

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

ADIÇÃO DE LIPÍDEOS AO DILUENTE DE CONGELAÇÃO DO SÊMEN DE
GARANHÕES

ADDITION OF LIPIDS TO THE FREEZING EXTENDER OF STALLION SEMEN

Breno Fernandes Barreto Sampaio

CAMPO GRANDE
MATO GROSSO DO SUL - BRASIL
FEVEREIRO DE 2012

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**ADIÇÃO DE LIPÍDEOS AO DILUENTE DE CONGELAÇÃO DO SÊMEN DE
GARANHÕES**

ADDITION OF LIPIDS TO THE FREEZING EXTENDER OF STALLION SEMEN

Breno Fernandes Barreto Sampaio

Orientadora: Profa. Dra. Carmem Estefânia Serra Neto Zúccari

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal. Área concentração: Produção Animal

**CAMPO GRANDE
MATO GROSSO DO SUL - BRASIL
FEVEREIRO DE 2012**

BRENO FERNANDES BARRETO SAMPAIO

**ADIÇÃO DE LIPÍDEOS AO DILUENTE DE CONGELAÇÃO DO SÊMEN DE
GARANHÕES**

ADDITION OF LIPIDS TO THE FREEZING EXTENDER OF STALLION SEMEN

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Mato Grosso do Sul, como
requisito à obtenção do título de Mestre
em Ciência Animal. Área concentração:
Produção Animal

Profa. Dra. Carmem Estefânia Serra Neto Zúccari
Orientadora

Dr. Ériklis Nogueira

Profa. Dra. Eliane Vianna da Costa e Silva

“Há pessoas que transformam o sol numa simples mancha amarela, mas há também aquelas
que fazem de uma simples mancha amarela o próprio sol.”
(Pablo Picasso)

À minha família, pela confiança e apoio incondicional,

À minha orientadora e amiga pelo estímulo e ensinamentos irrestritos,

E à minha querida esposa pelo companheirismo e amor doado em todos os momentos,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por proporcionar a vida e a oportunidade da realização de mais esse sonho;

À minha orientadora, Carmem Estefânia Serra Neto Zúccari, pelos ensinamentos, conselhos e correções que vêm desde a época de graduação e também pela amizade, sem os quais seria impossível a realização deste trabalho;

À CAPES, pela bolsa de estudos que possibilitou minha dedicação total e exclusiva ao programa de pós-graduação;

À professora e amiga Lili, pelo auxílio na análise estatística;

À Marilete, pelas ajudas prestadas principalmente na parte burocrática da pós-graduação;

Aos colegas Daniela Brandão Nunes, Gustavo, Cintia e Rodrigo, pelo auxílio prestado na parte prática deste experimento;

Aos amigos Flávio, William e Cássio, pela amizade desde o tempo de faculdade;

Ao amigo Robert Schaeffer e toda sua família pelos ensinamentos e pelos momentos agradáveis e inesquecíveis que me foram proporcionados;

Aos colegas de trabalho Vivi e Edjalma pela amizade, convívio e toda a ajuda que me deram;

À minha mãe Vilma e minha irmã Dila, pelo o auxílio, torcida e carinho dispensado durante toda minha vida;

À minha esposa Zenita por estar presente em minha vida, me ajudando em todos os momentos.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fórmula estrutural do colesterol (a) e do β -sitosterol (b)..... 17
- Figura 2.** 1 - Ácido Palmítico (16:0) A – Fórmula estrutural, B – Modelo esfera-bastão, C – Modelo de preenchimento estrutural. 2 - Ácido Oléico (18:1) D – Modelo de preenchimento estrutural, E – Fórmula estrutural..... 18
- Figura 3.** Síntese dos ácidos graxos essenciais. Demonstra a ação das enzimas delta 6 e delta 5 desaturase, enlongase e peroxisomal β -oxidação no processo de incorporação de carbono e duplas ligações nos ácidos graxos poli-insaturados originados do ácido α -linolênico n-3 e do ácido linoléico n-6..... 20

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores médios ($\pm$ desvio padrão) de motilidade e vigor do sêmen equino (n=10) após incubação com lipídios a 32°C / 15 minutos e pós-descongelação.....	33
Tabela 2. Valores médios ($\pm$ desvio padrão) de integridade das membranas plasmática e acrossomais do sêmen equino fresco (n = 10) após incubação com lipídios a 32°C / 15 minutos e pós-descongelação (pela técnica de dupla coloração <i>trypan blue</i> /Giemsa.....	36

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1. Membrana Plasmática.....	11
1.2. Capacitação Espermática e Reação do Acrossomo.....	13
1.3. Colesterol e β -Sitosterol.....	15
1.4. Ácidos Graxos.....	17
1.5. Ácidos Graxos Insaturados.....	18
2. REFERÊNCIAS.....	21

CAPÍTULO II

3. Resumo.....	27
4. Abstract.....	28
5. Introdução.....	29
6. Material e Métodos.....	31
7. Resultados e Discussão.....	34
8. Conclusão.....	41
9. Referências.....	41

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui cerca de oito milhões de equídeos, sendo o quarto maior rebanho do mundo. O Estado de Mato Grosso do Sul ocupa o sétimo lugar em número de cabeças no território nacional e esses animais são de grande importância para a região pela intensa atividade pecuária do estado. O Complexo Agronegócio Cavalo movimenta cerca de R\$ 7,5 bilhões por ano e gera aproximadamente 3,5 milhões de empregos diretos e indiretos. Apesar disso o rebanho nacional equino encontra-se aquém das necessidades do setor pecuário, pois a proporção ideal é de um cavalo para 85 bovinos, contudo, atualmente, se observa uma relação de um cavalo para 160 bovinos (Lima et al., 2006).

O uso de biotecnologias da reprodução já faz parte da rotina de diversos haras que buscam melhorar a genética de seus animais. Dentre as mais utilizadas destacam-se a inseminação artificial (IA), a transferência de embriões e a criopreservação de sêmen, que permite transportar e armazenar o material genético por tempo indeterminado.

A criopreservação da célula espermática se tornou possível depois da descoberta acidental dos efeitos protetores do glicerol por Polge e colaboradores em 1949 (Curry, 2000). Após este feito os autores conseguiram produzir frangos a partir de ovos fecundados com sêmen congelado e, dois anos após, ocorreram os primeiros nascimentos de mamíferos a partir do sêmen criopreservado e estocado por um ano.

A exposição a baixas temperaturas pode alterar a composição lipídica do espermatozóide bem como a permeabilidade da membrana plasmática (Holt, 2000). Estas alterações, juntamente com as lesões estruturais causadas pelo processo de

congelamento e descongelamento auxiliam na diminuição dos níveis de fertilidade obtidos com sêmen congelado (Watson, 2000).

As avaliações seminais buscam determinar a qualidade da amostra e sua correlação com a fertilidade. Desta forma, amostras que apresentem baixa motilidade e menor percentual de integridade de membranas, provavelmente não terão altas taxas de fertilidade. O contrário, porém, pode não ser verdadeiro. O fato de o sêmen apresentar alta motilidade e membranas plasmática e acrossomais intactas não são garantia de uma alta taxa de fertilidade, pois além da motilidade o espermatozoide deve estar apto a passar pelos processos de capacitação, reação do acrossomo e fecundação (Januskauskas et al., 2000).

1.1. Membrana Plasmática

A membrana plasmática (MP) é a estrutura que define os limites celulares e mantém as diferenças existentes entre o lado citosólico e o exterior, além de ser responsável pela interação com outras células e com substâncias encontradas no meio extracelular. Sua estrutura varia de acordo com o tipo de célula, porém, todas possuem em sua composição uma dupla camada que contém moléculas lipídicas e protéicas unidas por ligações não covalentes (Alberts et al., 2006). Possui uma espessura média de 50 Å com característica semipermeável (McIntosh, 1999).

As principais classes lipídicas que fazem parte da membrana são os fosfolipídios (FFL), glicolipídeos e o colesterol. Essas moléculas arranjam-se formando uma dupla camada que não possui geometria fixa, demonstrando ser uma estrutura dotada de fluidez (Pratt e Cornely, 2006). Os componentes mais abundantes na bicamada lipídica são os FFL que possuem um grupamento polar (hidrofílico) composto

por um aminoácido, um fosfato e um glicerol ligado a dois ácidos graxos (AG), formando uma cauda dupla de hidrocarbonetos de característica hidrofóbica. Por esse motivo os lipídeos agregam-se direcionando as caudas para o interior da bicamada deixando a região polar voltada para os lados extracelular e citosólico (Alberts et al., 2006).

Os FFL mais encontrados na MP são a fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilcolina e esfingomielina. As moléculas maiores, em sua maioria, localizam-se no folheto externo da bicamada lipídica que fica em contato com o meio extracelular, dando o aspecto convexo à membrana plasmática (Pratt e Cornely, 2006).

Quando a cauda dos FFL é formada por dois ácidos graxos saturados, tende a proporcionar maior rigidez e organização à MP. Uma maior flexibilidade pode ser obtida quando a cauda do FFL possui um ácido graxo monoinsaturado (*monounsaturated fatty acid* - MUFA) ou um ácido graxo poli-insaturado (*polyunsaturated fatty acid* – PUFA; Stillwell e Wassall, 2003).

