

UTILIZAÇÃO DO COLESTEROL NA CRIOPRESERVAÇÃO DE ESPERMATOZÓIDES NA ESPÉCIE EQUINA: UMA REVISÃO

Felipe Pires Hartwig^{1*}
Frederico Ozanam Papa²
José Antonio Dell'Aqua Junior²

RESUMO

A biotecnologia do sêmen proporciona inúmeras vantagens para os atuais programas reprodutivos. Possibilidade de transporte de sêmen a longas distâncias, incremento da utilização de reprodutores geneticamente superiores e diminuição dos riscos de disseminação de doenças para a égua e o potro são alguns dos benefícios proporcionados. Apesar dos avanços, existe ainda uma grande disparidade entre ganhões em relação à qualidade seminal frente aos processos da criopreservação, fato que gera grandes variações nas taxas de fertilidade. Nesse sentido, estudos têm sido desenvolvidos a fim de testar substâncias que possam ser incorporadas aos espermatozóides e que tenham condições de conferir maior resistência frente às injúrias geradas pela refrigeração e congelamento. A adição de colesterol ligado à ciclodextrina (CLC) tem demonstrado *in vitro* ser uma alternativa promissora para os ganhões conhecidos por possuírem baixa viabilidade após a criopreservação. No entanto, até o momento os resultados de fertilidade não justificam a aplicação comercial dessa técnica. O objetivo dessa revisão é de compilar artigos sobre o efeito da adição do colesterol à membrana dos espermatozóides equinos criopreservados.

Palavras-chave: criopreservação, ganhão, sêmen, colesterol.

USE OF CHOLESTEROL IN EQUINE SPERM CRYOPRESERVATION: A REVIEW

ABSTRACT

Semen biotechnology provides several advantages to current reproductive programs. The benefits include the possibility of transporting semen over long distances, increased use of genetically superior stallions, and reducing the risk of spreading diseases to both the mare and the foal. Even with these advances, there is still a wide disparity among stallions regarding semen quality due to the processes of cryopreservation, which generates significant variation in fertility rates. In this regard, studies have been conducted to test new substances that can be incorporated into sperm and confer increased resistance against injuries caused by cooling and freezing. The addition of cholesterol bound to cyclodextrin (CLC) *in vitro* has been suggested as a promising alternative for stallions known to have poor semen viability after cryopreservation. However, to date the results regarding fertility do not justify commercial applicability of this approach. The objective of this review is to compile articles on the effect of adding cholesterol into the membrane of cryopreserved equine sperm.

Keywords: cryopreservation, stallion, semen, cholesterol

¹ Pós-graduando do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP/Botucatu/Brasil.

*Endereço para correspondência: Felipe Pires Hartwig, Rua Dr. Ranimiro Lotufo nº 593, Vila São Judas Thadeu, Botucatu-SP, Brasil. CEP: 18600-000. Tel (53) 81155430. Email: felipe_hartwig@hotmail.com

² Professor do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP/Botucatu/Brasil

USO DE COLESTEROL EN LA CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMA EN EQUINOS: UNA REVISIÓN

RESUMEN

La biotecnología para el manejo del semen proporciona varias ventajas en los programas reproductivos actuales, algunas de las cuales incluyen: la posibilidad de transportar el semen a través de grandes distancias, el aumento de la utilización de reproductores genéticamente superiores y la disminución de riesgos de diseminación de enfermedades para la yegua y potro. A pesar esto, aún existe una gran desigualdad entre los sementales con relación a la calidad espermática en lo referente a los procesos de criopresevación, lo que genera grandes variaciones en las tasas de fertilidad. En ese sentido, se han desarrollado estudios con el objetivo de probar sustancias que puedan ser incorporadas a los espermatozoides y que tengan condiciones de proporcionar una mayor resistencia contra lesiones generadas por refrigeración y congelación. La adición de colesterol unido a la ciclodextrina (CLC) *in vitro*, ha demostrado ser una alternativa prometedora para sementales con baja viabilidad después de la criopreservación. Sin embargo, hasta el momento los resultados de fertilidad no justifican la aplicación comercial de esta técnica. El objetivo de esta revisión es recopilar artículos sobre el efecto de la adición del colesterol a la membrana de los espermatozoides criopreservados de equinos.

Palabras clave: criopreservación, semental, semen, colesterol

INTRODUÇÃO

O avanço da reprodução assistida nas espécies animais vem sendo alcançado por meio da aplicação de biotécnicas cada vez mais modernas. O desenvolvimento de técnicas adequadas para a preservação e armazenamento de sêmen é uma das etapas mais importantes nesse avanço, visto os diversos benefícios proporcionados para os atuais programas reprodutivos.

