$  ( $52.09 \pm 10.88$ ),  $T_{\text{Ethylene glycol} + \text{CCC}/\text{preincubated}}$  ( $44.37 \pm 8.96$ ),  $T_{\text{Ethylene glycol}}$  ( $37.19 \pm 10.81$ ). It is concluded based on the results that the addition of 1.0 mg of CCC

on the spermatic concentration of  $200 \times 10^6/\text{mL}$  did not affected the integrity neither the functionality of plasma membrane of goat sperm. The Tris + Ethyleno glycol + yolkegg hen's yolk diluent did not alter the functionality of plasma membrane or vigor. Although it has a positive influence on the acrossomal membrane integrity, negatively affects the motility of the thawed sperm compared to solvent-based Tris-glycerol. The preincubation of sperm with CCC does not alter the characteristics of sperm vigor, and integrity and functionality of the plasma membrane, but positively affect the motility of the thawed sperm.

**Key words:** Goat semen; cholesterol-cyclodextrin; ethylene glycol; glycerol.

## 1. Introdução

A criopreservação do sêmen é uma biotécnica da reprodução que oferece vantagens à indústria da produção animal, como o armazenamento de material genético por tempo indefinido (FICKEL *et al.*, 2007). No entanto o processo de criopreservação das células espermáticas resulta em diminuição da fertilidade, quando comparado com sêmen fresco (GUTHRIE *et al.*, 2002), devido ao efeito deletério dos processos de resfriamento e congelamento do sêmen, que causaa desestabilização da membrana plasmática dos espermatozoides (ORTEGA *et al.*, 2003). Essa alteração da membrana plasmática dos espermatozoides pode ser em níveis ultraestrutural, bioquímico e funcional, resultando na redução da motilidade, viabilidade e capacidade de fertilização dos espermatozoides, ou sendo letal ao espermatozoide (LEBOEUF *et al.*, 2000; STORNELLI *et al.*, 2005). A desestabilização da membrana ocorre na transição da fase fluida para a fase gel, durante a diminuição da temperatura no processo de criopreservação (QUINN, 1989)

Deste modo, a otimização das técnicas de criopreservação de espermatozoides, de acordo com o tipo de sêmen utilizado (ORTEGA *et al.*, 2003), torna-se indispensável. Esse procedimento tem como finalidade conservar um elevado número de espermatozoides sobreviventes, além de manter sua capacidade fertilizante (STORNELLI *et al.*, 2005). Para isto, a adição do colesterol à membrana plasmática dos espermatozoides é uma alternativa viável (AMANN, 1999), pelo fato de o colesterol controlar a estrutura de membrana e interagir com a cadeia de fosfolipídios (DARIN-BENNETT; WHITE, 1977), tornando a membrana plasmática mais estável e, conseqüentemente, baixando a temperatura na fase de transição (QUINN, 1989; MOCÉ *et al.*, 2010).

O colesterol, quando carregado pelas ciclodextrinas, é transferido para um gradiente de concentração baixa da membrana plasmática do espermatozoide, resultando no aumento de seus níveis de colesterol (KLEIN *et al.*, 1995). Os diluentes compostos à base de gema de ovo não podem ser indicados para adição do complexo ciclodextrina-colesterol, visto que a maior parte do colesterol complexado à ciclodextrina seria transferido preferencialmente para as gotas lipídicas da gema de ovo, em vez de serem incorporados às membranas dos espermatozoides. A incubação do complexo ciclodextrina-

colesterol no sêmen, realizada 15 minutos antes da adição do diluente de criopreservação, proporciona maior percentual de células espermáticas móveis e viáveis após o processo de congelamento e descongelamento do sêmen (AMORIM *et al.*, 2007).

Com isto, é possível que a adição do complexo ciclodextrina-colesterol possa preservar a integridade, a estabilidade e a funcionalidade da membrana plasmática do espermatozoide de caprinos no pós-descongelamento. O diluente de congelamento composto por gema de ovo não altera a integridade das membranas plasmáticas e acrossomais dos espermatozoides no pós-descongelamento. Os índices de motilidade e vigor espermáticos são melhorados pela adição do complexo ciclodextrina-colesterol aos diluentes que não contenham gema de ovo em sua composição e, também, se o sêmen for pré-incubado por 15 minutos com este complexo antes da adição do diluente de criopreservação.

No presente estudo foram avaliadas a integridade e a funcionalidade da membrana plasmática após a adição do complexo ciclodextrina-colesterol, diluído em extensores à base de Tris-Glicerol ou à base de Tris-Etilenoglicol-gema de ovo ao sêmen caprino. Avaliou-se também a forma de inclusão desse complexo (junto com o diluente ou pré-incubado por 15 minutos).

## **2. Material e métodos**

### **2.1. Comissão de ética animal**

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética da Universidade Federal de Viçosa, sob o número de registro do projeto: 50553400777.

### **2.2. Local**

O estudo foi conduzido no período de janeiro a março de 2011, no setor de Caprinocultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais. Viçosa localiza-se a 20°46'23" de latitude sul e 42°51'53" de longitude oeste, tem altitude média de 692,74 m e clima Cwa pela classificação de Köppen (inverno seco e verão úmido), com temperatura média anual de 19,4 °C e precipitação pluviométrica anual de 1.221 mm<sup>3</sup>.

### 2.3. Animais

Foram utilizados quatro reprodutores das raças Saanen (2) e Pardo Alpina (2), com idades entre 3 e 7 anos, simetria testicular, escroto sem qualquer alteração, prepúcio e pênis normais, boa libido e clinicamente normais, com fertilidade comprovada no próprio rebanho.

### 2.4. Delineamento experimental

Foram coletados três ejaculados de cada um dos quatro bodes, totalizando 12 ejaculados. Cada ejaculado foi avaliado, e aqueles considerados aptos para o congelamento, segundo os parâmetros mínimos de motilidade e vigor espermáticos exigidos pelo CBRA (1998), foram fracionados em seis alíquotas de  $350 \times 10^6$  espermatozoides (quantidade suficiente para sete doses de  $50 \times 10^6$  de espermatozoides/palheta de 0,25 mL. Cada alíquota recebeu um dos tratamentos a seguir: T<sub>Glicerol</sub> – controle negativo para o diluente à base de Tris-glicerol; T<sub>Glicerol + complexo</sub> – para o diluente à base de Tris-glicerol + Complexo Ciclodextrina-Colesterol; T<sub>Glicerol + complexo/préincubado</sub> – Complexo Ciclodextrina-Colesterol diluído em solução iso-osmótica ao sêmen (soro fisiológico) com 15 minutos de incubação antes da adição do diluente à base de Tris-glicerol; T<sub>Etilenoglicol</sub> – controle negativo para o diluente à base de Tris-Etilenoglicol-Gema de ovo; T<sub>Etilenoglicol + complexo</sub> – para o diluente à base de Tris-Etilenoglicol-Gema de ovo + Complexo Ciclodextrina-Colesterol e T<sub>Etilenoglicol+ complexo/pré-incubado</sub> – para o Complexo Ciclodextrina-Colesterol diluído em solução iso-osmótica ao sêmen (soro fisiológico), com 15 minutos de incubação antes da adição do diluente à base de Tris-Etilenoglicol-Gema de ovo.

### 2.5. Preparo do Complexo Ciclodextrina-Colesterol (CCC)

Metil-β-ciclodextrina foi carregada com colesterol, adotando-se a metodologia descrita por Purdy e Graham (2004), em que 200 mg de colesterol (C3045; Sigma) foram dissolvidos em 1 mL de clorofórmio (JT-Baker) em um tubo de vidro. Em um béquer foi dissolvido 1 g de metil-β-ciclodextrina (C4555; Sigma) em 2 mL de metanol (SYNTH). Em seguida, uma alíquota de 0,45 mL da solução de colesterol + clorofórmio foi adicionada à solução de ciclodextrina, e a mistura foi agitada até ficar clara. Então, a mistura foi colocada em uma

placa de Petri de vidro, e os solventes foram removidos por evaporação, usando placa aquecedora a 40 °C, por um período de 48 horas. Os cristais resultantes foram removidos da placa por raspagem, com auxílio de uma espátula, e estocados em tubos de vidro a 22 °C. A solução de trabalho de CCC foi preparada pela adição de 50 mg de CCC em 1 mL de diluidor BTALP a 37 °C e homogeneizada por agitação com auxílio de um agitador vortex. Essa solução foi mantida congelada -80 °C até sua utilização, quando foi aquecida a 37 °C e homogeneizada antes da incubação com sêmen.