O colesterol pode ser encontrado em altas concentrações na membrana plasmática com valores superiores a 25 mol%, porém, nas membranas de organelas citoplasmáticas como as mitocôndrias essa concentração pode ser inferior a 5 mol% (McIntosh, 1999). Possui uma função estabilizadora da membrana (Mocé et al., 2010), evitando a formação da fase hexagonal do tipo II na membrana por FFL que apresentam essa tendência, como a fosfatidiletanolamina, e possui um efeito condensador na bicamada diminuindo a área ocupada por moléculas de lipídios no plano da membrana. Além disso, reduz a temperatura da fase de transição entre o estado líquido-cristalino e a fase gel da membrana, desta forma, moléculas que apresentam pontos de fusão mais

altos como a esfingomielina e alguns glicolipídios se apresentam em fase líquido-cristalina na temperatura fisiológica com a presença do colesterol (McIntosh, 1999).

Durante a vida do espermatozóide ocorrem mudanças tanto na forma quanto na composição da membrana plasmática. Na espermatogênese há a perda de várias organelas e de grande parte do citoplasma, bem como o remodelamento da cromatina nos estágios finais da espermiogênese, o que dá o formato característico da cabeça do espermatozóide. Durante a passagem pelo epidídimo ocorre a maturação da célula espermática que além de modificações estruturais, como a translocação e perda da gota citoplasmática, modifica também a composição lipídica e protéica das membranas (Varner e Johnson, 2011).

1.2. Capacitação Espermática e Reação do Acrossomo

O espermatozóide, logo após a ejaculação, não é capaz de realizar a fecundação e para que este fenômeno ocorra é necessário que haja uma maturação extra-epididimal chamada de capacitação espermática (Kątska-Książkiewicz, 2007), que termina com a reação do acrossomo, sendo estes processos os pré-requisitos necessários para a fecundação (Varner e Johnson, 2011).

De acordo com a revisão de Kątska-Książkiewicz (2007) a capacitação espermática deve ser regulada para manter o potencial de fecundação do espermatozóide. Para isso, proteínas que atuam como “mensageiros” se ligam a receptores específicos na membrana plasmática, modulando a capacitação por meio do desencadeamento de reações intracelulares. Algumas moléculas como a angiotensina II, calcitonina e adenosina atuam como mensageiros primários, ligando-se a receptores A_{2A} de membrana, que estimulam a capacitação. Por outro lado, os receptores A_1 fazem a

inibição da capacitação através da ação das mesmas moléculas que se ligam aos receptores A_{2A} , porém só estão disponíveis quando o espermatozóide já iniciou a capacitação.

O espermatozóide capacitado apresenta um padrão de movimentação característico denominado motilidade hiperativada. Alguns fluorocromos tais como a merocianina 540, que através da citometria de fluxo conseguem identificar a desestabilização lipídica da membrana, ou a sonda 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno que identifica a distribuição e a perda do colesterol da membrana espermática podem auxiliar na identificação do espermatozóide capacitado (Varner e Johnson, 2011). Devido à motilidade hiperativada o espermatozóide capacitado apresenta uma alta taxa metabólica (Yanagimachi, 1994).

Dentre as modificações observadas na membrana durante a capacitação, Zeginiadou et al. (2000) citam em sua revisão que há aumento na fluidez da membrana espermática devido à reorganização dos antígenos de superfície e modificação na relação colesterol:fosfolipídios em função do efluxo do colesterol da membrana, que se liga, por exemplo, à albumina presente no trato genital feminino. A saída do colesterol provoca uma desestabilização da membrana, tornando o espermatozóide mais permeável aos íons HCO_3^- e Ca^{++} que por sua vez também atuam no processo de capacitação (Varner e Johnson, 2011).

Durante o processo de capacitação há inversão dos FFL entre os folhetos da membrana, expondo para o meio extracelular fosfolipídios que têm predileção pela camada citosólica como, por exemplo, a fosfatidiletanolamina. Esse processo facilita a remoção do colesterol (Flesch et al., 2001) e é ativado por uma enzima desorganizadora de fosfolipídios (*phospholipid scramblase*). A translocação fosfolipídica, apesar de ser

reversível em curto prazo (Harrison, 1996), pode também ser induzida pela congelação (Januskauskas et al., 2003).

O acrossomo é uma vesícula localizada na extremidade anterior da cabeça do espermatozóide, possui duas membranas, acrossomal interna e externa, esta última recoberta pela membrana plasmática. A reação do acrossomo é caracterizada por um processo de exocitose irreversível que ocorre através dos orifícios que se formam entre os diversos pontos de fusão entre a membrana acrossomal externa e a membrana plasmática, o que permite a dispersão das enzimas necessárias à penetração da zona pelúcida para que ocorra a fecundação (Varner e Johnson, 2011).

1.3. Colesterol e β -Sitosterol

A distribuição do colesterol na membrana espermática não é uniforme, sendo que na região acrossomal as concentrações são superiores à pós-acrossomal. Além disso, o colesterol apresenta maior afinidade pelos fosfolipídios que contêm AG saturados e menor afinidade por aqueles insaturados (Wassal e Stillwell, 2008). Essa predileção forma domínios na membrana plasmática, responsáveis por modular alguns eventos celulares, denominados de *rafts* que podem formar plataformas de interação entre proteínas e lipídios (Pike, 2006).

Apesar do mecanismo de ação ainda não estar completamente esclarecido, a adição de colesterol ao sêmen parece minimizar os efeitos deletérios da congelação, aumentando a proporção colesterol:fosfolipídio bem como a tolerância osmótica, conferindo maior permeabilidade aos crioprotetores e aumento da longevidade do espermatozóide (Mocé et al., 2010). Ao fazer a adição de 1,5 mg de colesterol através do complexo de inclusão ciclodextrina a 120×10^6 espermatozóides, Moore et al. (2005)

observaram o aumento de 2,5 vezes na concentração de colesterol na membrana e a proporção colesterol:fosfolipídios passou de 0,36 para aproximadamente 0,82-0,89, aproximando-se da proporção encontrada em espécies mais resistentes ao choque térmico, como humanos e coelhos. Nesse experimento os autores concluíram que a adição de colesterol ao sêmen de garanhão aumentou a resistência dos espermatozóides aos efeitos deletérios da criopreservação. Os resultados de Oliveira et al. (2010) também foram satisfatórios quanto à proteção da integridade física da membrana plasmática após a descongelação, porém os autores não observaram melhora na motilidade com a adição de 50 mg/ml do complexo colesterol-metil- β -ciclodextrina.

Mesmo aumentando a qualidade do sêmen após a descongelação, a adição de colesterol parece diminuir os índices de fertilidade. Spizziri et al. (2010) não observaram diferença entre os índices de fertilidade ao comparar o controle com a adição de 1,5 mg de colesterol a 120×10^6 espermatozóides. Porém, o grupo controle apresentou valores inferiores de motilidade e integridade de membrana, demonstrando que a melhora dessas variáveis *in vitro* podem não se refletir na fertilidade. Resultados similares foram obtidos por Zahn et al. (2002) que obtiveram valores superiores para motilidade e integridade de membranas ao adicionar 1,66 mg/ml do complexo colesterol-metil- β -ciclodextrina ao sêmen equino, porém com taxas de prenhez inferiores no grupo suplementado em relação ao grupo controle.

O β -sitosterol é um análogo vegetal do colesterol e tem como uma de suas fontes a soja. A diferença entre as moléculas de colesterol e a de β -sitosterol se encontra no C24 da cadeia lateral, onde o esterol vegetal apresenta um radical etil (Figura 1). Semelhante ao colesterol, o β -sitosterol interage positivamente com fosfolipídios que

apresentam ácidos graxos saturados em sua composição e alteram a bicamada de maneira similar (Gallová et al., 2011).

Em humanos a utilização do β -sitosterol mostrou resultados similares aos obtidos com a adição do complexo colesterol-metil- β -ciclodextrina, diminuindo as taxas de reação do acrossomo espontânea e induzida pela progesterona. A incorporação do β -sitosterol à membrana espermática ocorreu sem a necessidade do complexo de inclusão (Khorasani et al., 2000).

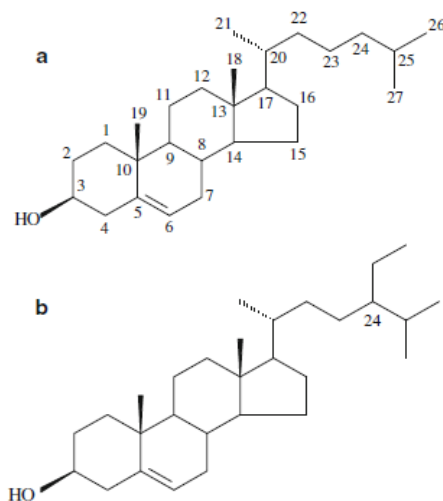


Figura 1. Fórmula estrutural do colesterol (a) e do β -sitosterol (b). Fonte: Gallová et al. (2011)

1.4. Ácidos Graxos

Os AG estão incluídos na família dos lipídeos que são moléculas insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos como acetona ou clorofórmio. Fazem parte desta categoria as ceras, esteróides, esfingolipídeos, triacilgliceróis e os FFL (Campbell e Farrell, 2007).