Por meio do uso da inseminação artificial (IA) com sêmen criopreservado é possível a utilização do reprodutor em momentos nos quais não seria possível a monta natural ou a utilização do sêmen fresco. É o caso de animais que se encontram em campanhas esportivas, situações de comprometimento físico ou mesmo de óbito. Esta biotécnica possibilita ainda o transporte de sêmen a longas distâncias e um melhor aproveitamento de ganhões geneticamente superiores (1).

Após a aprovação pela maioria das associações das raças de equinos, a IA foi amplamente difundida entre os criatórios desta espécie (2). No entanto, apesar dos benefícios, existem fatores que limitam o uso da IA com sêmen criopreservado e contribuem para a ocorrência de variações nos resultados de fertilidade (3, 4).

Em condições naturais, a espécie equina apresenta os menores índices de fertilidade entre as espécies domésticas. Um dos motivos para essa situação são os critérios de seleção utilizados, os quais levam em consideração principalmente a genealogia e o desempenho em competições, deixando em segundo plano os parâmetros de fertilidade (5).

Outro fator limitante é a diferença entre ganhões em relação à resistência dos espermatozoides frente aos processos de criopreservação (6). Em casos extremos, somente é possível a utilização do sêmen no estado a fresco, situação que reduz os benefícios gerados pela IA em um considerável número de reprodutores (3).

As espécies que apresentam espermatozoides com alta relação de molaridade de colesterol:fosfolipídio de membrana possuem maior resistência frente aos processos de criopreservação (7). A partir desta informação, estudos têm sido desenvolvidos em diferentes

espécies para avaliar o efeito da adição do colesterol à membrana dos espermatozoides criopreservados (8, 9).

Em equinos, os resultados obtidos *in vitro* com a adição de colesterol são muito promissores, no entanto, até o momento, as taxas de prenhez por ciclo não ultrapassaram 25% (10, 11), valor muito inferior em comparação a média de 53% descrita por Loomis (12) para inseminações que utilizam sêmen criopreservado. Por esta razão, tem sido proposto que a presença de altos níveis de colesterol incorporada à membrana espermática interfira no padrão fisiológico de capacitação espermática e reação acrossômica (10, 11).

O objetivo dessa revisão é de compilar artigos sobre a adição do colesterol à membrana dos espermatozoides equinos criopreservados e a sua influência sobre a capacitação espermática e reação acrossômica.

Princípios da Criopreservação

Inicialmente o sêmen deve ser resfriado da temperatura corpórea à temperatura ambiente (37°C até 20°C). Este resfriamento não causa maiores danos aos espermatozoides, desde que estejam diluídos adequadamente (13).

O estresse inicial ocorre quando os espermatozoides passam da temperatura ambiente para 5°C (14). Esta é uma faixa crítica no processo de refrigeração, devido à ocorrência da fase de transição dos fosfolípidios da membrana plasmática do estado líquido-cristalino para o estado de gel (15). Os espermatozoides devem ser resfriados de forma correta neste período crítico para que não sofram danos irreversíveis, que causarão queda na fertilidade. Os danos decorrentes dessa faixa de refrigeração são denominados conjuntamente de “choque frio” (16).

Para evitar o choque térmico, é fundamental o controle da curva de refrigeração e a utilização de meios diluentes adequados (15). Até o presente, os diluentes de refrigeração mais utilizados na espécie equina são derivações do meio criado por Kenney et al. (17), que tem na sua composição básica leite desnatado, glicose e antibióticos.

Com o emprego de equipamentos específicos para transporte de sêmen, a taxa de refrigeração é controlada, sendo obtida uma curva de refrigeração lenta e progressiva de aproximadamente 0,3°C por minuto até a estabilização a 5°C. Com isso, mínimos efeitos estressantes e deletérios são gerados aos espermatozoides, proporcionando uma viabilidade de até 72 horas pós-ejaculação para grande parte dos ganhões (1).

O processo de congelamento de sêmen envolve os seguintes passos: queda de temperatura, desidratação celular, congelamento e descongelamento (18). Estas etapas promovem lesões celulares devido a choque térmico, formação de cristais de gelo intracelulares, injúrias oxidativas, estresse osmótico e alterações no DNA (19). A faixa crítica de danos durante a congelamento ocorre entre -15°C e -60°C. Após o sêmen atravessar esta faixa de temperatura, a atividade metabólica cessa e as células permanecem inativas (15).