## 2.6. Método de coleta do sêmen

O sêmen foi coletado por meio de vagina artificial, constituída por um cilindro rijo, aberto em ambas as extremidades, válvula controladora de entrada e saída de água e ar, mucosa de borracha, revestida internamente por um saco plástico (camisinha – dimensões externas: h = 26 cm; b = 25 cm; c = 10 cm, **Figura 1**). A extremidade de menor dimensão estava acoplada ao tubo de coleta graduado, com uma proteção de tecido escuro (modificado de MIES FILHO, 1987). A vagina foi preenchida com água a 60 °C e ar, até a obtenção da pressão necessária para a coleta do sêmen, obtendo-se a temperatura interna média de 41 °C (40 a 42 °C) no ato da coleta. Além disso, o tubo de coleta foi revestido com o saco de tecido escuro, para proteger o sêmen das variações térmicas e da radiação solar ultravioleta. Para coletas, em tronco de contenção, foram utilizadas cabras e mestre natural, como manequim, em dias alternados.



**Figura 1** – Vagina artificial utilizada para coleta de sêmen nos bodes (modelo artesanal).

## **2.7. Exames do sêmen**

O sêmen coletado foi colocado em banho-maria a 37 °C, para preservação dos espermatozoides durante as análises. Os materiais utilizados no experimento, como lâminas, lamínulas, pipetas e recipientes, foram colocados sobre uma placa aquecedora a 37 °C, evitando-se que os espermatozoides passassem por variações térmicas.

## **2.8. Volume seminal**

A determinação do volume do ejaculado foi realizada no laboratório, por meio de leitura no tubo de coleta graduado, antes de sua colocação no banho-maria.

## **2.9. Coloração seminal**

A cor do sêmen foi determinada visualmente, de acordo com Mies Filho (1987).

## **2.10. Aspecto seminal**

O aspecto seminal foi classificado em aquoso (1), leitoso (2) ou cremoso (3) (MIES FILHO, 1987).

## **2.11. Turbilhonamento espermático**

Para avaliação do turbilhonamento, foram colocados 10 µL de sêmen recém-coletado sobre lâmina a 37 °C, levando-a ao microscópio de contraste de fase, com aumento de dez vezes. A interpretação foi subjetiva, sendo considerada escala de 0 a 5 pontos (FONSECA *et al.*, 1992).

## **2.12. Motilidade espermática**

A motilidade espermática foi determinada ao colocar 10 µL de sêmen sobre uma lâmina e adicionando-se 100 µL do diluente de congelamento. Do material homogeneizado foram utilizados 10 µL, que foram colocados sobre a lâmina a 37 °C, que em seguida foi coberta com uma lamínula, levada ao



microscópio de contraste de fase com aumento de 40 vezes. A avaliação foi subjetiva, considerando-se variações de 0 a 100 %. Adiluição não foi usada para avaliação do sêmen congelado.

### **2.13. Vigor espermático**

O vigor espermático foi realizado a partir da lâmina preparada para motilidade espermática e classificado em uma escala de zero a 5 pontos, em que os valores mais elevados indicaram sêmen de melhor qualidade (FONSECA *et al.*, 1992).

### **2.14. Concentração espermática**

Para determinação da concentração espermática, foi utilizada a câmara hematocitométrica, modelo de Neubauer, em que o sêmen foi diluído em água destilada, na proporção de 1:199 (água: diluidor), utilizando-se a pipeta de volume variável. Preenchida a câmara de Neubauer, o material foi levado ao microscópio de contraste de fase com aumento de 40 vezes, onde se foram contados cinco quadrados dos 25 da câmara (FONSECA *et al.*, 1992). Em seguida aplicou-se a fórmula:

$$[ ]_{\text{sptz}} = \frac{N}{1/5 * 1/10 * 1/200}$$

em que

[ ]<sub>sptz</sub> = concentração espermática; e

N = número de espermatozoides contados.

### **2.15. Congelamento do sêmen**

As amostras foram congeladas, utilizando-seo meio comercial à base de Tris-glicerol (Bioxcell – IMV). O sêmen foi envasado em palhetas de 0,25 mL, que foram colocadas em tubo de ensaio de 20 mL, revestido por refil (saco plástico), e colocado dentro de recipiente de plástico com capacidade de 240 mL, contendo 125 mL de álcool etílico absoluto. O recipiente foi então colocado na posição horizontal dentro da geladeira, com temperatura interna entre 4 e 5 °C, durante 60 minutos.

O pré-congelamento foi realizado durante 15 minutos, em vapor de nitrogênio líquido, colocando-se as palhetas sobre suporte de aço inoxidável, à altura de 5 cm acima da superfície de nitrogênio líquido, acondicionadas em caixa de isopor com 40 cm de comprimento x 32 cm de altura x 20 cm de largura, contendo uma camada de 5 cm de altura de nitrogênio em seu interior.

Após esse período, as palhetas foram imersas no nitrogênio, para o congelamento final do sêmen. Em seguida, foram colocadas em raques, devidamente identificadas, ainda submersas no nitrogênio. As raques foram estocadas em botijão com nitrogênio líquido, para análises posteriores.

### **2.16. Teste de coloração supravital**

O teste foi realizado com 10  $\mu$ L do corante eosina-nigrosina, adicionado a 10  $\mu$ L de sêmen, homogeneizado, a 37 °C. Em seguida, realizou-se um esfregaço em lâmina, que após secar foi levada para leitura em microscópio ótico com aumento de 40 vezes. Foram consideradas normais às células que não estavam coradas, e aquelas que se apresentaram coradas de rósea foram consideradas lesadas.

### **2.17. Teste hiposmótico**

O teste foi realizado em solução de frutose a 100 mOsm/L. Para esse procedimento, uma alíquota de 20  $\mu$ L de sêmen foi adicionada a um microtubo plástico (capacidade – 2 mL), contendo 1 mL da solução hipo-osmótica, e incubada em banho-maria a 37 °C, por 30 minutos. Após o término da incubação, foram adicionados 500  $\mu$ L de formol salino a 10%, para posterior análise em microscópio ótico com um aumento de 100 vezes. Foram considerados com membrana plasmática funcional aqueles espermatozoides que durante a incubação sofreram dobramento da cauda, e os que não sofreram foram considerados com membrana plasmática afuncional.

### **2.18. Teste de coloração por sondas fluorescentes**

Foram realizadas análises com os marcadores fluorescentes: FITC – PSA = esta sonda é utilizada para corar o conteúdo acrossomal em células

com lesão na membrana acrossomal – as células foram consideradas com lesão de membrana acrossoma, incluindo aquelas com reação acrossômica, sendo contabilizadas aquelas sem lesão de membrana, ou seja, com membrana acrossomal íntegra; Iodeto de Propídio (IP) + Dietilcarboxifluoresceína: a primeira sonda é utilizada para corar o conteúdo celular dos espermatozoides com lesão na membrana plasmática, enquanto a segunda é utilizada para corar o conteúdo celular dos espermatozoides. Quando utilizada junto com a primeira, evidencia os espermatozoides com a membrana plasmática íntegra; JC – 1: esta sonda é utilizada para corar o conteúdo das mitocôndrias da bainha mitocondrial dos espermatozoides, corando a bainha mitocondrial com atividade intensa de laranja e de verde as células com pouca atividade. Foram contabilizadas as células com a bainha mitocondrial de coloração laranja, ou seja, com intensa atividade da bainha mitocondrial. Para isto, uma alíquota de 50 µL de sêmen descongelado ( $50 \times 10^6$  espermatozoides/mL) foi colocada em um microtubo (capacidade = 2 mL). Em seguida foram adicionados a esse microtubo 5 µL de FITC-PSA (100 µg/mL), 5 µL de iodeto de propídio (0,3 mg/mL), 5 µL de dietilcarboxifluoresceína (0,46 mg/mL) e 5 µL de JC – 1 (153 µM), sendo então os microtubos incubados em banho-maria à 37 °C, por 8 minutos.