Os AG são moléculas anfipáticas, ou seja, possuem regiões quimicamente distintas, sendo uma hidrofílica e outra hidrofóbica (Alberts et al., 2006; Pratt e Cornely, 2006; Campbell e Farrell, 2007). Em uma das extremidades têm um grupo carboxila com característica polar, portanto, com afinidade pela água e ligado a ele está a cauda hidrocarbonada hidrofóbica, por conseguinte apolar e com afinidade por solventes orgânicos (Campbell e Farrell, 2007; Figura 2).

Os AG são identificados pelo número de carbonos e duplas ligações presentes. Desta forma, um AG que possua 18 átomos de carbono em sua molécula e tenha somente uma dupla ligação será identificado como 18:1, o ácido oléico. No caso dos PUFAs a posição da primeira dupla ligação caracteriza o AG, iniciando a contagem a partir do grupo metil, situado na extremidade oposta do radical carboxila, sendo identificados pelo sistema ômega (n-3, n-6 e n-9; Campbell e Farrell, 2007).

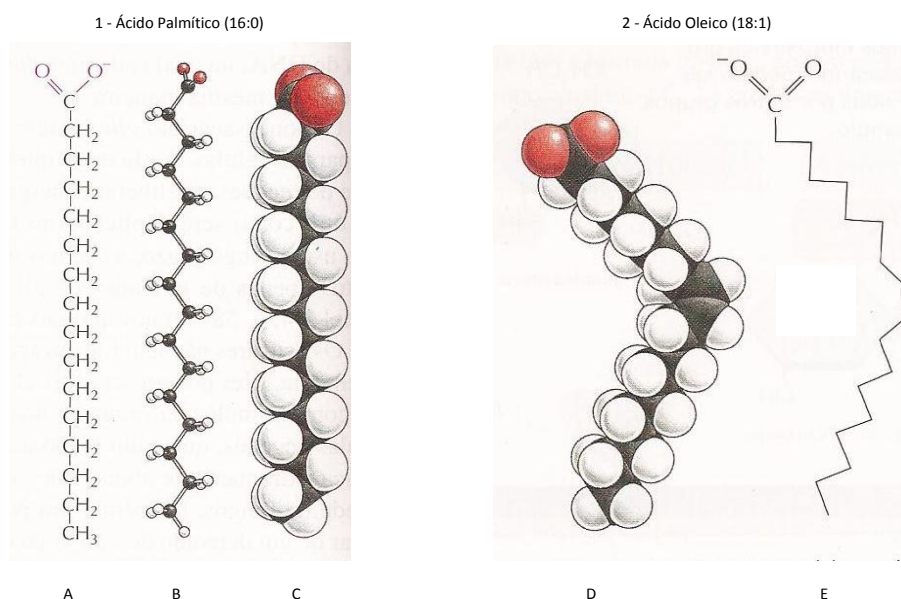


Figura 2. 1 - Ácido Palmítico (16:0) A – Fórmula estrutural, B – Modelo esfera-bastão, C – Modelo de preenchimento estrutural. 2 - Ácido Oléico (18:1) D – Modelo de preenchimento estrutural, E – Fórmula estrutural. Fonte: Alberts et al. (2006)

1.5. Ácidos Graxos Insaturados (AGI)

Os AGI apresentam dupla ligação em sua molécula. Se possuírem somente uma dupla ligação carbônica são denominados ácido graxos monoinsaturados e quando possuem duas ou mais duplas ligações são chamados de ácidos graxos poli-insaturados (Pratt e Cornely, 2006; Campbell e Farrell, 2007).

Os PUFAs são considerados AG essenciais porque não são sintetizados pelos mamíferos, desta forma, sua obtenção é necessariamente feita através da dieta (Nakamura e Nara, 2003; Vaz et al., 2006; Simopoulos, 2011).

Os PUFAs n-3 e n-6 diferem metabólica e fisiologicamente (Simopoulos, 2010). Os mamíferos podem realizar a modificação estrutural dos PUFAs através de algumas enzimas como a delta-6 desaturase, delta-5 desaturase, enlogase e peroxisomal β -oxidação (Nakamura e Nara, 2003; Vaz et al., 2006). Essas enzimas podem transformar AG de cadeias mais simples como o ácido linoléico (18:2 n-6) e o ácido α -linolênico (*α -linolenic acid* – ALA; 18:3 n-3; Figura 3) em PUFAs de cadeia muito longa como os ácidos docosapentaenóico (*docosapentaenoic acid* - DPA; 22:5 n-6) e docosahexaenóico (*docosahexaenoic acid* – DHA; 22:6 n-3). Apesar desse mecanismo de conversão do ALA em ácido eicosapentaenóico (*eicosapentaenoic acid* – EPA) e DHA, em mamíferos é pouco eficiente. Isso se dá devido à ação moderada de algumas enzimas que participam do processo, assim como à quantidade requerida pelo organismo, que aparentemente é inatingível por essa via (Sierra et al., 2008). Os AG podem ser eficazmente convertidos no fígado e nos testículos, e quando disponíveis na circulação, são incorporados pela membrana plasmática dos mamíferos (Retterstøl et al., 2000).

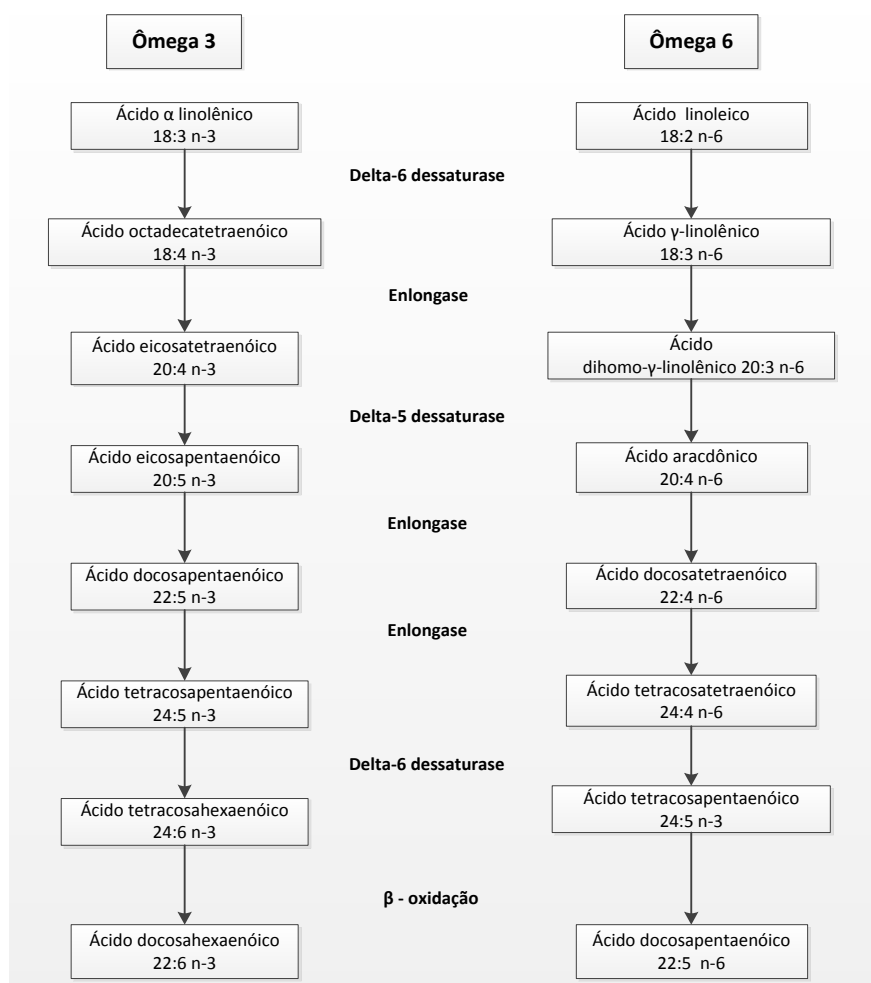


Figura 3. Síntese dos ácidos graxos essenciais. Demonstra a ação das enzimas delta 6 e delta 5 desaturase, enlongase e peroxisomal β -oxidação no processo de incorporação de carbono e duplas ligações nos ácidos graxos poli-insaturados originados do ácido α -linolênico n-3 e do ácido linoléico n-6. Adaptado de: Nakamura e Nara (2003), Vaz et al. (2006) e Simopoulos (2011)

Uma importância ímpar vem sendo dada à proporção endógena entre n-6:n-3. O nível primordial em seres humanos era de 1:1, porém, na atualidade são encontrados valores de 16:1 (Simopoulos, 2011) e até 30:1 (Blasbalg et al., 2011). A proporção n-6:n-3 também pode ter efeitos sobre a fertilidade do macho. Existe diferença na composição dos AG de espermatozoides de homens que apresentam infertilidade

quando comparados àqueles com fertilidade normal, onde homens astenozoospermicos e oligoastenoteratozoospermicos tendem a apresentar níveis reduzidos de n-3 (Safarinejad et al., 2010).