A congelamento modifica a membrana celular de modo que altera a habilidade do gameta masculino de interagir com as estruturas do trato reprodutivo feminino. De acordo com Bailey et al. (20), os espermatozoides congelados possuem menor capacidade de aderir-se às células epiteliais do oviduto. Este local atua como reservatório para manutenção dos espermatozoides em metabolismo basal, proporcionando assim, viabilidade às células até o momento da ovulação (20). Adicionalmente, segundo Moore et al. (21), a congelamento promove perdas de aproximadamente 28% do conteúdo de colesterol da membrana espermática. Tal fato contribui para a ocorrência de reações acrossômicas prematuras e conseqüentemente diminuição da viabilidade pós-descongelamento.

Este fenômeno que ocorre no processo de congelamento é conhecido como “criocapacitação” (20). Esta condição deve ser levada em consideração para o momento da fertilização, principalmente nas espécies que possuem o estro prolongado, como é o caso da

equina. Em condições fisiológicas, o espermatozóide equino fica viável por pelo menos 72 horas no oviduto da égua, diferente do oócito que possui viabilidade máxima de 12 horas (22).

Devido às alterações que a criopreservação promove nos espermatozoides, existe a necessidade da aplicação de medidas para a obtenção de melhores índices de fertilidade. Utilização de dose inseminante com maior concentração espermática, inseminação na extremidade do corno uterino, controle folicular intensivo para aproximar o momento da IA e a ovulação, são estratégias comumente utilizadas em programas reprodutivos de equinos (23). No entanto, estas ações acarretam mudanças no manejo na propriedade, elevação dos custos de produção e muitas vezes com baixos resultados de prenhez.

Atuação do colesterol na criopreservação celular

As espécies podem ser classificadas de acordo com a resistência de seus espermatozoides frente à criopreservação. O coelho e o humano são muito resistentes, em contrapartida, os ovinos, suínos, bovinos e equinos são considerados susceptíveis às lesões causadas pelo frio. Ao ser analisada a composição da membrana espermática, foi constatado que as espécies resistentes à criopreservação possuem alta taxa de molaridade de colesterol:fosfolípido (7, 24, 25). O garanhão tem uma taxa molar de colesterol:fosfolípido de membrana de 0,36 (25), valor consideravelmente menor que no coelho e no homem que possuem respectivamente 0,88 e 0,99 (7).

O colesterol apresenta efeitos que reduzem os danos celulares decorrentes da criopreservação. O choque térmico é minimizado na presença de níveis elevados de colesterol, ocorrendo diminuição da temperatura ou até mesmo evitando a ocorrência da fase de transição dos fosfolípidios da membrana, promovendo um estado fluído intermediário ao invés da fase transicional gel. O colesterol possui ainda ação estabilizadora e moduladora da fluidez da membrana (24, 26).

O espermatozóide equino, quando comparado ao bovino, possui uma estreita faixa de tolerância frente a variações osmóticas. A adição e remoção de crioprotetores, congelamento e descongelamento são eventos promotores de grandes estresses osmóticos (19, 27, 28).

Glazar et al. (28) demonstraram em espermatozoides equinos, que a adição de colesterol incrementou a viabilidade pós-descongelamento devido à redução do estresse osmótico. Com o aumento dos níveis de colesterol da membrana foi gerada uma elevação no limiar osmótico e conferida maior permeabilidade à água e aos crioprotetores.

Em contrapartida, o colesterol causa um decréscimo na permeabilidade aos cátions (29), como é o caso do cálcio, que sabidamente está envolvido no desencadeamento da capacitação espermática. Com essa característica do colesterol, são reduzidas as chances da ocorrência de reação acrossômica antes da chegada dos espermatozoides ao local da fertilização.

Utilização de ciclodextrinas

As ciclodextrinas foram isoladas primeiramente como produtos da degradação enzimática do amido e foram classificadas como oligossacarídeos cíclicos. Ao reconhecer-se que estas substâncias eram capazes de formar compostos de inclusão, passou-se a trabalhar na síntese de ciclodextrinas puras (30).

Dentre os três tipos de ciclodextrinas (α , β , γ), as β -ciclodextrinas apresentam a estrutura mais adequada para englobar componentes lipídicos. Devido à alta afinidade por esteróides, as ciclodextrinas são utilizadas para modificar as concentrações de colesterol das membranas (31-33).