Após a incubação, cada alíquota de 5 µL da solução de sêmen + sondas foi colocada sobre uma lâmina, coberta com lamínula e avaliada imediatamente em microscópio de fluorescência (Olympus – Modelo BX 60F5), equipado com filtro de excitação (365 nm) e filtro de barreira (410 nm), com aumento de 1.000 vezes. Foram contadas 100 células espermáticas, classificadas de acordo com a fluorescência emitida.

## **2.19. Análise estatística**

A análise estatística seguiu os seguintes critérios: o teste de Lilliefors foi utilizado para verificação de normalidade dos dados. Para avaliar a homocedasticidade das variâncias foi empregado o teste de Cochran e Bartlett. Nas variáveis quantitativas com distribuição normal foi empregado ANOVA. Nas variáveis que apresentaram diferenças foi realizado o teste de comparação de médias, escolhido com base no coeficiente de variação (CV): para as

variáveis com CV menor ou igual a 15 % foi escolhido o teste de Tukey e para CV maior que 15 % e menor ou igual a 30 % o teste escolhido foi o teste de Student-Newman-Keuls (SNK). Para CV maior que 30 % o teste adotado foi o teste de Duncan. Para as variáveis qualitativas e variáveis quantitativas que não apresentaram distribuição normal foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. A correlação simples de Pearson foi feita entre todas as variáveis estudadas. O valor de  $\alpha$  foi de 5% para todos os parâmetros avaliados.

### 3. Resultados e discussão

Para comparação dos dados observados no presente estudo com os encontrados na literatura consultada, e realização da inferência destes dados com a população, criou-se um intervalo de confiança de 95% de certeza de conter a média real da população para todas as variáveis analisadas. Calculou-se também o erro-padrão da média dos dados observados da literatura, sendo estes expressos quando comparados aos dados deste estudo. Os valores médios com seus respectivos erros-padrão da média ( $Média \pm S_{\bar{x}}$ ), referentes ao aspecto do sêmen (ASPEC), à coloração seminal (COL), ao volume do ejaculado (VOL), à concentração espermática (CONC), à motilidade espermática (MT) e ao vigor espermático (VIG) do sêmen a fresco, encontram-se sumariados na **Tabela 1**. Não houve variação ( $P>0,05$ ) entre os animais utilizados em qualquer variável estudada.

**Tabela 1** – Médias, erro-padrão da média do volume, aspecto, coloração, turbilhonamento, motilidade, vigor e concentração e espermáticos do sêmen fresco

Descrição	Média	$S_{\bar{x}}$
VOL	1,14	0,10
ASP	1,79	0,07
COL	2,09	0,17
TURB	3,81	0,18
MOT	82,85	1,39
VIG	4,24	0,03
CONC	2,82	0,16

VOL = volume do sêmen (mL); ASPEC = aspecto do sêmen; COL = coloração seminal; TURB = turbilhonamento espermático (0-5); MOTF = motilidade espermática do sêmen fresco (%); VIGF = vigor espermático do sêmen fresco (0-5); e CONC = concentração espermática (SPTZs \*  $10^9$ /mL).

O volume médio de sêmen (mL) coletado foi  $1,14 \pm 0,41$ , superior a  $0,7 \pm 0,32$  coletado por Martins *et al.* (2006), a  $0,7 \pm 0,2$  por Rovay (2006) e a  $0,9 \pm 0,3$  por Castilho (2008); e igual ao  $1,06 \pm 0,02$  mL coletado por Siqueira (2006) e  $1,1 \pm 0,15$  mL por Santos (2010), corroborando com os valores considerados normais para bodes durante a estação reprodutiva (KARATZAS *et al.*, 1997). O volume do sêmen varia de acordo com o método de coleta, com a idade do animal, com a estação e com a frequência das coletas, variando entre 0,5 e 2 mL em animais adultos e de 0,5 a 0,7 mL nos jovens (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

Observou-se turbilhonamento médio de  $3,81 \pm 0,8$ , igual a  $3,83 \pm 0,57$  reportado por Siqueira (2006),  $4,06 \pm 0,66$  por Martins *et al.* (2006),  $4,0 \pm 0,6$  por Castilho (2008) e a  $3,6 \pm 0,23$  constatado por Santos (2010).

A motilidade espermática do sêmen fresco observada foi  $80,7 \pm 0,33$ , superior a  $77,5 \pm 1,37$  obtido por Santos (2010), a  $72,00 \pm 11,59$  reportado por Bittencourt *et al.* (2007) e a  $86,0 \pm 4,0$  por Rovay (2006); e igual a  $82,87 \pm 7,32$  reportado por Martins *et al.* (2006) e a  $83,0 \pm 5,0$  por Siqueira (2006). Os valores observados estão de acordo com os valores mínimos de motilidade espermática preconizados para congelamento de sêmen para espécie caprina, pelo CBRA (1998).

A média do vigor espermático do sêmen fresco foi  $4,24 \pm 0,47$ , igual a  $4,0 \pm 0,8$  obtido por Rovay (2006), a  $4,14 \pm 0,48$  por Siqueira (2006) e a  $4,1 \pm 0,3$  por Castilho (2008), diferindo de  $3,35 \pm 0,46$  reportado por Martins *et al.* (2006) e a  $3,8 \pm 0,1$  por Santos (2010), sendo estes superiores ao valor mínimo preconizado pelo CBRA (1998).

A concentração espermática média observada foi de  $2,82 \pm 1,33 \times 10^9$  espermatozoides/mL, igual aos resultados de  $3,45 \pm 1,25 \times 10^9$  espermatozoides/mL obtidos por Martins *et al.* (2006) e a  $2,2 \pm 0,7 \times 10^9$  espermatozoides/mL por Rovay (2006), sendo superior aos resultados observados por Santos (2010)  $1,94 \pm 0,21 \times 10^9$  espermatozoides e por Siqueira (2006)  $2,02 \pm 0,64 \times 10^9$  espermatozoides/mL, de forma que a concentração espermática encontrava-se dentro do esperado para caprinos adultos, hígidos, com fertilidade comprovada.

Os valores das médias, o erro-padrão das médias e o coeficiente de variação da motilidade espermática do sêmen descongelado estão sumariados na **Tabela 2**.

**Tabela 2** – Médias, erro-padrão das médias e coeficiente de variação da motilidade espermática do sêmen descongelado

Tratamento	Média (%)	S <sub>x</sub>	CV (%)
T <sub>Glicerol</sub>	29,55 <sup>c</sup>	2,81	31,62
T <sub>Glicerol + complexo</sub>	35,00 <sup>b</sup>	1,51	14,92
T <sub>Glicerol + complexo/pré-incubado</sub>	37,08 <sup>a</sup>	2,17	20,29
T <sub>Etilenoglicol</sub>	23,64 <sup>f</sup>	4,10	57,62
T <sub>Etilenoglicol + complexo</sub>	25,83 <sup>e</sup>	3,98	53,38
T <sub>Etilenoglicol+ complexo/pré-incubado</sub>	29,17 <sup>d</sup>	4,52	53,63

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem entre si (P<0,05), pelo teste de Student–Newman-Keuls (SNK).