Alguns autores testaram a adição de ácidos graxos ao sêmen de ovinos (Marti et al., 2008; Pérez-Pé et al., 2001) e bovinos (Takahashi et al., 2011). A melhora na resistência ao choque térmico pode ser observada com a adição do composto ácido oléico-linoléico (C18:1 n-9 e C18:2 n-6, respectivamente - AOL), conferindo maior motilidade e viabilidade após a descongelação do sêmen de carneiros (Marti et al., 2008; Pérez-Pé et al., 2001). A adição de ácido linoléico ao diluidor de congelação de bovinos proporcionou uma melhora das variáveis seminais após a incubação por 30 horas a 4°C (Takahashi et al., 2011).

Com base no exposto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos da adição do ácido oléico-linoléico (AOL), β -sitosterol (β -sit) e da associação AOL + β -sit, ao diluidor de congelação, sobre as variáveis espermáticas motilidade/vigor e integridade das membranas do espermatozóide de garanhões submetido à criopreservação.

2. REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Estrutura da membrana. In:____. *Biologia Molecular da Célula*, 4.ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2006, cap.10, p.584-613.
- BLASBALG, T.I.; HIBBELN, J.R.; RAMSDEN, C.E.; MAJCHRZAK, S.F.; RAWLINGS, R.R. Changes in consumption of omega-3 and omega-6 fatty acids in the United States during the 20th century. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v.93, p.950-962, 2011.
- CAMPBELL, M.K.; FARRELL, S.O. Lipídeos e proteínas estão associados a membranas biológicas. In:____. *Bioquímica*, 5.ed. São Paulo: Thomsom, 2007, cap.8, p.197-225.
- CURRY, M.R. Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Reviews of Reproduction*, v.5, p.46-52, 2000.
- FLESC, F.M.; BROUWERS, J.F.H.M.; NIEVELSTEIN, P.F.E.M.; VERKLEIJ, A.V.; GOLDE, L.M.G.; COLENBRANDER, B.; GADELLA, B.M. Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma membrane. *Journal of Cell Science*, v.114, p.3543-3555, 2001.
- GALLOVÁ, J.; UHRÍKOVÁ, D.; KUČERKA, N.; SVORKOVÁ, M.; FUNARI, S.S.; MURUGOVA, T.N.; ALMÁSY, L.; MAZÚR, M.; BALGAVÝ, P. Influence of cholesterol and β -sitosterol on the structure of EYPC bilayers. *Journal of Membranes Biology*, v.243, p.1-13, 2011.

- 283 HARRISON, R.A.P., Capacitation mechanisms and the role of capacitation as seen in
284 eutherian mammals. *Reproduction Fertility and Development*, v.8, p.581-594, 1996.
- 285 HOLT, W.V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and
286 individual differences. *Theriogenology*, v.53, p.47-58, 2000.
- 287 JANUSKAUSKAS, A.; JOHANNISSON, A.; SODERQUIST, L.; RODRIGUEZ-
288 MARTINEZ, H. Assessment of sperm characteristics post-thaw and response to
289 calcium ionophore in relation to fertility in Swedish dairy AI bulls. *Theriogenology*,
290 v.53, p.859-875, 2000.
- 291 JANUSKAUSKAS, A.; JOHANNISSON, A.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Subtle
292 membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability,
293 chromatin structure and field fertility. *Theriogenology*, v.60, p.743-758, 2003.
- 294 KĄTSKA-KSIAŻKIEWICZ, L. Recent studies on molecular mechanisms involved in
295 mammalian sperm capacitation: A review. *Journal of Animal and Feed Sciences*, v.16,
296 p.311-320, 2007.
- 297 KHORASANI, A.M.; CHEUNG, A.P.; LEE, C.Y.G. Cholesterol inhibitory effects on
298 human sperm-induced acrosome reaction. *Journal of Andrology*, v.21, p.586-594, 2000.
- 299 LIMA, R.A.S., SHIROTA, R., BARROS, G.S.C. Estudo do complexo do agronegócio
300 cavalo. Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada, da Escola Superior de
301 Agricultura “Luiz de Queiroz”, da Universidade de São Paulo (CEPEA/ESALQ-USP).
302 Relatório Final. 2006. 251p.
- 303 MARTI, E.; MARTI, J.I.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A. Effect of
304 the cryopreservation process on the activity and immunolocalization of antioxidant
305 enzymes in ram spermatozoa. *Journal of Andrology*, v.29, n.4, p.459-467, 2008.

- 306 McINTOSH, T.J. Structure and physical properties of the lipid membrane. In:____
307 *Current Topics in Membranes*. v.48, Academic Press, 1999, cap.2, p.23-47.
- 308 MOCÉ, E.; BLANCH, E.; TOMÁS, C.; GRAHAM, J.K. Use of cholesterol in sperm
309 cryopreservation: present moment and perspectives to future. *Reproduction in Domestic*
310 *Animals*, suppl. 2, v.45, p.57-66, 2010.
- 311 MOORE, A.I.; SQUIRES, E.L.; GRAHAM, J.K. Adding cholesterol to the stallion
312 sperm plasma membrane improves cryosurvival. *Cryobiology*, v.51, p.241-249, 2005.
- 313 NAKAMURA, M.T.; NARA, T.Y. Essential fatty acid synthesis and its regulation in
314 mammals. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, v.68, p.145–150,
315 2003.
- 316 OLIVEIRA, C.H.; VASCONCELOS, A.B.; SOUZA, F.A.; MARTINS-FILHO, O.A.;
317 SILVA, M.X.; VARAGO, F.C.; LAGARES, M.A. Cholesterol additions protects
318 membrane intactness during cryopreservation of stallion sperm. *Animal Reproduction*
319 *Science*, v.118, p.194-200, 2010.
- 320 PÉREZ-PÉ, R.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A.; MUIÑO-BLANCO, T. Semen plasma
321 proteins prevent cold-shock membrane damage to ram spermatozoa. *Theriogenology*,
322 v.56, p.425-434, 2001.
- 323 PIKE, J.L. Rafts defined: a report on the keystone symposium on lipid rafts and cell
324 function. *Journal of Lipid Research*, v.47, p.1597-1598, 2006.
- 325 PRATT, C.W.; CORNELLY, K. Membranas biológicas. In:____. *Bioquímica Essencial*.
326 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, cap.8, p.221-249.
- 327

- 328 RETTERSTØL, K.; HAUGEN, T.B.; CHRISTOPHERSEN, B.O. The pathway from
329 arachdonic to docosapentaenoic acid (20:4n-6 to 22:5n-6) and from eicosapentaenoic to
330 docosahexaenic acid (20:5n-3 to 22:6n-3) studied in testicular cells from immature rats.
331 *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1483, p.119-131, 2000.
- 332 SAFARINEJAD, M.R.; HOSSEINI, S.Y.; DADKHAH, F.; ASGARI, M.A.
333 Relationship of omega-3 and omega-6 fatty acids with semen characteristics, and anti-
334 oxidant status of seminal plasma: A comparison between fertile and infertile men.
335 *Clinical Nutrition*, v.29, p.100-105, 2010.
- 336 SIERRA, S.; LARA-VILLOSLADA, F.; COMALADA, M.; OLIVARES, M.; XAUS,
337 J. Dietary eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid equally incorporate as
338 docosahexaenoic acid but differ in inflammatory effects. *Nutrition*, v.24, p.245-254,
339 2008.
- 340 SIMOPOULOS, A.P. Evolutionary aspects of diet: the omega-6/omega-3 ratio and the
341 brain. *Molecular Neurobiology*, 2010. Disponível em:
342 <<http://www.springerlink.com/content/gk473346812j7342/>>. Acesso em: 30 de abril de
343 2011.
- 344 SPIZZIRI, B.E.; BRUEMMER, J.E.; SQUIRES, E.L.; GRAHAM, J.K. Cholesterol-
345 loaded-cyclodextrins and fertility potential of stallions spermatozoa. *Animal*
346 *Reproduction Science*, v.118, p.255-264, 2010.
- 347 STILLWELL, W.; WASSALL, S.R. Docosahexaenoic acid: membrane properties of a
348 unique fatty acid. *Chemistry and Physics of Lipids*, v.126, p.1-27, 2003.
- 349

- 350 TAKAHASHI, T.; ITOH, R.; NISHINOMIYA, H.; KATOH, M.; MANABE N. Effect
351 of linoleic acid albumin in a dilution solution and long-term equilibration for freezing of
352 bovine spermatozoa with poor freezability. *Reproduction in Domestic Animals*, v.47,
353 p.92-97, 2012. Doi: 10.1111/j.1439-0531.2011.01806.x.
- 354 VARNER, D.D.; JOHNSON, L. From a sperm's eye view: revisiting our perception of
355 this intriguing cell. In:___ *Equine reproduction*. 2.ed. Oxford:Wiley-Blackwell, 2011,
356 cap.97, p.909-990.
- 357 VAZ, J.S.; DEBONI, F.; AZEVEDO, M.J.; GROSS, J.L.; ZELMANOVITZ, T. Ácidos
358 graxos como marcadores biológicos. *Revista de Nutrição*, v.19, n.4, p.489-500, 2006.
- 359 WASSAL, S.R.; STILLWELL, W. Docosahexaenoic acid domains: the ultimate non-
360 raft membrane domain. *Chemistry and Physics of Lipids*, v.153, p.57-63, 2008.
- 361 WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal*
362 *Reproduction Science*, v.60-61, p.481-492, 2000.
- 363 YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: Knobill, E., Neil, J.D. (Eds.). *The*
364 *Physiology of Reproduction*, 2. ed., New York:Raven Press Ltd, 1994, cap.5, p.189-317.
- 365 ZAHN, F.S., PAPA, F.O., DELL'AQUA, J.A. JR. Cholesterol incorporation on equine
366 sperm membrane: effects on postthaw sperm parameters and fertility. *Theriogenology*,
367 v.58, p.237-240, 2002.
- 368 ZEGINIADOU, T., PAPADIMAS, J., MANTALENAKIS, S. Acrosome reaction:
369 methods for detection and clinical significance. *Andrologia*, v.32, p.335-343, 2000.
- 370
- 371