As ciclodextrinas possuem habilidade de formar compostos de inclusão com uma variedade de moléculas naturais e sintéticas como hormônios, vitaminas e compostos

lipídicos. Para desenvolver a função carreadora para as membranas, a ciclodextrina deve estar previamente ligada às moléculas a serem carreadas e as mesmas devem caber inteira ou parcialmente na cavidade da ciclodextrina (30, 34).

Estas substâncias carreadoras possuem uma face externa hidrofílica e uma face interna hidrofóbica, e por essa característica são capazes de dissolver, carrear e aumentar a solubilidade em soluções aquosas de compostos hidrofóbicos, como o colesterol (35).

A aptidão da β -ciclodextrina e seu complexo de inclusão de alterar o conteúdo lipídico da membrana plasmática são devido à capacidade de estabelecer um equilíbrio entre os níveis de colesterol ligados à ciclodextrina com o colesterol contido na membrana. Portanto, a incubação da membrana celular somente com ciclodextrina provoca a retirada de colesterol, diferentemente, após a incubação de células contendo baixos níveis de colesterol ocorre incorporação desse lipídio na membrana plasmática (36).

Oliveira et al. (33) testaram em espermatozoides equinos criopreservados e tratados com colesterol ligado à ciclodextrina (CLC), a utilização da β -ciclodextrina isoladamente para remover parte do colesterol da membrana após a descongelação. No entanto, com as concentrações utilizadas nesse estudo, a β -ciclodextrina não foi capaz de remover o colesterol até níveis considerados fisiológicos.

Capacitação espermática e reação acrossômica

Após a ejaculação, grandes quantidades de espermatozoides são depositadas no trato reprodutivo da fêmea. No entanto, normalmente apenas um espermatozoide irá fertilizar o oócito. Para garantir que ocorra esse processo, existem mecanismos altamente regulados de interação entre os gametas e a fertilização.

O espermatozoide maduro é composto por três porções especializadas. A cabeça, que contém o DNA e é fundamental para a interação do espermatozoide com o oócito. A peça intermediária, na qual estão as mitocôndrias responsáveis pela produção de energia, e o flagelo, que atua na motilidade espermática (37).

A região da cabeça do espermatozoide, além do núcleo, possui no seu extremo apical o acrossomo, uma vesícula que contém enzimas hidrolíticas necessárias para a penetração na zona pelúcida e subsequente fertilização do oócito (38). Ainda no limite entre a membrana que recobre o acrossomo e a região caudal ao mesmo, existe a zona equatorial, local de fusão do espermatozoide com o oolema (37).

Para que o espermatozoide exerça sua função, é necessário adquirir a capacidade de realizar as etapas que antecedem a fertilização. Para tanto, a célula sofre uma série de mudanças metabólicas e estruturais durante o seu transporte pelas secreções do trato reprodutivo feminino. Essas mudanças sofridas, coletivamente são denominadas capacitação espermática (38). O papel mais importante da capacitação são as modificações que tornam o espermatozoide capaz de sofrer reação acrossômica em resposta à ligação à zona pelúcida (16).

O primeiro passo na capacitação espermática é o aumento intracelular de cálcio, bicarbonato e peróxido de hidrogênio, que juntos irão estimular a produção de AMPc, que por sua vez ativará a proteína quinase A para fosforilar proteínas da membrana (39). A capacitação também promove mudanças no padrão do movimento, conferindo à célula um estado de hiper motilidade. Com isso, o espermatozoide consegue se desprender do epitélio do oviduto, progredir pelo mesmo e penetrar na zona pelúcida (38, 40, 41).

O processo de interação entre o espermatozoide e o oócito envolve uma sequência de eventos. Após se ligar ao oócito, o espermatozoide desencadeia o processo de reação acrossômica (Figura 1, itens a, b). Mais especificamente, a ligação à zona-pelúcida estimula um influxo de cálcio na célula, que vai gerar aumento da fluidez e fusão das membranas

plasmática e acrossomal externa. Após essa fusão são liberadas enzimas hidrolíticas do interior do espermatozóide que irão permitir sua passagem pela zona pelúcida (37, 42).

Com a perda das membranas externas, a membrana acrossomal interna se liga à zona pelúcida e ocorre a penetração no espaço perivitelínico (Figura 1, item c). Pela zona equatorial o espermatozóide e o oolema se fundem e o gameta masculino é englobado para o interior do oócito (Figura 1, itens d, e). Finalmente, após a ativação do gameta feminino é iniciado o bloqueio à polispermia pela liberação de grânulos corticais (Figura 1, item 6) (37, 42).