As médias da motilidade espermática diferiram (P<0,05) entre todos os tratamentos T<sub>Glicerol + complexo/préincubado</sub> (37,08 ± 2,17), T<sub>Glicerol + complexo</sub> (35,00 ± 1,51), T<sub>Glicerol</sub> (29,55 ± 2,81), T<sub>Etilenoglicol+ complexo/préincubado</sub> (29,17 ± 4,52), T<sub>Etilenoglicol + complexo</sub> (25,83 ± 3,98) e T<sub>Etilenoglicol</sub> (23,64 ± 4,10). O controle à base de Tris-glicerol T1 apresentou resultado igual ao encontrado por Betini *et al.* (1998 – 31,33 ± 1,12), superior ao resultado observado para o diluente à base de Tris-Etilenoglicol-gema de ovo T<sub>Etilenoglicol</sub> e inferior aos resultados obtidos por Bittencourt *et al.* (2004 – 51,0 ± 6,14), Bittencourt *et al.* (2007 – 41,5 ± 8,18), Dias (2010 – 42,2 ± 2,0) e Silva (2011 – 49,2 ± 4,9). O processo de criopreservação do sêmen causa danos ultraestruturais, bioquímicos e funcionais aos espermatozoides, resultando na redução da motilidade e viabilidade espermática (LEBOEUF *et al.*, 2000). Constatou-se que o diluente à base de Tris-glicerol teve melhor desempenho em manter a espermática que o diluente à base de Tris-gema de ovo - etileno glicol, o que corrobora com os resultados obtidos por Silva *et al.* (2012). Os pesquisadores também verificaram que 5 % de Etilenoglicol foi deletério aos gametas e resultou em menor motilidade espermática, e que, independentemente do diluente, a pré-incubação do sêmen com o complexo ciclodextrina-colesterol preservou mais a motilidade espermática que a adição direta do complexo junto ao diluente ou ao não uso desse, o que corrobora com os resultados observados por Mocé e Graham (2006), que adicionando 2,0 mg do motilidade Complexo Ciclodextrina-Colesterol ao sêmen bovino determinaram o aumento do percentual de células móveis.

As médias, o erro-padrão das médias e o coeficiente de variação do vigor espermático do sêmen descongelado estão sumariados na **Tabela 3**.

**Tabela 3** – Médias, erro-padrão das médias e coeficiente de variação do vigor espermático do sêmen descongelado

Tratamento	Média (0-5)	S <sub>x</sub>	CV (%)
T <sub>Glicerol</sub>	2,22 <sup>a</sup>	0,18	27,24
T <sub>Glicerol + complexo</sub>	2,29 <sup>a</sup>	0,18	27,06
T <sub>Glicerol + complexo/pré-incubado</sub>	2,75 <sup>a</sup>	0,20	25,12
T <sub>Etilenoglicol</sub>	2,59 <sup>a</sup>	0,35	45,51
T <sub>Etilenoglicol + complexo</sub>	2,91 <sup>a</sup>	0,12	14,31
T <sub>Etilenoglicol+ complexo/pré-incubado</sub>	2,96 <sup>a</sup>	0,31	37,07

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem entre si (P<0,05), pelo teste de ANOVA.

O vigor espermático do sêmen descongelado não foi afetado pelos tratamentos aplicados (P>0,05), apresentando as seguintes médias: T<sub>Etilenoglicol+ complexo/pré-incubado</sub> (2,96 ± 0,31), T<sub>Etilenoglicol + complexo</sub> (2,91 ± 0,12), T<sub>Glicerol + complexo/pré-incubado</sub> (2,75 ± 0,2), T<sub>Etilenoglicol</sub> (2,59 ± 0,35), T<sub>Glicerol + complexo</sub> (2,29 ± 0,18) e T<sub>Glicerol</sub> (2,22 ± 0,18). Estes resultados foram iguais aos 2,5 ± 0,4 reportados por Maia *et al.* (2011) e inferiores aos 2,46 ± 0,11 obtidos por Betini *et al.* (1998), 3,15 ± 0,24 por Bittencourt *et al.* (2004), 4,1 ± 0,21 por Bittencourt *et al.* (2007), 3,3 ± 0,1 por Dias (2010) e 3,2 ± 0,8 por Silva *et al.* (2012). Pode-se concluir então que tanto a adição do complexo ciclodextrina-colesterol quanto o uso dos diluentes à base de Tris-glicerol ou Tris-gema de ovo – etileno glicol não alteraram o vigor espermático, resultados estes semelhantes aos obtidos por Silva *et al.* (2012) e diferentes aos obtidos por Bittencourt *et al.* (2005), que trabalhando com diluentes à base de glicerol e etilenoglicol observaram queda significativa no vigor espermático quando o etilenoglicol foi usado.

As médias, o erro-padrão das médias e o coeficiente de variação do teste hiposmótico, para avaliação da integridade da membrana plasmática, estão na **Tabela 4**.

**Tabela 4** – Médias, erro-padrão das médias e coeficiente de variação do teste hiposmótico

Tratamento	Média (%)	S <sub>x</sub>	CV (%)
T <sub>Glicerol</sub>	44,80 <sup>a</sup>	2,31	16,30
T <sub>Glicerol + complexo</sub>	45,05 <sup>a</sup>	4,83	33,90
T <sub>Glicerol + complexo/pré-incubado</sub>	52,00 <sup>a</sup>	4,00	23,09
T <sub>Etilenoglicol</sub>	44,39 <sup>a</sup>	4,66	31,52
T <sub>Etilenoglicol + complexo</sub>	39,60 <sup>a</sup>	4,96	39,64
T <sub>Etilenoglicol+ complexo/pré-incubado</sub>	49,65 <sup>a</sup>	5,90	37,58

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem entre si (P<0,05), pelo teste de Anova.

Não foram observadas diferenças (P>0,05) nos percentuais médios para integridade de membrana pelo teste hiposmótico dos tratamentos T<sub>Glicerol + complexo/pré-incubado</sub> (52,0 ± 4), T<sub>Etilenoglicol+ complexo/pré-incubado</sub> (49,65 ± 5,9), T<sub>Glicerol + complexo</sub> (45,05 ± 4,83), T<sub>Glicerol</sub> (44,8 ± 2,31), T<sub>Etilenoglicol</sub> (44,39 ± 4,66) e T<sub>Etilenoglicol + complexo</sub> (39,6 ± 4,96). Estes resultados foram superiores aos observados por Oliveira *et al.* (2013 – 34,8 ± 3,6) e inferiores aos de Alves *et al.* (2006 – 55,25 ± 3,19). Pode-se concluir dois fatos com esses resultados: 1<sup>o</sup>) ambos os diluentes utilizados não diferiram quanto ao número de células reativas ao teste hiposmótico; e 2<sup>o</sup>) a adição do complexo ciclodextrina-colesterol não alterou a integridade da membrana espermática, o que contraria os resultados obtidos por Bittencourt (2003), em que o Etilenoglicol apresentou diminuição no percentual de células reativas em relação ao glicerol.

Os resultados das médias, erro-padrão das médias e o coeficiente de variação do teste supravital, para avaliação da funcionalidade da membrana plasmática, estão na **Tabela 5**.

Não foram constatadas diferenças (P>0,05) entre as médias dos tratamentos T<sub>Etilenoglicol + complexo/préincubado</sub> (29,0 ± 3,82), T<sub>Etilenoglicol + complexo</sub> (26,96 ± 4,73), T<sub>Glicerol + complexo/pré-incubado</sub> (24,5 ± 4,2), T<sub>Glicerol + complexo</sub> (23,54 ± 4,49), T<sub>Glicerol</sub> (20,79 ± 3,35) e T<sub>Etilenoglicol</sub> (19,45 ± 4,08), para funcionalidade da membrana plasmática. Esses resultados foram inferiores aos obtidos por Betini *et al.* (1998 – 29,06 ± 0,67), Oliveira *et al.* (2009 – 61,79 ± 9,8) e Dias (2010 – 38,53 ± 9,33). Pode-se verificar que o uso de ambos os diluentes e/ou a adição do complexo ciclodextrina-colesterol com ou sem pré-incubação não interfere na funcionalidade da membrana plasmática dos espermatozoides.



**Tabela 5** – Médias, erro-padrão das médias e coeficiente de variação do teste supravital

Tratamento	Média (%)	S <sub>x</sub>	CV (%)
T <sub>Glicerol</sub>	20,79 <sup>a</sup>	3,35	55,87
T <sub>Glicerol + complexo</sub>	23,54 <sup>a</sup>	4,49	66,01
T <sub>Glicerol + complexo/pré-incubado</sub>	24,50 <sup>a</sup>	4,20	59,43
T <sub>Etilenoglicol</sub>	19,45 <sup>a</sup>	4,08	72,71
T <sub>Etilenoglicol + complexo</sub>	26,96 <sup>a</sup>	4,73	60,86
T <sub>Etilenoglicol+ complexo/pré-incubado</sub>	29,00 <sup>a</sup>	3,82	45,60

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem entre si (P<0,05), pelo teste de ANOVA.