Adição de lipídeos ao diluente de congelação do sêmen de garanhões

Addition of lipids to the freezing extender of stallion semen

B.F.B. Sampaio¹, C.E.S.N. Zúccari²

¹Mestrando do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UFMS, Campo Grande, MS, Brasil

²Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campo Grande, MS, Brasil. E-mail: carmem.zuccari@ufms.br

Resumo

O presente experimento teve como objetivo avaliar os efeitos da adição, ao diluidor de congelação, do ácido oléico-linoléico (AOL), β -sitosterol (β -sit) e da associação AOL + β -sit, sobre as variáveis espermáticas motilidade/vigor e integridade das membranas plasmática e acrossomais (*trypan blue*/Giemsa), do ejaculado de garanhões (n=10) submetidos à criopreservação. As análises foram realizadas nos momentos pós-colheita, pós-incubação com os lipídios e pós-descongelação, de acordo com os tratamentos experimentais: C - grupo controle; A1 e A2 - AOL nas concentrações de 37 μ M e 74 μ M; B1 e B2 - β -sit nas concentrações de 1 μ g/ml e 2 μ g/ml; AB1 e AB2 - AOL 37 μ M + β -sit 1 μ g/ml e AOL 74 μ M + β -sit 2 μ g/ml, respectivamente. Os dados foram submetidos à análise de variância, através do procedimento GLM do SAS, sendo as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Duncan considerando 5% de significância. Os valores das variáveis avaliadas pós-descongelação diferiram significativamente daqueles obtidos pós-colheita e pós-incubação. Não foi observada diferença significativa entre os tratamentos quando as variáveis foram comparadas dentro do mesmo momento. Conclui-se que nas concentrações testadas, os lipídios não conferiram maior crio-resistência ao espermatozóide equino, portanto não foram efetivos em preservar a integridade estrutural das membranas plasmática e acrossomais pós-descongelação.

Palavras-chave: ácido oléico-linoléico; β -sitosterol; equino; espermatozóide

Addition of lipids to the freezing extender of stallion semen

Abstract

The present work aimed to evaluate the effects of the addition of oleic-linoleic acid (OLA), β -sitosterol (β -sit) and the association OLA + β -sit AOL to the freezing extender in motility/vigor and integrity of plasma and acrosome membranes (trypan blue / Giemsa), of stallion ejaculate (n = 10) underwent cryopreservation. Analyses were performed at times post-collecting, post-incubation with lipids and post-thawing, according to the experimental treatments: C - control group, A1 and A2 - AOL at concentrations of 37 μ M and 74 μ M, B1 and B2 - β -sitosterol at concentrations of 1 μ g/ml and 2 μ g/ml, AB1 and AB2 - AOL + 37 μ M β -sitosterol 1 μ g/ml and AOL 74 μ M β -sitosterol + 2 μ g/ml, respectively. The data were subjected to analysis of variance, using the GLM procedure of SAS, and the treatment means compared by Duncan test at 5% significance level. The variables evaluated post-thawing differed significantly compared to the measured post-collecting and post-incubation. There was no significant difference between treatments when the variables were compared within the same time. It is concluded that the concentrations tested, the lipids did not confer greater crioresistance to the stallion spermatozoa, therefore have not been effective in preserving the structural integrity of plasmatic and acrosomal membranes post-thaw.

Keywords: β -sitosterol; equine; oleic-linoleic acid; spermatozoa

Introdução

A criopreservação da célula espermática é uma biotecnologia que vem sendo utilizada desde 1949, quando Polge, acidentalmente, descobriu as características crioprotetoras do glicerol (Curry, 2000). O uso dessa biotécnica traz inúmeros benefícios para o melhoramento de rebanhos, já que é possível aproveitar o potencial reprodutivo de animais geneticamente superiores, bem como fazer o armazenamento e o transporte desse material por longas distâncias.

Apesar desses benefícios o ciclo congelamento/descongelamento submete os espermatozoides a condições que podem acarretar o decréscimo de até 50% de sua viabilidade (Watson, 2000). Em geral, as lesões na membrana plasmática são causadas por alterações no volume celular, além de danos resultantes dos estresses térmico, osmótico e tóxico (Giraud et al., 2000).

O grau de fluidez das membranas espermáticas tem efeito sobre seu comportamento diante da criopreservação, sendo que membranas mais rígidas levam a alterações na permeabilidade e tornam-se mais sensíveis ao estresse osmótico, enquanto que membranas mais flexíveis deixam o espermatozoide mais resistente aos processos de congelamento e descongelamento. O grau de fluidez da membrana é influenciado por sua composição lipídica, comprimento e grau de insaturação dos ácidos graxos, pela quantidade de colesterol e pela relação colesterol:fosfolipídios (Giraud et al., 2000).

O colesterol tem participação importante nos fenômenos relacionados à capacitação espermática (Lane et al., 1999). Quando o espermatozoide está na fase de capacitação há uma diminuição da concentração de colesterol no plano da membrana plasmática, devido à sua remoção pela albumina presente no trato genital feminino. Esse

447 efluxo do colesterol causa uma desestabilização da membrana e precede a reação do
448 acrossomo, que é a fusão da membrana plasmática com a membrana acrossomal externa
449 (Yanagimachi, 1994). O processo de criopreservação pode aumentar o número de
450 células capacitadas precocemente, bem como o número de espermatozóides com reação
451 do acrossomo antes do momento da fecundação, resultando em um decréscimo dos
452 índices de fertilidade (Cormier et al., 1997).

453 Durante o processo de capacitação há inversão dos fosfolipídios entre os folhetos
454 da bicamada lipídica, expondo para o meio extracelular aqueles que têm predileção pela
455 camada citosólica como, por exemplo, a fosfatidiletanolamina. Esse processo facilita a
456 remoção do colesterol (Flesch e Gadella, 2000) e apesar de ser reversível em curto
457 prazo (Harrison, 1996), pode também ser induzida pela congelação (Januskauskas et al.,
458 2003).

459 A adição de alguns lipídios parece ser benéfica ao espermatozóide, conferindo
460 maior proteção durante o processo de criopreservação. A melhora na congelabilidade
461 pode ser observada com a adição do composto ácido oléico-linoléico (C18:1 n-9 e
462 C18:2 n-9, respectivamente - AOL) conferindo maior motilidade e viabilidade após a
463 descongelação do sêmen de carneiros (Pérez-Pé et al., 2001; Marti et al., 2008).

464 O uso do colesterol aumenta a proporção colesterol:fosfolipídio bem como a
465 tolerância osmótica, conferindo maior permeabilidade aos crioprotetores e aumento da
466 longevidade do espermatozóide (Mocé et al., 2010). A utilização de um análogo vegetal
467 do colesterol (β -sitosterol) mostrou efeitos similares ao do colesterol na congelação de
468 sêmen humano, sem a necessidade do complexo de inclusão para incorporação na
469 membrana espermática (Khorasani et al., 2000).

O estudo teve por objetivo avaliar o efeito da adição dos lipídios sobre a crioresistência, ácido oléico-linoléico e β -sitosterol, no diluente de congelação, sobre a integridade das membranas plasmática e acrossomais do espermatozóide equino submetido à criopreservação.

Material e Métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Foram utilizados dez garanhões adultos de fertilidade conhecida, das raças Quarto de Milha (n=8) e Paint Horse (n=2), com idades entre 7 e 20 anos, submetidos ao manejo adotado pelos haras a que pertencem. A colheita de sêmen foi realizada em manequim, com vagina artificial Modelo Botucatu[®] (Botupharma Biotecnologia Animal), sendo colhido um ejaculado de cada garanhão.

Após a colheita do sêmen e avaliação das características seminais, o ejaculado foi diluído em meio de centrifugação a base de leite desnatado (Botu-sêmen[®]; Botupharma Biotecnologia Animal), a uma concentração de 50×10^6 células / ml, refrigerado à 15°C no *container* modelo Equi Sêmen[®], durante seu transporte até o laboratório, em intervalo máximo de uma hora após a colheita. A seguir o sêmen diluído foi centrifugado a 600 G / 13 min., o sobrenadante descartado e o *pellet* ressuspendido com diluente a base de gema de ovo (Botucrio[®]; Botupharma Biotecnologia Animal), a uma concentração de 200×10^6 células / ml.

O volume final foi fracionado em sete alíquotas contendo 500×10^6 espermatozóides, às quais foram adicionados os lipídios, sendo constituídos os seguintes tratamentos: C - grupo controle; A1 e A2 - AOL nas concentrações de 37 μM e 74 μM ; B1 e B2 - β -sit nas concentrações de 1 $\mu\text{g/ml}$ e 2 $\mu\text{g/ml}$; AB1 e AB2 - AOL 37 μM + β -sit 1 $\mu\text{g/ml}$ e AOL 74 μM + β -sit 2 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. Após a adição dos lipídios as alíquotas de sêmen foram incubadas a 32°C por 15 minutos.