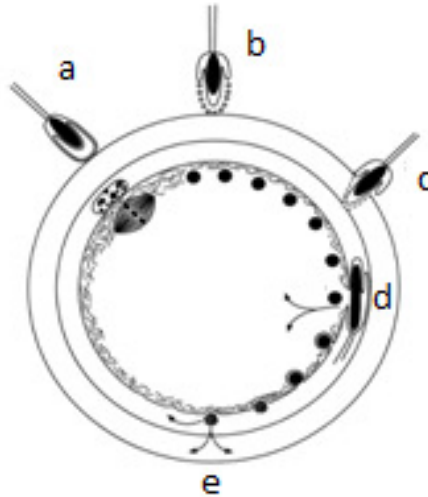


Figura 1. Representação sequencial dos eventos de interação entre o espermatozóide e oócito que antecedem a fertilização. Fonte: Gadella (37). Ligação do espermatozóide à zona pelúcida (a) e reação acrossômica (b). Penetração pela zona pelúcida ao espaço perivitelínico (c). Ligação e fusão do espermatozóide ao oolema (d). Secreção de grânulos corticais causando o bloqueio a polispermia (e).

Uma importante etapa da capacitação e reação acrossômica é a ocorrência de uma desestabilização da membrana plasmática. Alterações na composição dos lipídios e fosfolipídeos geram essa desestabilização, que por sua vez, aumentará a fluidez da membrana, possibilitando a fusão com a membrana acrossomal externa. Portanto, o colesterol possui um papel fundamental nesse mecanismo, visto que seu efluxo da membrana acrossomal durante a passagem pelo trato feminino é um acontecimento obrigatório para o processo de capacitação espermática (43, 44).

O colesterol é considerado um lipídeo não integral de membrana, isto é, pode se desassociar facilmente da membrana plasmática (45). Após a ejaculação, substâncias decapacitantes originadas do trânsito epididimário e do contato com o plasma seminal encontram-se ligadas à superfície do acrossomo. De acordo com Gadella et al. (37), a taxa de capacitação depende do efluxo de colesterol da membrana do espermatozóide.

Davis (46) demonstrou que quanto maior a taxa molar de colesterol:fosfolipídio da membrana, maior o tempo necessário para ocorrer a capacitação espermática. Espécies como os suínos e ovinos demoram no máximo duas horas para capacitar, em contrapartida coelhos e humanos demoram até sete horas.

Incorporação de colesterol à membrana dos espermatozóides

Após o conhecimento das propriedades fisiológicas do colesterol sobre as membranas, estudos são desenvolvidos nas espécies susceptíveis ao choque térmico, a fim de melhorar os

resultados de fertilidade dos programas reprodutivos que utilizam o sêmen congelado (9, 10, 47, 48).

Combes et al. (8) foram os primeiros a testar a incorporação de CLC à membrana de espermatozoides equinos. Melhoras significativas foram obtidas nos parâmetros de motilidade total, progressiva e porcentagem de células rápidas, além de aumento de integridade de membrana. Mesmo alcançando bons resultados laboratoriais, não foi realizado teste de fertilidade.

Segundo Moore et al. (21), pelo tratamento dos espermatozoides com CLC, é possível aumentar os níveis de colesterol na membrana mais de duas vezes em relação às concentrações iniciais. Dessa forma, os espermatozoides adquirem taxas de colesterol semelhantes aos animais resistentes ao choque térmico.

Assim como em equinos, todas as espécies susceptíveis ao choque térmico avaliadas quanto à adição de CLC à membrana espermática responderam positivamente, pelo aumento da viabilidade pós-descongelamento. Os parâmetros mais favorecidos foram de motilidade e integridade de membrana (8, 9, 47, 48).

Além do sêmen congelado, a adição de colesterol também é benéfica para os espermatozoides refrigerados. Torres et al. (49) testaram a incorporação de CLC em espermatozoides equinos refrigerados a 5°C. Ocorreu um aumento nos parâmetros de motilidade total, progressiva e de integridade de membrana até 72 horas após o início da refrigeração. Estes resultados são semelhantes aos de Kirk et al. (50), que também observaram que espermatozoides de garanhões com baixa resistência à criopreservação são os mais favorecidos com o tratamento com CLC (21, 50). Apesar de bons resultados *in vitro*, até o presente momento, não foram realizados testes de fertilidade com o sêmen equino refrigerado tratado com CLC.