As médias, o erro-padrão das médias e o coeficiente de variação do teste com sonda fluorescente (JC – 1), verificando células com alta produção da bainha mitocondrial, estão sumariados na **Tabela 6**.

**Tabela 6** – Médias, erro-padrão das médias e coeficiente de variação do teste com sonda de imunofluorescência (JC – 1), verificando células com alta produção da bainha mitocondrial

Tratamento	Média (%)	S <sub>x</sub>	CV (%)
T <sub>Glicerol</sub>	11,64 <sup>e</sup>	5,43	61,53
T <sub>Glicerol + complexo</sub>	7,76 <sup>f</sup>	3,31	46,98
T <sub>Glicerol + complexo/pré-incubado</sub>	11,92 <sup>d</sup>	6,89	100,00
T <sub>Etilenoglicol</sub>	59,19 <sup>c</sup>	9,57	91
T <sub>Etilenoglicol + complexo</sub>	62,92 <sup>a</sup>	8,34	45,90
T <sub>Etilenoglicol+ complexo/pré-incubado</sub>	62,72 <sup>b</sup>	8,79	48,50

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem entre si (P<0,05), pelo teste de Duncan.

Foram constatadas diferenças (P<0,05) na produção de ATP na bainha mitocondrial nos tratamentos T<sub>Etilenoglicol + complexo</sub> (62,92 ± 8,34), T<sub>Etilenoglicol+ complexo/pré-incubado</sub> (62,72 ± 8,79), T<sub>Etilenoglicol</sub> (59,19 ± 9,57), T<sub>Glicerol + complexo/pré-incubado</sub> (11,92 ± 6,89), T<sub>Glicerol</sub> (11,64 ± 5,43) e T<sub>Glicerol + complexo</sub> (7,76 ± 3,31). Os resultados obtidos no tratamento T4 foram iguais aos resultados obtidos por Soares *et al.* (2011 – 47,45 ± 9,3) e inferiores aos resultados de Silva *et al.* (2011 – 62,7 ± 18,1), no entanto, todos foram superiores aos resultados verificados no tratamento T<sub>Glicerol</sub>. Com isto, observou-se que o diluente à base de Tris-gema de ovo-etileno glicol tem desempenho superior em estimular a produção de ATP na bainha mitocondrial, em relação ao diluente à base de

Tris-glicerol, e que a adição do complexo ciclodextrina-colesterol, assim como a forma como foi administrado, interferiu positivamente na produção de ATP. Estes resultados contrariam os obtidos por Gonzalez (2009), que constatou que o diluente à base de glicerol apresentou maior produção na bainha mitocondrial e maior proteção para as células contra os efeitos da criopreservação que o diluente à base de etilenoglicol e dimetilformamida.

Os dados referentes à integridade de membrana acrossomal obtidos por meio da sonda FITC-PSA estão **Tabela 7**.

**Tabela 7** – Médias, erro-padrão das médias e coeficiente de variação do teste com sonda de imunofluorescência (FITC – PSA), verificando integridade de membrana acrossomal

Tratamento	Média (%)	S <sub>x</sub>	CV (%)
T <sub>Glicerol</sub>	47,06 <sup>d</sup>	4,31	31,69
T <sub>Glicerol + complexo</sub>	46,88 <sup>e</sup>	6,58	48,63
T <sub>Glicerol + complexo/pré-incubado</sub>	44,60 <sup>f</sup>	8,57	66,54
T <sub>Etilenoglicol</sub>	78,19 <sup>a</sup>	5,82	24,68
T <sub>Etilenoglicol + complexo</sub>	70,68 <sup>c</sup>	5,77	28,29
T <sub>Etilenoglicol+ complexo/pré-incubado</sub>	74,43 <sup>b</sup>	6,31	29,35

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem entre si (P<0,05), pelo teste de Duncan.

Foram observadas diferenças (P<0,05) na integridade de membrana acrossomal nos tratamentos T<sub>Etilenoglicol</sub> (78,19 ± 5,82), T<sub>Etilenoglicol+ complexo/pré-incubado</sub> (74,43 ± 6,31), T<sub>Etilenoglicol + complexo</sub> (70,68 ± 5,77), T<sub>Glicerol</sub> (47,06 ± 4,31), T<sub>Glicerol + complexo</sub> (46,88 ± 6,58) e T<sub>Glicerol + complexo/pré-incubado</sub> (44,6 ± 8,57). Os resultados de T1 e T4 foram inferiores aos observados por Silva *et al.* (2011 - 33,3 ± 10,2) e Soares *et al.* (2011 – 38,76 ± 12,23). O efluxo de colesterol da membrana é essencial durante o processo de capacitação, para o desencadeamento da capacitação e reação acrossomal (GADELLA *et al.*, 2001). Portanto, o colesterol presente em altos níveis na membrana possui a capacidade de interferir no padrão fisiológico de capacitação e reação acrossomal (ZAHN *et al.*, 2002). Os resultados deste estudo evidenciaram que o diluente à base de Tris-Etilenoglicol-gema de ovo apresentou desempenho superior ao do diluente à base de Tris-glicerol, referente à capacidade de manter a integridade da membrana acrossoma, e que a adição do complexo ciclodextrina-colesterol interferiu negativamente na integridade da membrana.

Este último resultado contraria a ideia de que o tratamento com o Complexo Ciclodextrina-Colesterol aumentaria o teor de colesterol da membrana dos espermatozoides e que esse aumento retardaria a reação acrossômica, uma vez que a incorporação de colesterol à membrana plasmática, carregado por ciclodextrina, teria a habilidade de atrasar a capacidade de sofrer reação acrossômica de espermatozoides humanos (KHORASANI *et al.*, 2000), equinos (ZAHN *et al.*, 2002), bovinos (PURDY; GRAHAN, 2004), o que garantiria um tempo maior de viabilidade dessas células nos órgãos reprodutivos femininos.

Os dados referentes à integridade da membrana plasmática dos espermatozoides testados por meio das sondas fluorescentes (Iodeto de propídio e Dietilcarboxifluorosceína ou Diacetato de **Carboxifluoresceína**) estão sumarizados na **Tabela 8**. Não foram constatadas diferenças ( $P > 0,05$ ) na integridade de membrana plasmática por meio das sondas fluorescentes (IP + Dietilcarboxi-fluorosceína) nos tratamentos  $T_{\text{Glicerol}}$  ( $63,98 \pm 8,4$ ),  $T_{\text{Glicerol} + \text{complexo}}$  ( $63,08 \pm 9,05$ ),  $T_{\text{Glicerol} + \text{complexo/pré-incubado}}$  ( $52,24 \pm 9,47$ ), T5 ( $52,09 \pm 10,88$ ),  $T_{\text{Etilenoglicol} + \text{complexo/pré-incubado}}$  ( $44,37 \pm 8,96$ ) e  $T_{\text{Etilenoglicol}}$  ( $37,19 \pm 10,81$ ). O tratamento  $T_{\text{Glicerol} + \text{complexo/pré-incubado}}$  apresentou resultado inferior aos obtidos por Silva *et al.* (2011 –  $38,2 \pm 16,4$ ) e Soares *et al.* (2011 –  $39,55 \pm 8,91$ ). Pode-se verificar que os resultados das análises com as sondas fluorescentes repetiram os resultados do teste hiposmótico, e que a base dos diluentes utilizados não diferiu na manutenção da integridade da membrana plasmática. A adição do Complexo Ciclodextrina-Colesterol contrariou os resultados de Zahn *et al.* (2010), que trabalhando com sêmen de garanhões constataram aumento da integridade da membrana pós-descongelamento nos grupos tratados com o complexo.

Os dados referentes às correlações entre os aspectos físicos do sêmen *in natura* e descongelado, o teste supravital, o teste hiposmótico e os testes com sondas fluorescentes por tratamento estão sumariados na **Tabela 9**.

No  $T_{\text{Glicerol}}$ , os valores obtidos no teste de integridade de membrana por meio de sondas fluorescente (IP + Dietilcarboxifluorosceína) apresentaram correlação negativa ( $r = -0,81$ ) com os resultados do teste de integridade de membrana acrossomal por meio da sonda FITC-PSA.