Depois do período de incubação foi realizado o envase em palhetas de 0,5 ml, contendo 100×10^6 espermatozóides. As palhetas foram submetidas à refrigeração a 5°C por 20 minutos, a seguir mantidas no vapor de nitrogênio por 20 minutos e então mergulhadas no nitrogênio líquido. A avaliação das variáveis seminais no momento pós-descongelação foi realizada após descongelação a 38°C / 30 seg.

As análises das variáveis seminais foram realizadas em três momentos: pós-colheita (PC), pós-incubação com os lipídios (PI) e pós-descongelação (PD).

A concentração foi estimada usando-se uma taxa de diluição de 1:100, em Câmara de Neubauer. Após a colheita do sêmen realizou-se a contagem do número de espermatozóides, sob microscopia de campo claro, com objetiva de 40x, sendo os valores expressos em $\times 10^6/\text{ml}$.

A avaliação da motilidade e vigor foi feita depositando-se 10 μl de sêmen entre lâmina e lamínula, sob microscopia de campo claro, com objetivas de 10 e 40x. O resultado foi expresso em percentagem conforme a proporção total de espermatozóides móveis e o vigor segundo escala padronizada de zero a cinco (0-5).

O *status* acrossomal foi avaliado empregando-se a técnica de dupla coloração (*trypan blue*/Giemsa – TBG) descrita por Didion et al. (1989). Foram armazenados 50 μl de *trypan blue* 0,4% (Sigma Aldrich do Brasil) com 50 μl de sêmen em tubo tipo

eppendorf e, após incubação em banho-maria (MD 100 – Fanem) a 37°C por 15 minutos, foram confeccionados os esfregaços, com a secagem das lâminas feita sobre placa aquecedora a 37°C. Após fixar em metanol por 5 minutos e estarem secas as lâminas foram imersas em solução de Giemsa *overnight*. A solução corante de Giemsa foi preparada em cubeta plástica com 27 ml de água deionizada acrescida de 3 ml da solução estoque de Giemsa (Merck). Em seguida, as lâminas foram lavadas com água deionizada, secas e avaliadas ao microscópio de campo claro (Zeiss), sob imersão. Os espermatozóides foram classificados como: vivos (V) – acrossomo corado em roxo ou rosa pelo Giemsa e região pós acrossomal não corada; mortos (M) – corados em azul pelo *trypan blue* na região pós-acrossomal e acrossomo corado em roxo ou rosa pelo Giemsa; reação do acrossomo verdadeira (RAV) – acrossomo e região pós-acrossomal não coradas e; reação do acrossomo falsa (RAF) – acrossomo não corado e região pós-acrossomal corada em azul.

O delineamento experimental foi em parcelas subdivididas considerando a adição de AOL e β -sitosterol em suas diferentes concentrações como tratamento e os momentos de avaliação como subparcelas. Para comparar as variáveis dependentes (motilidade, integridade das membranas plasmática e acrossomais) foi usada a análise de variância, pelo procedimento GLM do Programa Estatístico SAS (2001), considerando os efeitos fixos de tratamento (C, A1, A2, B1, B2, AB1 e AB2) e momentos de avaliação (PC, PI e PD). As médias foram comparadas pelo teste de *Duncan*, em nível de 5% de significância. As variáveis foram transformadas em arco seno ($x/100$) de acordo com o sugerido por Sampaio (1998).

Resultados e Discussão

Os resultados obtidos para as variáveis motilidade e vigor pós-colheita foram $79,0 \pm 3,2\%$ e $4,0 \pm 0,0$, respectivamente. Os valores pós-colheita diferiram ($p < 0,0001$) daqueles observados pós-descongelção, para todos os tratamentos. Houve diferença significativa entre os momentos pós-incubação e pós-descongelção, contudo dentro de cada um desses momentos, as variáveis foram similares entre os tratamentos (Tabela 1).

Tabela 1. Valores médios ($\pm$ desvio padrão) de motilidade e vigor do sêmen equino ($n=10$) após incubação com lipídios a 32°C / 15 minutos e pós-descongelção

Trat*	Variáveis / Momentos**			
	Motilidade (%)		Vigor (0 – 5)	
	PI	PD	PI	PD
C	$78,0 \pm 4,2^{a***}$	$54,0 \pm 17,1^b$	$4,1 \pm 0,6^a$	$2,9 \pm 0,7^b$
A1	$83,0 \pm 6,7^a$	$60,0 \pm 15,6^b$	$4,0 \pm 0,5^a$	$3,0 \pm 0,7^b$
A2	$82,0 \pm 6,3^a$	$64,0 \pm 13,5^b$	$4,1 \pm 0,3^a$	$3,1 \pm 0,7^b$
B1	$83,0 \pm 6,7^a$	$61,0 \pm 14,5^b$	$4,3 \pm 0,7^a$	$2,9 \pm 0,9^b$
B2	$79,0 \pm 3,2^a$	$59,0 \pm 15,2^b$	$4,3 \pm 0,8^a$	$3,2 \pm 0,6^b$
AB1	$87,0 \pm 6,7^a$	$64,0 \pm 11,7^b$	$4,4 \pm 0,5^a$	$3,1 \pm 0,6^b$
AB2	$83,0 \pm 4,8^a$	$55,0 \pm 15,1^b$	$4,3 \pm 0,5^a$	$3,0 \pm 0,8^b$

* Tratamentos: C = controle; A1 = ácido oléico-linoléico $37 \mu\text{M}$; A2 = ácido oléico-linoléico $74 \mu\text{M}$; B1 = β -sitosterol $1 \mu\text{g/ml}$; B2 = β -sitosterol $2 \mu\text{g/ml}$; AB1 = ácido oléico-linoléico $37 \mu\text{M}$ + β -sitosterol $1 \mu\text{g/ml}$; AB2 = ácido oléico-linoléico $74 \mu\text{M}$ + β -sitosterol $2 \mu\text{g/ml}$

** PI = Pós-incubação; PD = Pós-descongelção

*** Letras minúsculas diferentes na linha indicam diferença significativa entre médias para a mesma variável pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) ($p > 0,05$) entre tratamentos dentro de cada momento

Trabalhos que utilizam a adição de lipídios ao sêmen equino ainda são bastante escassos, portanto a discussão será feita com dados relativos a diferentes espécies ou lipídios similares aos aqui utilizados.

Os resultados deste trabalho diferiram dos relatados por Takahashi et al. (2011), que avaliaram a adição de ácido linoléico ao diluidor de congelação, testando touros que apresentavam sêmen de baixa congelabilidade. Os autores não observaram após a descongelação diferença entre o controle e o grupo submetido ao período curto de incubação (4 h a 4°C) com ácido linoleico (18:2 n-6), porém obtiveram valores superiores para a motilidade progressiva após o período de incubação de 30 h a 4°C, levando-os a supor que essa melhora foi devida à incorporação do ácido linoléico na bicamada lipídica, conferindo maior fluidez a membrana e melhorando, desta forma, a crioresistência seminal. O período de refrigeração utilizado no presente trabalho foi de 20 minutos, que mesmo somados aos 15 minutos de incubação a 32°C, pode ter sido um fator limitante à incorporação dos ácidos graxos testados na membrana.

Ao comparar diluidores a base de gema ovo e de leite e gema de ovo, Salazar et al. (2011) concluíram que uma taxa de resfriamento lenta (de 22 a 10°C -0,3°C/min e de 10 a 4°C -0,2°C/h) por aproximadamente 70 minutos combinada ao diluidor a base de gema de ovo proporcionou melhores resultados à descongelação do sêmen equino, apesar do resfriamento lento também ter melhorado as variáveis seminais com o diluidor a base de leite e gema de ovo. Os autores suspeitam que tenha ocorrido uma interação entre os lipídios da gema de ovo e a bicamada da membrana espermática e que essa associação pode ser melhorada através do uso de emulsificadores. Desta forma, ao se aumentar de 20 para 70 minutos o período de refrigeração pré-congelação, é possível

583 supor que possa haver uma maior associação entre os lipídios adicionados e a
584 membrana plasmática.

585 Os protocolos de congelação são diferentes entre as espécies equina e bovina,
586 principalmente quanto ao período de equilíbrio adotado, sendo preconizado um período
587 de 4 horas a 5°C para bovinos (Foote e Kaproth., 2002; Thun et al., 2002). Para equinos
588 esse período pode ser variável, e à comparação entre 20 minutos ou 24 horas sob
589 refrigeração, não houve diferença para as variáveis espermáticas motilidade, viabilidade
590 de membrana e taxa de prenhez (Melo et al., 2005). Outra diferença encontra-se na
591 proporção colesterol:fosfolipídios da membrana plasmática do espermatozóide, que em
592 equinos é de 0,36, valor superior ao encontrado no sêmen de suínos, porém inferior ao
593 de bovinos (Amann e Graham, 2011). Essas espécies tem o ejaculado mais susceptível
594 ao choque térmico, quando submetidas às baixas temperaturas, que espécies que
595 possuem maiores taxas de colesterol na membrana, como humanos e coelhos (Mocé et
596 al., 2011).