Durante o processo de capacitação, o efluxo de colesterol da membrana é essencial para o desencadeamento da capacitação e reação do acrossomo (37). Portanto, o colesterol presente em altos níveis na membrana, possui a capacidade de interferir no padrão fisiológico de capacitação e reação do acrossomo (10).

Spizziri et al. (11) testaram três indutores de reação acrossômica em espermatozoides equinos tratados e não tratados com CLC. Quando utilizado o cálcio ionóforo (A23187) e lisofosfatidilcolina (LPC) ambos os grupos responderam positivamente à indução de reação acrossômica. Diferentemente, a dilauroilfosfatidilcolina (PC12) empregada em diferentes concentrações, não promoveu reação acrossômica ao grupo tratado com CLC.

Tais achados indicam que a membrana dos espermatozoides tratados com CLC, em função de adquirir maior nível de colesterol, torna-se mais estável e provavelmente necessita de mais tempo ou maior estímulo para sofrer a capacitação espermática e posteriormente a reação acrossômica. Adicionalmente, diferente do que foi cogitado por Brinsko et al. (51), a membrana do espermatozoide tratado com CLC não sofre modificações a ponto de perder a habilidade de capacitação e reação acrossômica (11, 33).

Outro aspecto importante foi demonstrado por Spizziri et al. (11) e Moore et al. (21), que comprovaram não haver mudanças na composição da membrana que pudesse prejudicar a ligação dos espermatozoides tratados com CLC à zona pelúcida.

A adição de colesterol à membrana dos espermatozoides equinos possibilita um aumento da resistência à criopreservação (8, 21, 49, 50). No entanto, mesmo com o incremento da viabilidade, os resultados de fertilidade são inferiores em relação aos animais não tratados (10, 11).

Zahn et al. (10) investigaram a fertilidade do sêmen equino congelado previamente tratado com CLC. Apesar do aumento significativo da integridade de membrana pós-descongelamento do grupo CLC (48.7% CLC contra 43.9% grupo controle), a incorporação do colesterol à membrana dos espermatozoides diminuiu a fertilidade (25% prenhez CLC contra 75% grupo controle). Estes resultados são semelhantes aos de Spizziri et al. (11), que

observaram que mesmo os espermatozoides tratados com CLC tendo respondido aos indutores de reação acrossômica e se ligado normalmente à zona pelúcida, apresentaram baixas taxas de prenhez (28,6% grupo controle contra 15% grupo CLC).

Assim como relatado na espécie humana (52, 53), existe uma população de ganhões classificados como sub-férteis, porém, sem causa definida. Esses animais apresentam parâmetros espermáticos adequados, mas com taxas de prenhez por ciclo variando entre 0% e 15% (51).

Ao ser analisada a composição do plasma seminal e membrana dos espermatozoides dos animais sub-férteis, foi constatado que as taxas molares de colesterol:fosfolipídios eram mais que o dobro em relação aos ganhões considerados férteis. Diferente dos resultados de Spizziri et al. (11), os animais sub-férteis apresentaram baixa porcentagem de reação acrossômica frente à indução com cálcio ionóforo (51).

Os dados apresentados corroboram a influência do colesterol sobre a capacitação e a reação do acrossomo. Uma hipótese para a diminuição da fertilidade dos espermatozoides tratados com CLC seria pelas modificações nas características de permeabilidade e de fluidez, tornando a célula mais estável, dificultando o influxo de cálcio. Com esse influxo diminuído, a adenilciclase não é ativada e o padrão de capacitação espermática e reação acrossômica são alterados (29, 33, 54).

Uma alternativa a ser estudada, é a criação de protocolos específicos de IA com sêmen criopreservado tratado com CLC. Devido ao maior teor de colesterol na membrana plasmática, pode haver atraso da capacitação espermática, portanto, seria plausível testar a realização da IA em diferentes momentos pré-ovulação (10, 11).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A incorporação de colesterol à membrana espermática constitui uma forma eficiente de aumentar a viabilidade do sêmen criopreservado, principalmente para os reprodutores com baixa resistência ao choque térmico. Porém, para esse método tornar-se uma realidade na prática reprodutiva, melhores taxas de fertilidade necessitam ser alcançadas.

Devido à grande influência do colesterol sobre a capacitação e reação acrossômica, são necessários novos estudos para o desenvolvimento de protocolos específicos de IA e realização de testes laboratoriais mais completos utilizando espermatozoides equinos criopreservados e tratados com colesterol.

