

# Efeito da Inclusão de Colesterol após Criopreservação do Sêmen Caprino sobre a Fertilidade pelo Teste de Termorresistência

Effect of Inclusion of Cholesterol after Cryopreservation of Goat Semen on Fertility by Thermal Resistance Test

---

*Bruno Gonçalves da Silva<sup>1</sup>, Elenice Andrade Moraes<sup>2</sup>*

## Resumo

Objetivou-se avaliar a fertilidade do sêmen descongelado de machos caprinos tratados com colesterol pelo teste de termorresistência (TTR). Foram utilizados 30 ejaculados de reprodutores caprinos. O sêmen fresco foi dividido em sete alíquotas iguais e centrifugados a 800 G/10min e o pelete foi ressuscitado com diluente Tris. A cada tubo, foi adicionada uma concentração de colesterol carregado pela ciclodextrina (CCC): 0 mg; 0,75 mg; 1,5 mg; 3,0 mg; 4,5 mg; 6,0 mg ou 7,5 mg de CCC/120x10<sup>6</sup> espermatozoides/mL e após 15 minutos, foram refrigerados a 4 °C/2h, e depois diluídas com Tris-Gema de ovo-glicerol (2%), envasadas em palhetas de 0,50 mL e colocadas sob vapor de N<sub>2</sub> líquido a 5 cm de sua superfície por 20 minutos e estocadas em botijões criogênicos. O descongelamento foi feito em banho-maria a 37 °C/30s e 0,50 mL de sêmen foram incubados a 37 °C/3h (0, 60, 120 e 180 minutos) para avaliar a

---

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

<sup>2</sup>Zootecnista, D.Sc., professora da Universidade Federal do Vale do São Francisco (Univasf), Petrolina, PE, elenice.moraes@univasf.edu.br.

motilidade e vigor com microscópio (400 x). A variável foi avaliada por ANOVA. A motilidade e vigor foram maiores ( $P < 0,05$ ) nas amostras tratadas com 0,75 mg de colesterol pelo TTR no período de 0 min a 120 minutos quando comparado com demais tratamentos ( $P < 0,05$ ). Adição de 0,75 mg de colesterol no sêmen a fresco promoveu melhoria da qualidade espermática comprovada pelo TTR realizado por 3 horas.

**Palavras-chave:** espermatozoide, esteroide, membrana plasmática.

## Introdução

Existe grande variação nos resultados, principalmente quanto à utilização de sêmen congelado, o que permite questionamento acerca da metodologia aplicada (ANDRADE et al., 1999). Parte dos danos ocorre por causa das alterações na membrana pela mudança do estado fluído da membrana para o estado gel quando a temperatura é reduzida para valores abaixo da fase de transição (WATSON, 1981).

Uma maneira de evitar os danos é aumentar a fluidez da membrana a baixas temperaturas pela adição de colesterol à mesma (PURDY; GRAHAM, 2004). Diversas substâncias adicionadas ao sêmen a fresco são utilizadas com o objetivo de proteger os espermatozoides contra os efeitos deletérios do resfriamento a temperaturas críticas. A substância, atualmente, utilizada em procedimentos de resfriamento do sêmen de bovinos e equinos é a ciclodextrina carregada com colesterol, oferecendo resultados variados em relação à motilidade e reação acrossômica (AMORIM et al., 2009; MOORE et al., 2005).

As características espermáticas como a concentração, motilidade e morfologia são insuficientes para o diagnóstico de fertilidade. O teste de termorresistência (TTR) foi proposto por Dimitropoulos (1967) para avaliação da fertilidade potencial de partidas de sêmen congelado de bovino e foi, posteriormente, adaptado para as demais espécies. O objetivo deste trabalho foi utilizar o teste de termorresistência para avaliar a fertilidade potencial do sêmen descongelado de machos caprinos tratados com colesterol antes do congelamento.