597 Pesquisadores testaram os efeitos da adição do colesterol, associado ao
598 complexo de inclusão ciclodextrina, ao sêmen de touros (Purdy e Graham, 2004) e
599 garanhões (Moore et al., 2005). Nos equinos Moore et al. (2005) observaram uma
600 modificação na proporção colesterol:fosfolipídios do espermatozóide, fato este que pode
601 ter auxiliado na estabilização da membrana. O aumento da estabilidade promove maior
602 proteção contra os efeitos deletérios da congelação e descongelação (Mocé et al., 2010).
603 Spizziri et al. (2009) encontraram melhora na motilidade progressiva do sêmen equino
604 ao adicionar colesterol ligado à ciclodextrina ao diluidor de centrifugação, porém
605 Oliveira et al. (2010) não observaram melhora da motilidade após a descongelação ao se
606 fazer a adição de colesterol ao sêmen de garanhões. Neste estudo, a adição do análogo

vegetal do colesterol, isoladamente ou em associação com AOL, não resultou em diferença significativa das variáveis motilidade e vigor, para nenhum dos tratamentos, dentro dos momentos PI ou PD.

Os percentuais médios obtidos à análise da viabilidade espermática e *status* acrossomal após a colheita do sêmen para as classes de vivos, mortos, reações do acrossomo verdadeira e falsa foram: $71,3 \pm 10,0$; $22,6 \pm 9,6$; $1,8 \pm 1,4$ e $4,4 \pm 2,1$, respectivamente. Não houve diferença ($p > 0,05$) entre tratamentos no momento PI, bem como entre os momentos PC e PI.

À análise da viabilidade espermática e *status* acrossomal, após a descongelação, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos. O momento PD diferiu significativamente do PI para as variáveis vivos ($p < 0,0001$), mortos ($p < 0,0001$) e espermatozóides com reação do acrossomo falsa ($p < 0,0005$). Para a variável reação do acrossomo verdadeira não foram observadas diferenças significativas entre os momentos (Tabela 2). Os resultados obtidos diferiram dos relatados por Pérez-Pé et al. (2001), que testaram diferentes concentrações de AOL no sêmen ovino buscando proteger as células espermáticas dos efeitos do choque térmico. Os autores concluíram que o AOL na concentração de $37 \mu\text{M}$ resultou em um número maior de células viáveis após a incubação e que concentrações menores conferiram baixa proteção às células. A concentração de $74 \mu\text{M}$ apresentou resultados inferiores àqueles obtidos no tratamento com $37 \mu\text{M}$. No presente trabalho foi testada a adição das duas concentrações de AOL que proporcionaram maior proteção aos efeitos deletérios do choque térmico no sêmen de ovinos (37 e $74 \mu\text{M}$), porém não foi observado efeito benéfico dessa adição no sêmen de equinos.

Tabela 2. Valores médios ($\pm$ desvio padrão) de integridade das membranas plasmática e acrossomais do sêmen equino fresco (n = 10), pela técnica de dupla coloração *trypan blue*/Giemsa, após incubação com lipídios a 32°C / 15 minutos e pós-descongelção

Trat*	Variáveis / Momentos**							
	Vivos		Mortos		Reação do acrossomo verdadeira		Reação do acrossomo falsa	
	PI	PD	PI	PD	PI	PD	PI	PD
C	71,1 $\pm$ 11,7 ^{a***}	36,5 $\pm$ 11,2 ^b	22,9 $\pm$ 9,6 ^a	56,0 $\pm$ 10,5 ^b	1,7 $\pm$ 1,3 ^a	2,6 $\pm$ 2,0 ^a	4,2 $\pm$ 2,7 ^a	4,8 $\pm$ 1,6 ^b
A1	73,8 $\pm$ 13,2 ^a	37,8 $\pm$ 12,4 ^b	20,5 $\pm$ 10,5 ^a	53,1 $\pm$ 10,4 ^b	1,9 $\pm$ 0,9 ^a	2,7 $\pm$ 2,0 ^a	3,7 $\pm$ 3,0 ^a	6,3 $\pm$ 2,3 ^b
A2	72,4 $\pm$ 14,0 ^a	40,6 $\pm$ 12,7 ^b	21,4 $\pm$ 11,2 ^a	49,8 $\pm$ 9,6 ^b	1,6 $\pm$ 0,7 ^a	3,0 $\pm$ 2,5 ^a	4,4 $\pm$ 3,7 ^a	6,5 $\pm$ 4,6 ^b
B1	73,8 $\pm$ 11,5 ^a	41,2 $\pm$ 9,9 ^b	21,8 $\pm$ 10,2 ^a	51,4 $\pm$ 9,3 ^b	1,4 $\pm$ 1,2 ^a	1,8 $\pm$ 1,1 ^a	2,9 $\pm$ 2,5 ^a	5,5 $\pm$ 2,5 ^b
B2	69,9 $\pm$ 12,8 ^a	44,6 $\pm$ 15,3 ^b	24,5 $\pm$ 10,6 ^a	49,3 $\pm$ 14,9 ^b	1,8 $\pm$ 1,2 ^a	1,0 $\pm$ 0,7 ^a	3,7 $\pm$ 2,7 ^a	5,1 $\pm$ 2,1 ^b
AB1	71,6 $\pm$ 9,3 ^a	44,3 $\pm$ 12,7 ^b	23,2 $\pm$ 7,9 ^a	47,5 $\pm$ 10,9 ^b	1,6 $\pm$ 1,4 ^a	2,0 $\pm$ 2,2 ^a	3,5 $\pm$ 2,3 ^a	6,2 $\pm$ 2,7 ^b
AB2	70,1 $\pm$ 11,8 ^a	42,6 $\pm$ 12,2 ^b	23,6 $\pm$ 9,4 ^a	49,4 $\pm$ 10,0 ^b	2,1 $\pm$ 0,9 ^a	1,9 $\pm$ 1,2 ^a	4,1 $\pm$ 2,6 ^a	6,0 $\pm$ 3,0 ^b

* Tratamentos: C = controle; A1 = ácido oléico-linoléico 37 μ M; A2 = ácido oléico-linoléico 74 μ M; B1 = β -sitosterol 1 μ g/ml; B2 = β -sitosterol 2 μ g/ml; AB1 = ácido oléico-linoléico 37 μ M + β -sitosterol 1 μ g/ml; AB2 = ácido oléico-linoléico 74 μ M + β -sitosterol 2 μ g/ml

** PI = Pós-incubação; PD = Pós-descongelção

*** Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre médias da mesma variável, nos momentos pós-incubação e pós-descongelção, pelo teste de Tukey (p<0,05)

A alta quantidade de AG saturados na membrana está relacionada à baixa qualidade seminal, enquanto que maiores proporções de PUFA's estão correlacionadas positivamente com a proporção de espermatozóides com a membrana íntegra. Através do conhecimento do perfil lipídico do espermatozóide é possível observar as alterações nas quantidades de AG de membrana e fazer a adição de AG ou a suplementação na dieta visando melhorar o desempenho reprodutivo de garanhões que possuam baixa congelabilidade devido a alterações no perfil lipídico da membrana do espermatozóide (Garcia et al., 2011). Os garanhões usados neste experimento possuíam boa congelabilidade, fator este que pode ser um dos responsáveis pela não observação de diferença significativa entre os tratamentos.

Além dos efeitos benéficos observados na motilidade/vigor e viabilidade espermática com a adição de colesterol ao sêmen de bovinos, ovinos e equinos, o uso desse lipídio aumenta a resistência osmótica do espermatozóide de garanhões e a permeabilidade da membrana à água e crioprotetores, fatos estes que podem contribuir para a estabilização da membrana, aumentando a congelabilidade (Glazar et al., 2009). Awad (2011) concluiu em seu trabalho que a adição de colesterol ao diluidor de congelação com concentração de glicerol inferior à recomendada (3%) resultou em valores superiores de viabilidade espermática e motilidade do sêmen de ovinos em comparação ao grupo controle contendo a concentração de glicerol recomendada para a espécie (6%), reduzindo dessa forma os efeitos tóxicos do glicerol.

Em revisão de literatura abordando a adição do colesterol na criopreservação do sêmen, Mocé et al. (2010) citam que o uso do colesterol pode provocar diminuição na taxa de reação do acrossomo, provavelmente sendo necessário um tempo maior no trato reprodutivo feminino para que este fenômeno ocorra, reduzindo, conseqüentemente, as taxas de fertilidade. Os autores compilaram alguns dados de diversas espécies e observaram que na maioria delas há uma melhora nas variáveis seminais, inclusive em testes de fertilidade *in*

vitro, porém no trabalho de Zahn et al. (2002) os resultados de fertilidade *in vivo* foram inferiores ao se utilizar sêmen congelado de garanhão acrescido do complexo colesterol-metil- β -ciclodextrina quando comparado com o sêmen não tratado. A adição do análogo vegetal do colesterol não alterou a taxa de espermatozóides apresentando reação do acrossomo verdadeira ou falsa após a congelação do sêmen de equinos nas doses testadas neste trabalho.