REFERÊNCIAS

1. Pimentel CA, Carneiro GF. Biotécnicas aplicadas à reprodução de equinos. In: Gonçalves BDG, Figueiredo RF, Freitas VJF. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. 2ª ed. São Paulo: Roca; 2008. p.145-59.
2. Aurich JE, Aurich C. Developments in european horse breeding and consequences for veterinarians in equine reproduction. *Reprod Domest Anim.* 2006;41:275-9.
3. Aurich C. Recent advances in cooled-semen technology. *Anim Reprod Sci.* 2008; 107:268-75.
4. Loomis PR, Graham JK. Commercial semen freezing: individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Anim Reprod Sci.* 2008;105:119-28.

5. Varner DD, Love CC, Blanchard TL, Bliss SB, Carrol BS, Macpherson ML. Breeding-management strategies and semen-handling techniques for stallions - case scenarios. In: Proceedings of the 56th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners; 2010, Baltimore. Maryland: AAEP; 2010. p.56.
6. Brinsko SP, Crockett EC, Squires EL. Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. *Theriogenology*. 2000;54:129-36.
7. Darin-Bennett A, White IG. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. *Cryobiology*. 1977;14:466-70.
8. Combes GB, Varner DD, Schroeder F, Burghardt RC, Blanchard TL. Effect of cholesterol on the motility and plasma membrane integrity of frozen equine spermatozoa after thawing. *J Reprod Fertil Suppl*. 2000;56:127-32.
9. Purdy PH, Graham JK. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. *Cryobiology*. 2004;48:36-45.
10. Zahn FS, Papa FO, Dell'Aqua JA. Cholesterol incorporation on equine sperm membrane: effects on post-thaw sperm parameters and fertility. *Theriogenology*. 2002; 58:237-40.
11. Spizziri BE, Fox MH, Bruemmer JE, Squires EL, Graham JK. Cholesterol-loaded-cyclodextrins and fertility potential of stallion's spermatozoa. *Anim Reprod Sci*. 2010; 118:255-64.
12. Loomis PR. The equine frozen semen industry. *Anim Reprod Sci*. 2001;68:191-200.
13. Moran DM, Jasko DJ, Squires EL, Amann RP. Determination of temperature and cooling rate which induce cold shock in stallion spermatozoa. *Theriogenology*. 1992; 38:999-1012.
14. Squires EL, Pickett BW, Graham JK, Vanderwall DK, Mccue PM, Bruemmer JE. Cooled and frozen stallion semen. Colorado: Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, Colorado State University; 1999. Bulletin 9.
15. Graham JK. Cryopreservation of stallion spermatozoa. *Vet Clin North Am Equine Pract*. 1996;12:131-47.
16. Watson PF. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev*. 1995;7:871-91.
17. Kenney RM, Bergmann RV, Cooper WL, Morse G. Minimal contamination techniques for breeding mares: technique and preliminary findings. *Proc Am Assoc Equine Pract*. 1975;21:327-49.
18. Medeiros CMO, Forell F, Oliveira ATD, Rodrigues JL. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology*. 2002;57:327-44.

19. Ball BA, Voss A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential. *J Androl.* 2001;22:1061-9.
20. Bailey JL, Bilodeau JF, Cormier N. Sperm cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *J Androl.* 2000;21:1-7.
21. Moore AI, Squires EL, Graham JK. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. *Cryobiology.* 2005;51:241-9.
22. Hafez ESE, Hafez B. Fisiologia da reprodução animal. In: Hafez ESE, Hafez B. *Reprodução animal.* 2ª ed. São Paulo: Manole; 2004. p.104-26.
23. Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci.* 2000;61:481-92.
24. Watson PF. The effects of cold shock on sperm cell membranes. In: Morris GJ, Clark A. *Effects of low temperatures on biological membranes.* London: Academic Press; 1981. p.189-218.
25. Parks JE, Lynch DV. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology.* 1992;29:255-66.
26. Crockett EL. Cholesterol function in plasma membranes from ectotherms: membrane-specific roles in adaptation to temperature. *Am Zool.* 1998;38:291-304.
27. Guthrie HD, Liu J, Critser JK. Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa. *Biol Reprod.* 2002;67:1811-6.
28. Glazar A, Mullen SF, Liu J, Benson JD, Critser JK, Squires EL, et al. Osmotic tolerance limits and membrane permeability characteristics of stallion spermatozoa treated with cholesterol. *Cryobiology.* 2009;59:201-6.
29. Yeagle PL. Cholesterol and the cell membranes. *Biochim Biophys Acta.* 1985; 822:267-87.
30. Saenger W. Cyclodextrin inclusion compounds in research and industry. *Angew Chem Int Ed Engl.* 1980;19:344-62.
31. Kilsdonk EPC, Yancey PG, Stoudt GW, Wen Bangerter F, Johnson W, Phillips MC, et al. Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. *J Biol Chem.* 1995; 270:17250-6.
32. Choi YH, Toyoda Y. Cyclodextrin removes cholesterol from mouse sperm and induces capacitation in protein-free medium. *Biol Reprod.* 1998;59:1328-33.
33. Oliveira CH, Vasconcelos FA, Souza AO, Martins-Filho MX, Silva FC, Varago MA, et al. Cholesterol addition protects membrane intactness during cryopreservation of stallion sperm. *Anim Reprod Sci.* 2010;118:194-200.