## Material e Métodos

O experimento foi realizado no setor de caprinocultura da Universidade Federal do Vale do São Francisco (Univasf), situada no município de Petrolina, Pernambuco. A metil- $\beta$ -ciclodextrina foi carregada com colesterol como descrito por Purdy e Graham (2004). Utilizou-se sêmen de cinco reprodutores caprinos mestiços. Após a coleta, o sêmen fresco foi diluído em Ringer-Lactato e dividido em sete alíquotas iguais, centrifugados a 600 G por 10 minutos. Em seguida, o pelete foi ressuspenso com diluente Tris. A cada um dos sete tubos, foi adicionada uma concentração de colesterol carregado pela ciclodextrina (CCC), sendo considerados os tratamentos T1 = 0; T2 = 0,75; T3 = 1,5; T4 = 3,0; T5 = 4,5; T6 = 6,0 ou T7 = 7,5 mg de CCC/120x10<sup>6</sup> espermatozoides/mL. Os espermatozoides foram expostos a CCC durante 15 minutos e depois foram refrigeradas a 4 °C/2h. Depois, cada amostra foi diluída com Tris-Gema de ovo-glicerol (2%), envasadas em palhetas de 0,5 mL, colocadas sob vapores de N<sub>2</sub> líquido a 5 cm de sua superfície por 20 minutos e depois mergulhadas no N<sub>2</sub> líquido e estocadas.

O descongelamento foi feito em banho-maria a 37 °C por 30 segundos. Em seguida, uma alíquota de 0,5 mL de cada tratamento descongelado foi submetida ao TTR, que consistiu em adicionar a alíquota em um frasco de 1,5 mL e incubar em banho-maria a 37 °C, por 3 horas. Em intervalos de 60 minutos, a partir de zero até 180 minutos após o descongelamento, foram retiradas amostras de 10  $\mu$ L que, colocadas em lâmina e cobertas com lamínulas, foram avaliadas quanto à motilidade (0% a 100%) e vigor (0 a 5) utilizando microscópio (400x).

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

## Resultados e Discussão

Os valores da motilidade e vigor do sêmen observados após descongelamento estão sumarizados nas Tabelas 1 e 2.

As médias de motilidade para o sêmen congelado/descongelado avaliadas durante o TTR foram 39,19 (tempo = 0), 17,76 (tempo = 60), 24,48 (tempo = 120) e 8,9% (tempo = 180). A adição de 0,75 mg de colesterol no sêmen fresco de caprinos antes do protocolo de congelamento promoveu maiores valores de motilidade no TTR de 0 a 120 minutos, quando comparado com os demais tratamentos ( $P < 0,05$ ) (Tabela 1). Os resultados apresentados não corroboram com os de Silva et al. (2006) que, avaliando os efeitos da dimetil-formamida na criopreservação de sêmen caprino, observaram motilidade pelo TTR de 53% a 67% no tempo 0 minuto, e 14% a 36% no tempo 120 minutos, e similares aos valores encontrados no tempo 0 e 180 minutos, respectivamente, por Penitente Filho (2010) que observou de 40% a 50%, no início da incubação, e 8,44% a 10,63%, no tempo 180 minutos.

**Tabela 1.** Motilidade (MOT, %) das observações realizadas 0, 60, 120 e 180 minutos.

Tratamentos	MOT/t0min	MOT/t60min	MOT/t120min	MOT/t180min
0 mg	31,50 <sup>EF,a</sup>	16,60 <sup>C,b</sup>	17,50 <sup>D,b</sup>	11,33 <sup>A,c</sup>
0,75 mg	50,40 <sup>A,a</sup>	22,50 <sup>A,c</sup>	33,75 <sup>A,b</sup>	10,95 <sup>A,d</sup>
1,5 mg	42,75 <sup>CD,a</sup>	17,95 <sup>BC,c</sup>	25,25 <sup>C,b</sup>	8,45 <sup>B,d</sup>
3,0 mg	46,00 <sup>BC,a</sup>	18,75 <sup>B,c</sup>	30,00 <sup>B,b</sup>	8,50 <sup>B,d</sup>
4,5 mg	37,85 <sup>DE,a</sup>	18,15 <sup>B,c</sup>	22,00 <sup>CD,b</sup>	9,00 <sup>B,d</sup>
6,0 mg	29,50 <sup>F,a</sup>	13,85 <sup>D,c</sup>	18,75 <sup>D,b</sup>	6,15 <sup>D,d</sup>
7,5 mg	36,35 <sup>DE,a</sup>	16,50 <sup>C,c</sup>	24,10 <sup>C,b</sup>	7,95 <sup>C,d</sup>

MOT/t0: motilidade, em porcentagem, no tempo 0 min do TTR; MOT/t60: motilidade, em porcentagem, no tempo 60 min do TTR; MOT/t120: motilidade, em porcentagem, no tempo 120 min do TTR; MOT/t180: motilidade, em porcentagem, no tempo 0 min do TTR; MOT/t180: motilidade, em porcentagem, no tempo 180 min do TTR.  
<sup>A,B,C</sup>Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferiram pelo teste SNK ( $P < 0,05$ ). <sup>a,b,c</sup>Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferiram pelo teste SNK ( $P < 0,05$ ).