**Tabela 8** – Médias, erro-padrão das médias e coeficiente de variação do teste com sondas de imunofluorescência (Iodeto de propídio e Dicarboxifluorosceína), verificando integridade de membrana plasmática

Tratamento	Média (%)	S <sub>x</sub>	CV (%)
T <sub>Glicerol</sub>	63,98 <sup>a</sup>	8,40	45,46
T <sub>Glicerol + complexo</sub>	63,08 <sup>a</sup>	9,05	49,75
T <sub>Glicerol + complexo/pré-incubado</sub>	52,24 <sup>a</sup>	9,47	62,78
T <sub>Etilenoglicol</sub>	37,19 <sup>a</sup>	10,81	96,47
T <sub>Etilenoglicol + complexo</sub>	52,09 <sup>a</sup>	10,88	72,36
T <sub>Etilenoglicol+ complexo/pré-incubado</sub>	44,37 <sup>a</sup>	8,96	70,00

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem entre si (P<0,05), pelo teste de Anova.

No T<sub>Glicerol+Complexo</sub>, os valores obtidos no teste de integridade de membrana por meio das sondas fluorescentes (IP + Dietilcarboxifluorosceína) apresentaram correlação positiva ( $r = 0,61$ ) com a coloração espermática ( $r = 0,65$ ) e com a concentração espermática, e negativa ( $r = - 0,53$ ) com os resultados do teste de integridade de membrana acrossomal por meio da sonda fluorescente FITC-PSA; esta última apresentou ainda correlação negativa ( $r = - 0,53$ ) com os resultados do teste de atividade da bainha mitocondrial.

No T<sub>Glicerol+Complexo/Préincubado</sub>, não houve correlação entre os valores obtidos no teste de integridade de membrana por meio das sondas fluorescentes (IP + Dietilcarboxifluorosceína) com os parâmetros seminais pré-congelamento e os testes que avaliaram as membranas plasmática e acrossomal, nem com os resultados do teste de atividade de bainha mitocondrial.

No T<sub>Etilenoglicol</sub>, os valores obtidos no teste de integridade de membrana por meio das sondas fluorescentes (IP + Dietilcarboxifluorosceína) apresentaram correlação positiva ( $r = 0,61$ ) com o volume seminal e negativa ( $r = -0,8$ ) com o resultado do teste de integridade de membrana acrossomal por meio da sonda fluorescente FITC-PSA; este último apresentou ainda correlação negativa ( $r = -0,45$ ) com o volume seminal ( $r = -0,53$ ) e com o aspecto seminal.

No T<sub>Etilenoglicol+complexo</sub>, os valores obtidos no teste de integridade de membrana por meio das sondas fluorescentes (IP + Dietilcarboxifluorosceína) apresentaram correlação positiva ( $r = 0,68$ ) com o aspecto seminal e negativa ( $r = -0,64$ ) com os resultados do teste de integridade de membrana acrossomal por meio do teste da sonda FITC-PSA; este último ainda apresentou correlação positiva ( $r = 0,61$ ) com os resultados do teste de atividade de bainha

Tabela 9 – Correlações simples de Pearson entre aspectos físicos do sêmen *in natura* e descongelado, teste supravital e testes com sondas fluorescentes (iodeto de propídio+dicarboxifluorosceína; FITC-PSA; JC-1)

T <sub>GLICEROL</sub>	COLETA	VOL	ASP	COR	TURB	MOT	VIG	CONC	MOTD	VIGD	SPV	MEM	ACRO	PBM
COLETA	1	0,21	0	0	0,32	-0,16	0,47	0,24	-0,14	0,50*	0,31	0,29	-0,34	0,27
VOL		1	-0,15	-0,54	-0,01	0,52*	-0,73	-0,3	0,50*	-0,05	0,2	0,25	-0,21	0,27
ASP			1	0,68*	0,78*	-0,56*	-0,11	0,34	-0,52*	0,63*	-0,35	0,17	-0,25	-0,26
COR				1	0,44	-0,78*	-0,23	0,7*	-0,67*	0,29	-0,26	0,13	-0,09	-0,48
TURB					1	-0,38	0	0,1	-0,39	0,88*	0,1	0,11	-0,22	-0,06
MOT						1	0,26	-0,69*	0,97*	-0,21	-0,1	-0,24	0,19	0,41
VIG							1	0,07	0,31	0,47	-0,34	0,34	-0,44	0,49
CONC								1	-0,53*	0,11	-0,25	0,44	-0,34	-0,47
MOTD									1	-0,2	-0,21	-0,18	0,14	0,33
VIGD										1	-0,07	0,26	-0,4	0,17
SPV											1	0,03	0,11	0,2
MEM												1	-0,81*	0,44
ACRO													1	-0,48
PBM														1

Continua...

Tabela 9, Cont.

T <sub>GLICEROL</sub>	COLETA	VOL	ASP	COR	TURB	MOT	VIG	CONC	MOTD	VIGD	SPV	MEM	ACRO	PBM
COLETA	1	0,21	0	0	0,32	-0,16	0,47	0,24	-0,14	0,5*	-0,01	0,01	-0,16	-0,38
VOL		1	-0,15	-0,54*	-0,01	0,52*	-0,07	-0,3	0,5*	-0,05	-0,1	-0,1	0,06	-0,1
ASP			1	0,68*	0,78*	-0,56*	-0,11	0,34	-0,52*	0,63*	0,54*	0,48	-0,53*	0,34
COR				1	0,45	-0,78*	-0,23	0,7*	-0,67*	0,28	0,57*	0,61*	-0,4	0
TURB					1	-0,38	0	0,1	-0,39	0,88*	0,54*	0,27	-0,64*	-0,06
MOT						1	0,26	-0,69*	0,98*	-0,21	-0,45	-0,39	0,19	-0,13
VIG							1	0,07	0,31	0,47	-0,48	0,03	-0,19	0,12
CONC								1	-0,53*	0,12	-0,02	0,65*	-0,33	-0,03
MOTD									1	-0,2	-0,49	-0,25	0,11	-0,17
VIGD										1	0,25	0,25	-0,66	0
SPV											1	0,29	-0,28	-0,15
MEM												1	-0,53*	-0,15
ACRO													1	-0,53*
PBM														1

Continua...

Tabela 9, Cont.

TGLICEROL+C OMPLEXO/PRÉI NCUBADO	COLETA	VOL	ASP	COR	TURB	MOT	VIG	CONC	MOTD	VIGD	SPV	MEM	ACRO	PBM
COLETA	1	0,21	0	0	0,32	-0,16	0,47	0,24	-0,14	0,5*	-0,09	-0,43	0,31	0,32
VOL		1	-0,15	-0,54	-0,01	0,52*	-0,07	-0,3	0,5*	-0,05	0,06	0,08	0,01	0,11
ASP			1	0,68*	0,78	-0,56	-0,11	0,34	-0,52*	0,63*	0,23	0,18	-0,39	0,3
COR				1	0,45	-0,78*	-0,23	0,7*	-0,68*	0,29	0,26	0	-0,37	0,23
TURB					1	-0,38	0	0,1	-0,39	0,88*	0,4	0,08	-0,21	0,42
MOT						1	0,26	-0,69*	0,98*	-0,21	-0,2	0,28	0,25	-0,23
VIG							1	0,07	0,31	0,47	-0,68*	0,17	0,29	-0,17
CONC								1	-0,53*	0,12	-0,27	-0,15	-0,43	0,08
MOTD									1	-0,2	-0,28	0,31	0,16	-0,24
VIGD										1	0,03	0,15	-0,05	0,29
SPV											1	-0,2	0,17	0,48
MEM												1	-0,36	-0,09
ACRO													1	0,29
PBM														1

Continua...

Tabela 9, Cont.