34. Navratil AM, Bliss SP, Berghorn KA, Haughian JM, Farmerie TA, Graham JK, 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.* 2003;278:31593-602.
35. Dobziuk H. Molecules with holes – cyclodextrins. In: *Cyclodextrins and their complexes.* Weinheim: Wiley-VCH; 2006. p.1-30.
36. Klein U, Gimpli G, Fahrenholz F. Alteration of the myometrial plasma membrane cholesterol content with β -cyclodextrin modulates the binding affinity of the oxytocin receptor. *Biochemistry.* 1995;34:13784-93.
37. Gadella BM, Rathi R, Brouwers JFHM, Stout TAE, Colenbrander B. Capacitation and acrosome reaction in equine sperm. *Anim Reprod Sci.* 2001;68:249-65.
38. Yanagimachi R. Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neill JD. *The physiology of reproduction.* New York: Raven Press; 1994. p.189-317.
39. Witte TS, Schäfer-Somi S. Involvement of cholesterol, calcium and progesterone in the induction of capacitation and acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Anim Reprod Sci.* 2007;102:181-93.
40. Demott RP, Suarez SS. Hyperactivated sperm progression in the mouse oviduct. *Biol Reprod.* 1993;46:779-85.
41. Rathi R, Colenbrander B, Bevers MM, Gadella BM. Evaluation of in vitro capacitation of stallion spermatozoa. *Biol Reprod.* 2001;65:462-70.
42. Gadella BM. Sperm membrane physiology and relevance for fertilization. *Anim Reprod Sci.* 2008;107:229-36.
43. Cross NL. Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biol Reprod.* 1998;59:7-11.
44. Flesch FM, Gadella BM. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1469:197-235.
45. Nolan JP, Hammerstedt RH. Regulation of membrane stability and the acrosome reaction in mammalian sperm. *Faseb J.* 1997;11:670-82.
46. Davis BK. Timing of fertilization in mammals: sperm cholesterol/ phospholipid ratio as a determinant of the capacitation interval. *Proc Natl Acad Sci.* 1981;78:7560-4.
47. Mocé E, Purdy PH, Graham JK. Treating ram sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins improves cryosurvival. *Anim Reprod Sci.* 2010;118:236-47.
48. Farshad A, Amidi F, Koohi Khor A, Rashidi A. Effect of cholesterol-loaded-cyclodextrin in presence and absence of egg yolk during freezing step on quality of Markhoz Buck's spermatozoa. *Asian Australas J Anim Sci.* 2011;24:181-9.

49. Torres P, Serres C, Gomez-Cuétera C, Santiago I, Mateos E, Álvarez AL. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on motility and plasma membrane integrity of cooled stallion sperm. *Anim Reprod Sci.* 2006;94:148-51.
50. Kirk ES, Graham JK, Squires EL. Increasing membrane cholesterol content benefits the motility of cooled equine semen. *Anim Reprod Sci.* 2001;68:315-65.
51. Brinsko SP, Love CC, Bauer JE, Machperson ML, Varner DD. Cholesterol-to-phospholipid ratio in whole sperm and seminal plasma from fertile stallions and stallions with unexplained subfertility. *Anim Reprod Sci.* 2007;99:65-71.
52. Moghissi KS, Wallach EE. Unexplained infertility. *Fertil Steril.* 1983;39:5-21.
53. Calvo L, Dennison-Lagos L, Banks SM, Sherins RJ. Characterization and frequency of acrosome reaction among normal and infertile men. *Hum Reprod.* 1994;9:1875-9.
54. Holt WV, North RD. Thermotropic phase transitions in the plasma membrane of ram spermatozoa. *J Reprod Fertil Suppl.* 1986;78:447-57.

Recebido em: 23/08/11

Aceito em: 20/03/12