Em humanos a utilização do β -sitosterol mostrou resultados similares aos obtidos com a adição do complexo colesterol-metil- β -ciclodextrina, diminuindo as taxas de reação do acrossomo espontânea e induzida pela progesterona. O grau de inibição da reação acrossomal com o uso do β -sitosterol foi dose dependente, mostrando cerca de 50% de inibição com a concentração de 0,2 $\mu\text{g/ml}$ e quase que inibição total com 0,5 $\mu\text{g/ml}$ (Khorasani et al., 2000). Os autores demonstraram que a ação inibitória desses lipídios provavelmente é regulada por receptores e mediadores específicos que alteram a rigidez da membrana plasmática de maneira similar, evitando a interação entre a progesterona e seus receptores de forma não competitiva. Ao comparar a interação do colesterol e do β -sitosterol com a fosfatidilcolina, Gallová et al. (2011) concluíram que o comportamento de ambos os lipídios é semelhante em relação à incorporação geral na bicamada fosfolipídica, porém em altas concentrações (acima de 41 mol%) a incorporação do β -sitosterol é prejudicada. Os autores também descreveram que tanto o colesterol como o β -sitosterol se encontram na região hidrofóbica da bicamada lipídica e que o colesterol promove maior rigidez de membrana em concentrações acima de 33 mol%.

Estudos que utilizam a adição de análogos vegetais do colesterol ainda são muito escassos e os efeitos da adição desses lipídios ao sêmen e sua incorporação à membrana espermática ainda permanecem obscuros e podem servir como alternativas para a modificação do padrão lipídico dessas células.

694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718

Conclusão

Nas concentrações testadas o ácido oléico-linoléico e β -sitosterol não aumentaram a resistência do espermatozóide equino ao processo de criopreservação, sendo ineficazes em conferir maior proteção à integridade estrutural das membranas plasmática e acrossomais. Pesquisas são necessárias para testar diferentes períodos de incubação do ejaculado com os lipídios e os efeitos destes no sêmen de garanhões de baixa congelabilidade.

Referências

- 719
- 720
- 721 **Amann RP, Graham JK.** Spermatozoal function. In:____ *Equine reproduction*. 2.ed.
 722 Oxford:Wiley-Blackwell Publishing Ltd, 2011, cap.102, p.1053-1084.
- 723 **Awad MM.** Effects of sub-optimal glycerol concentration and cholesterol-loaded
 724 cyclodextrin in a Tris-based diluent on cryopreserved ram sperm longevity and acrosomal
 725 integrity. *Small Ruminant Research*, v.100, p.164–168, 2011.
- 726 **Curry MR.** Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Reviews of Reproduction*,
 727 v.5, p.46-52, 2000.
- 728 **Cormier N, Sirard MA, Bailey JL.** Premature capacitation of bovine spermatozoa is
 729 initiated by cryopreservation. *Journal of Andrology*, v.18, p.461-468, 1997.
- 730 **Didion BA, Dobrinski JR, Giles JR, Graves CN.** Staining procedure to detect viability and
 731 the true acrosome reaction in spermatozoa of various species. *Gamete Research*, v.22, p.51-
 732 57, 1989.
- 733 **Flesch FM, Gadella BM.** Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in process
 734 of fertilization. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1469, p.197-235, 2000.
- 735 **Foote RH, Kaproth MT.** Large Batch Freezing of Bull Semen: Effect of Time of Freezing
 736 and Fructose on Fertility. *Journal of Dairy Science*, v.85, p.453-456, 2002.
- 737 **Gallová, J.; Uhríková, D.; Kučerka, N.; Svorková, M.; Funari, S.S.; Murugova, T.N.;**
 738 **Almásy, L.; Mazúr, M.; Balgavý, P.** Influence of cholesterol and β -sitosterol on the
 739 structure of EYPC bilayers. *Journal of Membranes Biology*, v.243, p.1-13, 2011.
- 740

- 741 **García BM, Fernández LG, Ferrusola CO, Salazar-Sandoval¹ C, Rodríguez AM,**
 742 **Martínez HR, Tapia JA, Morcuende D, Peña FJ.** Membrane lipids of the stallion
 743 spermatozoon in relation to sperm quality and susceptibility to lipid peroxidation.
 744 *Reproduction in Domestic Animals*, v.46, p.141-148, 2011.
- 745 **Giraud MN, Motta C, Boucher D, Grizard G.** Membrane fluidity predicts the outcome of
 746 cryopreservation of human spermatozoa. *Human Reproduction*, v.15, p.2160-2164, 2000.
- 747 **Glazar AI, Mullen SF, Liu J, Benson JD, Critser JK, Squires EL, Graham JK.** Osmotic
 748 tolerance limits and membrane permeability characteristics of stallion spermatozoa treated
 749 with cholesterol. *Cryobiology*, v.59, p.201-206, 2009.
- 750 **Harrison RAP.** Capacitation mechanisms and the role of capacitation as seen in eutherian
 751 mammals. *Reproduction Fertility and Development*. v.8, p.581-594, 1996.
- 752 **Januskauskas A, Johannisson A, Rodríguez-Martínez H.** Subtle membrane changes in
 753 cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure and field
 754 fertility. *Theriogenology*, v.60, p.743-758, 2003.
- 755 **Khorasani AM, Cheung AP, Lee CYG.** Cholesterol inhibitory effects on human sperm-
 756 induced acrosome reaction. *Journal of Andrology*, v.21, p.586-594, 2000.
- 757 **Lane ME, Thérien I, Moreau R, Manjunath P.** Heparin and high-density lipoprotein
 758 mediate bovine sperm capacitation by different mechanisms. *Biology of Reproduction*, v.60,
 759 p.169-175, 1999.
- 760 **Marti E, Marti JI, Muíño-Blanco T, Cebrián-Pérez JA.** Effect of the cryopreservation
 761 process on the activity and immunolocalization of antioxidant enzymes in ram spermatozoa.
 762 *Journal of Andrology*, v.29, n.4, p.459-467, 2008.

- 763 **Melo CM, Zahn FS, Martin I, Alberti K, Orlandi C, Siqueira Filho ER, Dell'aqua Jr JA,**
 764 **Alvarenga MA, Papa FO.** Effects of cooling stallion semen for 24 h before freezing on
 765 fertility rates. *Animal Reproduction Science*, v.89, p.150-152, 2005.
- 766 **Mocé E, Blanch E, Tomás C, Graham JK.** Use of cholesterol in sperm cryopreservation:
 767 present moment and perspectives to future. *Reproduction in Domestic Animals*, suppl. 2, v.45,
 768 p.57-66, 2010.
- 769 **Moore AI, Squires EL, Graham JK.** Adding cholesterol to the stallion sperm plasma
 770 membrane improves cryosurvival. *Cryobiology*, v.51, p.241-249, 2005.
- 771 **Oliveira CH, Vasconcelos AB, Souza FA, Martins-Filho OA, Silva MX, Varago FC,**
 772 **Lagares MA.** Cholesterol additions protect membrane intactness during cryopreservation of
 773 stallion sperm. *Animal Reproduction Science*, v.118, p.194-200, 2010.
- 774 **Pérez-Pé R, Cebrián-Pérez JA, Muiño-Blanco T.** Semen plasma proteins prevent cold-
 775 shock membrane damage to ram spermatozoa. *Theriogenology*, v.56, p.425-434, 2001.
- 776 **Purdy PH, Graham JK.** Effect of adding cholesterol to bull sperm membranes on sperm
 777 capacitation, the acrosome reaction, and fertility. *Biology of Reproduction*, v.71, p.522-527,
 778 2004.
- 779 **Salazar JLJ, Teague SR, Love CC, Brinsko SP, Blanchard TL, Varner DD.** Effect of
 780 cryopreservation protocol on post thaw characteristics of stallion sperm. *Theriogenology*,
 781 v.76, p.409–418, 2011.
- 782 **Sampaio, IBM.** *Estatística aplicada à experimentação animal*. Belo Horizonte: Fundação de
 783 Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária, 1998. 221 p.
- 784 **SAS – Statistical Analysis System.** SAS/STAT software, Version 8.02, Cary: 2001.

- 785 **Spizziri BE, Bruemmer JE, Squires EL, Graham JK.** Cholesterol-loaded-cyclodextrins
 786 and fertility potential of stallions spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, v.118, p.255-
 787 264, 2010.
- 788 **Takahashi T, Itoh R, Nishinomiya H, Katoh M, Manabe N.** Effect of linoleic acid albumin
 789 in a dilution solution and long-term equilibration for freezing of bovine spermatozoa with
 790 poor freezability. *Reproduction in Domestic Animals*, , v.47, p.92-97, 2012. Doi:
 791 10.1111/j.1439-0531.2011.01806.x.
- 792 **Thun R, Hurtado M, Janett F.** Comparison of Biociphos-Plus and TRIS-egg yolk extender
 793 for cryopreservation of bull semen. *Theriogenology*, v.57, p.1087-1094, 2002.
- 794 **Watson PF.** The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction*
 795 *Science*, v.60-61, p.481-492, 2000.
- 796 **Yanagimachi R.** Mammalian fertilization. In: Knobill, E., Neil, J.D. (Eds.). *The physiology of*
 797 *reproduction*, 2.ed., New York: Raven Press Ltd, 1994, cap.5, p.189-317.
- 798 **Zahn FS, Papa FO, Dell'aqua, JA Jr.** Cholesterol incorporation on equine sperm
 799 membrane: effects on post thaw sperm parameters and fertility. *Theriogenology*, v.58, p.237-
 800 240, 2002.