TETILENOGLICOL	COLETA	VOL	ASP	COR	TURB	MOT	VIG	CONC	MOTD	VIGD	SPV	MEM	ACRO	PBM
COLETA	1	0,21	0	0	0,32	-0,16	0,47	0,24	-0,11	0,48	-0,44	0,01	-0,05	0,11
VOL		1	-0,15	-0,54*	-0,01	0,52*	-0,07	-0,3	0,56*	-0,1	-0,01	0,61*	-0,45*	0,2
ASP			1	0,68*	0,78*	-0,56*	-0,11	0,34	-0,52*	0,62*	0,31	0,46	-0,53*	-0,04
COR				1	0,45	-0,78*	-0,23	0,7*	-0,68*	0,3	0,14	-0,05	-0,04	-0,2
TURB					1	-0,38	0	0,1	-0,39	0,88*	0,41	0,25	-0,48	-0,26
MOT						1	0,26	-0,69*	0,97*	-0,19	0,23	0,13	-0,03	-0,25
VIG							1	0,07	0,33	0,46	-0,06	0,15	0,02	0,2
CONC								1	-0,56*	0,04	-0,3	0,13	-0,08	0,42
MOTD									1	-0,18	0,21	0,26	-0,12	-0,19
VIGD										1	0,42	0,24	-0,39	-0,21
SPV											1	0,2	-0,9	-0,21
MEM												1	-0,8*	0,46
ACRO													1	-0,12
PBM														1

Continua...



Tabela 9, Cont.

TETILENOGLICOL +COMPLEXO	COLETA	VOL	ASP	COR	TURB	MOT	VIG	CONC	MOTD	VIGD	SPV	MEM	ACRO	PBM
COLETA	1	0,21	0	0	0,32	-0,16	0,47	0,24	-0,14	0,5*	-0,22	-0,20	-0,07	-0,28
VOL		1	-0,15	-0,54*	-0,01	0,52*	-0,07	-0,3	0,5*	-0,05	-0,04	0,25	0,20	0,11
ASP			1	0,68*	0,78*	-0,56*	-0,11	0,34	-0,52*	0,63*	0,02	0,68*	-0,55*	0,27
COR				1	0,44	-0,78*	-0,23	0,7*	-0,67*	0,29	-0,24	0,12	-0,30	-0,02
TURB					1	-0,38	0	0,1	-0,39	0,88*	0	0,48	-0,28	0,1
MOT						1	0,26	-0,69*	0,98*	-0,21	0,32	-0,06	0,22	-0,2
VIG							1	0,07	0,31	0,47	0,2	0,11	-0,01	0,24
CONC								1	-0,53*	0,12	-0,47	-0,04	-0,25	-0,01
MOTD									1	-0,2	0,26	-0,07	0,17	-0,25
VIGD										1	0,1	0,47	-0,47	0,08
SPV											1	0,28	-0,34	0,4
MEM												1	-0,64*	0,61*
ACRO													1	-0,2
PBM														1

Continua...

Tabela 9, Cont.

ETILENOGLICOL+ COMPLEXO/PRÉ- INCUBADO	COLETA	VOL	ASP	COR	TURB	MOT	VIG	CONC	MOTD	VIGD	SPV	MEM	ACRO	PBM
COLETA	1	0,21	0	0	0,32	-0,16	0,47	0,24	-0,14	0,5*	-0,31	-0,34	0,01	-0,51
VOL		1	-0,15	-0,54*	-0,01	0,52*	-0,07	-0,3	0,5*	-0,05	0,19	0,34	-0,23	-0,29
ASP			1	0,68*	0,78*	-0,56*	-0,11	0,34	-0,52*	0,63*	0,14	0,42	-0,57*	0,15
COR				1	0,45	-0,78*	-0,23	0,7*	-0,67*	0,29	0,21	0,21	-0,49	0,11
TURB					1	-0,38	0	0,1	-0,39	0,88*	0,26	0,41	-0,5	0,13
MOT						1	0,26	-0,69*	0,98*	-0,21	0,22	0,09	0,28	-0,09
VIG							1	0,07	0,31	0,47	-0,3	-0,34	0,39	-0,04
CONC								1	-0,53*	0,12	-0,21	-0,03	-0,27	-0,01
MOTD									1	-0,14	0	0,5*	-0,52*	-0,67*
VIGD										1	-0,08	0,2	-0,26	0,1
SPV											1	0,68*	-0,4	0,49
MEM												1	-0,82*	0,36
ACRO													1	0,01
PBM														1

Números seguidos por (\*) apresentam correlação significativa ( $p < 0,05$ ). VOL = volume espermático; ASPEC = aspecto do sêmen; COL = coloração seminal; TURB = turbilhonamento do sêmen; MOT = motilidade do sêmen fresco; VIG = vigor do sêmen fresco; CONC = concentração espermática; MOTD = motilidade do sêmen descongelado; VIGD = vigor do sêmen descongelado; SPV = teste supravital; HOST = teste hiposmótico; MPL = integridade da membrana plasmática dos espermatozoides do sêmen descongelado; MAC = integridade da membrana acrossomal dos espermatozoides do sêmen descongelado; e PBM = alta produção da bainha mitocondrial dos espermatozoides do sêmen descongelado.

No  $T_{\text{Etilenoglicol+complexo/Préincubado}}$ , os valores obtidos no teste de integridade de membrana por meio das sondas fluorescentes (IP + Dietilcarboxifluoresceína) apresentaram correlação negativa ( $r = -0,82$ ) com os resultados do teste de integridade de membrana acrossomal por meio da sonda FITC-PSA, correlação positiva ( $r = 0,68$ ) com os do teste supravital ( $r = 0,5$ ) e com a motilidade espermática do sêmen descongelado; este último apresentou, ainda, correlação positiva ( $r = 0,5$ ) com o volume seminal ( $r = 0,97$ ) com a motilidade espermática do sêmen fresco e correlação negativa ( $r = -0,52$ ) com o aspecto seminal ( $r = -0,67$ ), com a coloração seminal ( $r = -0,53$ ), integridade de membrana acrossomal por meio da sonda FITC-PSA ( $r = -0,67$ ) e com os resultados do teste de atividade de bainha mitocondrial por meio da sonda JC - 1.

Observou-se que mesmo sendo a motilidade espermática o melhor parâmetro em prever a viabilidade espermática de sêmen descongelado para uso em programa de inseminação artificial, parece não ser por si só eficaz em prever a qualidade da membrana no pós-descongelamento. Sendo assim, é necessário o uso de testes complementares para que se possa aumentar a acurácia em prever a fertilidade do sêmen e suas relações com a taxa de não retorno ao estro.

Pode-se observar ainda que o teste de integridade da membrana plasmática por meio das sondas fluorescentes (IP + Dietilcarboxifluoresceína) apresentou, com exceção do  $T_{\text{Glicerol+Complexo/pré-incubado}}$ , correlação com os demais testes que avaliaram indiretamente, por meio da integridade de acrossoma e atividade da bainha mitocondrial, a viabilidade espermática, mostrando que este teste é uma ferramenta singular na avaliação da qualidade seminal e viabilidade espermática do sêmen descongelado.

#### **4. Conclusão**

Pelos resultados obtidos conclui-se que a adição de 1,0 mg complexo ciclodextrina-colesterol no sêmen com a concentração espermática de  $200 * 10^6/\text{mL}$  não altera a integridade e/ou funcionalidade da membrana plasmática dos espermatozoides caprinos.

O diluidor à base de Tris-gema de ovo-etileno glicol não altera a funcionalidade da membrana plasmática ou o vigor espermático, embora influencie

positivamente a integridade da membrana acrossoma e afete negativamente a motilidade espermática do sêmen descongelado, comparado ao diluente à base de Tris-Glicerol.

A pré-incubação do sêmen com o complexo ciclodextrina-colesterol não altera as características do vigor espermático, além da integridade e funcionalidade da membrana plasmática dos espermatozoides, mas afeta positivamente a motilidade espermática do sêmen descongelado.

### Referências bibliográficas

ALVES, S. G.G. **Avaliação do sêmen de caprinos da raça boer Boer por meio do teste hiposmótico**. 2006. 57 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal nos Trópicos) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, 2006.

AMANN, R. P. Cryopreservation of sperm. In: **Encyclopaedia of reproduction**, vol. 1. Burlington, MA: Academic Press, Burlington, MA, USA, 1999. p. 773-783.

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

BETINI, C. M.; MORAES, G. V.; RIGOLON, L. P. Efeito da congelação vertical e horizontal na qualidade do sêmen caprino. **Acta Scientiarum**, v. 20, n. 3, p. 361-365, 1998.