As médias dos valores do vigor para o sêmen descongelado durante o TTR foram 2,28 (tempo = 0 min), 2,13 (tempo = 60 min), 1,6 (tempo = 120 min) e 1,3 (tempo = 180 min). O vigor dos espermatozoides tratados com 0,75 mg de colesterol foi maior, quando comparado com o grupo de controle do tempo 0 a 120 minutos ( $P < 0,05$ ) (Tabela 2).

**Tabela 2.** Vigor (VIG) das observações realizadas em 0, 60, 120 e 180 minutos.

Tratamentos	VIG/t0min	VIG/t60min	VIG/t120min	VIG/t180min
0 mg	2,11 <sup>B,a</sup>	2,00 <sup>B<sup>C</sup>,a</sup>	1,56 <sup>B<sup>C</sup>,b</sup>	1,33 <sup>A,b</sup>
0,75 mg	3,00 <sup>A,a</sup>	2,78 <sup>A,ab</sup>	2,00 <sup>A,bc</sup>	1,44 <sup>A,c</sup>
1,5 mg	2,11 <sup>B,a</sup>	2,11 <sup>B<sup>C</sup>,a</sup>	1,67 <sup>B,b</sup>	1,44 <sup>A,b</sup>
3,0 mg	2,44 <sup>AB,a</sup>	2,11 <sup>B<sup>C</sup>,ab</sup>	1,78 <sup>AB,b</sup>	1,44 <sup>A,b</sup>
4,5 mg	2,11 <sup>B,a</sup>	2,11 <sup>B<sup>C</sup>,a</sup>	1,22 <sup>B<sup>C</sup>,b</sup>	1,11 <sup>AB,b</sup>
6,0 mg	1,78 <sup>B,a</sup>	1,56 <sup>C,a</sup>	1,11 <sup>C,ab</sup>	1,00 <sup>AB,b</sup>
7,5 mg	2,44 <sup>AB,a</sup>	2,22 <sup>AB,ab</sup>	1,89 <sup>A,bc</sup>	1,33 <sup>A,c</sup>

VIG/t0: vigor no tempo 0 min do TTR; VIG/t60: vigor no tempo 60 min do TTR; VIG/t120: vigor no tempo 120 min do TTR; VIG/t180: vigor no tempo 180 min do TTR. <sup>A,B,C</sup>Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferiram pelo teste SNK ( $P < 0,05$ ). <sup>a,b,c</sup>Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferiram pelo teste SNK ( $P < 0,05$ ).

## Conclusão

A adição de 0,75 mg de colesterol no sêmen antes do congelamento melhorou a qualidade seminal, quando avaliado pelo TTR realizado por 2 horas.

## Referências

- AMORIM, E. A. M.; TORRES, C. A. A.; GRAHAM, J. K.; AMORIM, L. S.; SANTOS, L. V. L. The hypoosmotic swelling test in fresh rabbit spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, [Amsterdam], v. 111, n. 2, p. 338-343, 2009.
- ANDRADE, S. J.; MARQUES, J. R., LEITE, R. C. Sêmen caprino congelado: efeito de dois diluidores sobre a taxa de fertilidade. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v. 23, p. 245, 1999.

DIMITROPOULOS, R. La signification du test de la thermorésistance dans l'appréciation de la valeur fécondant du sperma congele. **Animal Medicine Veterinary**, [S.l.], v. 4, p. 215-224, 1967.

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

PENITENTE FILHO, J. M. **Adição da vitamina E na criopreservação do sêmen caprino**. 2010. 55 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

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

SILVA, A. F.; COSTA, E. P.; OLIVEIRA, F. A.; TORRES, C. A. A.; HASS, G. T. S.; NASCIMENTO, V. A. Uso de dimetil-formamida associada ou não ao glicerol na criopreservação de sêmen caprino. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 35, n. 2, p. 452-456, 2006.

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