BITTENCOURT, R. F. **Criopreservação de sêmen caprino com a utilização do glicerol e etilenoglicol associados ou não ao EDTA**. 2003. 66 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, 2003.

BITTENCOURT, R. F.; RIBEIRO FILHO, A. L.; ALVES, S. G. G. BISCARDE, C. E.; VASCONCELOS, M. F.; OBA, E. Criopreservação do sêmen caprino: efeito da curva de resfriamento e do tempo de equilíbrio. **Ciência Animal**, v. 17, n. 2, p. 75-82, 2007.

BITTENCOURT, R. F.; RIBEIRO, A. L.; SANTOS, A. D. F. *et al.* Utilização de glicerol e etilenoglicol como crioprotetores na congelação do sêmen caprino. **Ciência Animal Brasileira**, v. 5, n. 1, p. 27-32, jan./mar. 2004.

CASTILHO, E. F. **Uso da própolis e do ácido ascórbico na criopreservação do sêmen caprino**. 2008. 63 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2008.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL – CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2. ed., Belo Horizonte, MG, 1998. 49 p. (Manual).

DIAS, J. C. O. **Adição de ringer lactato, citrato de sódio 2,92 % e solução tris em sêmen caprino descongelado**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2010. 40 p.

FICKEL, J.; WAGENER, A.; LUDWIG, A. Semen cryopreservation and the conservation of endangered species. **European Journal of Wildlife Research**, v. 53, p. 81-89, 2007.

FONSECA, V. O.; VALE FILHO, V. R.; MIES FILHO, A.; ABREU, J. J. **Procedimentos para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. Belo Horizonte: Editora Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1992. 79 p.

GADELLA, B. M.; RATHI, R.; BROUWERS, J. F. H. M.; STOUT, T. A. E.; COLENBRANDER, B. Capacitation and acrosome reaction in equine sperm. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 68, p. 249-65, 2001.

GONZALEZ, R. A. F. **Efeito da criopreservação usando diferentes técnicas de congelamento e crioprotetores sobre parâmetros espermáticos e a integridade de membranas do espermatozoide bovino**. 2004. 92 f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP, 2004.

GUTHRIE, H. D.; LIU, J.; CRITSER, J. K. Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 67, n. 6, p. 1806-1811, 2002.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E., S. E. **Reprodução animal**. 7. ed. Barueri: Manole, 2004. p. 13-29.

KARATZAS, G.; KARAGIANNIDIS, A.; VARSAKELI, S. *et al.* Fertility of fresh and frozen-thawed goat semen during the nonbreeding season. **Theriogenology**, v. 48, n. 6, p. 1049-1059, 1997.

KHORASANI, A. M.; CHEUNG, A. P.; LEE, C. Y. G. Cholesterol inhibitory effects on 297 human sperm-induced acrosome reaction. **Journal of Andrology**, v. 21, p. 586-594, 2000.

KLEIN, U.; GIMPL, G.; FAHRENHOLZ, F. Alteration of the myometrial plasma membrane cholesterol content with  $\beta$ -ciclodextrina modulates the binding affinity of the oxytocin receptor. **Biochemistry**, v. 34, p. 13784-13793, 1995.

LANGFORD, G. A.; MARCUS, G. J.; HACKETT, A. J.; AINSWORTH, L.; WOLYNETZ, M. S.; PETERS, H. F. A comparison of fresh and frozen semen in the insemination of confined sheep. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 59, p. 685-691, 1979.

LEBOEUF, B.; RESTALL, B.; SALAMON, S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 113-141, 2000.

- LEBOEUF, B.; RESTALL, B.; SALAMON, S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 113-141, 2000.
- MAIA, M. S.; MOURA, M. T. M. M.; SOUSA, I. K. F.; LEAL, W. S.; MEDEIROS, I. M. Viabilidade do sêmen caprino congelado em diluente contendo OEP. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 19., 2011, Recife, PE, **Anais...** Belo Horizonte: CBRA, 2011. (CD-ROM). ISSN:1984-8471.
- MARTINS, L. F.; PEREIRA, M. C. B.; GUIMARÃES, J. D.; COSTA, E. P.; SILVEIRA, T. S.; TORRES, C. A. A.; RODRIGUES, M. T.; BRAZ, V. B. Avaliação espermática e da concentração de proteínas solúveis no plasma seminal de bodes da raça Alpina em regime de monta controlada. **R. Bras. Zootec.**, v. 35, n. 4, p. 1653-1659, 2006 (supl.).
- MIES FILHO, A. **Inseminação artificial**. Porto Alegre: Livraria Sulina, 1987. v. 2.
- MOCÉ, E.; GRAHAN, J. K. Cholesterol-loaded cyclodextrins added to fresh bull ejaculates improve sperm cryosurvival. **Journal Animal Science**, v. 84, p. 826-833, 2006.
- MOCÉ, E.; PURDY, P. H.; GRAHAM, J. K. Treating ram sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins improves cryosurvival. **Animal Reproduction Science**, v. 118, p. 236-247, 2010.
- OLIVEIRA, I. R. S.; ALVES, H. M.; CASTELO, T. S. *et al.* Correlações entre o teste hiposmótico e a avaliação clássica do sêmen de caprinos. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 14, n. 2, p. 216-221, abr./jun. 2013.
- OLIVEIRA, R. V.; NUNES, J. F.; SALGUEIRO, C. C. M. *et al.* Avaliação morfológica de espermatozoides caprinos diluídos e congelados em meio à base de água de coco em pó (acp-101) ou tris, corados por eosina-nigrosina e azul de bromofenol. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 3, p. 862-869, jul./set. 2009.
- ORTEGA, A. M.; IZQUIERDO, A. C.; GÓMEZ, J. J. H.; OLIVARES-CORICHI, I. M.; TORRES, V. M. M.; MÉNDEZ, J. J. V. Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen. Una revisión. **Interciencia**, v. 28, p. 699-704, 2003.
- PURDY, P. H.; GRAHAM, J. K. Effect of cholesterol loaded ciclodextrina on the cryosurvival of bull sperm. **Cryobiology**, v. 48, p. 36-45, 2004.
- QUINN, P.J. Principles of membrane stability and phase behavior under extreme conditions. **J. Bioenerg. Biomemb.**, v. 21, p. 3-19, 1989.
- ROVAY, H. **Efeitos de diferentes curvas de resfriamento, tempos de equilíbrio e crioprotetores permeáveis no congelamento de espermatozoides de caprinos**. 2006. 73 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2006.

SANTOS, M. C. R. **Métodos alternativos para análises da capacidade de ligação dos espermatozoides caprinos**. 2010. 37 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2010.

SILVA, E. C. B.; CAJUEIRO, J. F. P.; SILVA, S. V.; GUERRA, M. M. P. Crioprotetores etileno glicol ou acetamida na viabilidade in vitro de espermatozoides congelados de ovinos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 6, p. 1083-1088, jun. 2012.

SIMÕES, J.; MASCARENHAS, R.; BARIL, G. **Inseminação artificial em caprinos**. – *E-book* para técnicos de expressão portuguesa. Portugal, 2008. Disponível em: <[http://www.veterinaria.com.pt/media//DIR\\_174423/Simoes215.pdf](http://www.veterinaria.com.pt/media//DIR_174423/Simoes215.pdf)>. Acesso em: 30 set. 2013.

SIQUEIRA, A. P. **Inseminação artificial em caprinos com sêmen resfriado**. 2006. 106 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, 2006.

STORNELLI, M. C.; TITTARELLI, C. M.; SAVIGNONE, C. A.; STORNELLI, M. A. Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. **Analecta Veterinaria**, v. 25, n. 2, p. 28-35, 2005.

WATSON, P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction of Fertility Development**, v. 7, p. 871-891, 1995.

ZAHN, F. S.; PAPA, F. O.; DELL'AQUA JR., J. A. Cholesterol incorporation on equine sperm membrane: effects on post-thaw sperm parameters and fertility. **Theriogenology**, v. 58, p. 237-240, 2002.

### **3. CONCLUSÃO GERAL**

A adição do complexo ciclodextrina-colesterol afeta positivamente a integridade de acrossoma e a motilidade espermática, sendo uma alternativa viável quando se busca o aumento no desempenho dessas características do sêmen descongelado.