



## Efeito da adição de ciclodextrina carregada com colesterol sobre a qualidade do sêmen congelado/descongelado de touros adultos da raça Nelore

*Effect of adding cyclodextrin loaded with cholesterol prior to semen frozen/thawed of adult Nelore bulls*

André Giarola Boscarato<sup>1,5</sup>, Leonardo Franco Martins<sup>1</sup>, Rogério Oliveira Pinho<sup>2</sup>, Yamê Fabres Robaina Sancler Silva<sup>3</sup>, Frederico Ozanan Papa<sup>3</sup>, Gustavo Guerino Macedo<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, UNIPAR, Umuarama, Paraná, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Zootecnia, UFV, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

<sup>3</sup>Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil.

<sup>4</sup>Departamento de Medicina Veterinária, UFU, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

<sup>5</sup>Correspondência: andreboscarato@unipar.br

### Resumo

Avaliou-se a hipótese de que a adição de ciclodextrina carregada com colesterol (CCC) ao sêmen *in natura* de touros da raça Nelore, previamente ao processo de criopreservação, melhora os parâmetros de motilidade, morfologia e integridade de membrana no sêmen congelado/descongelado. Foram obtidos por eletroejaculação, cinco ejaculados de cada touro, e fracionados em: grupo controle e adição de 2 mg e 3 mg de CCC para cada  $120 \times 10^6$  espermatozoides. Após 15 minutos de incubação à temperatura ambiente, amostras foram diluídas e submetidas à criopreservação por congelamento. Amostras congeladas/descongeladas foram avaliadas quanto aos aspectos físicos e morfológicos sob microscopia óptica e à cinética espermática pelo sistema CASA (*Computer Assisted Sperm Analysis*). A integridade de membrana foi avaliada pelo teste hiposmótico e colorações supravital e de epifluorescência. Os resultados das análises de morfologia e testes de integridade de membrana plasmática, bem como os valores de motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP) e demais parâmetros avaliados pelo CASA, mostram que não houve diferença ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos. Sendo assim, conclui-se que a adição de CCC ao ejaculado *in natura* de touros da raça Nelore previamente à criopreservação, não melhora os parâmetros de morfologia, integridade de membrana e cinética espermática.

**Palavras-chave:** bovinos, CASA, criopreservação, membrana espermática, viabilidade.

### Abstract

*It was evaluated if the addition of cyclodextrin loaded with cholesterol (CCC) to in natura semen of Nelore bulls prior to the cryopreservation process improves the parameters of membrane motility, morphology and integrity in the frozen / thawed semen. Five ejaculates of each bull were obtained and fractionated in: control group and addition of 2 mg or 3 mg of CCC for each  $120 \times 10^6$  spermatozoa. After 15 minutes of incubation at room temperature, samples were diluted and subjected to cryopreservation. Frozen/thawed samples were evaluated for physical and morphological aspects under optical microscopy and for spermatic kinetics by the CASA system. For the evaluation of the plasma membrane integrity of the frozen / thawed spermatozoa, the hyposmotic test and the supravital and epifluorescent stains were used. The results of the morphology and plasma membrane integrity tests, as well as the values of total motility (MT), progressive motility (MP) and other parameters of sperm kinetics evaluated by CASA, show that there was no statistically significant difference ( $P > 0.05$ ) among the treatments performed. Therefore, it is concluded that the addition of CCC to the in natura ejaculate of Nelore bulls prior to cryopreservation, does not improve parameters of morphology, membrane integrity and sperm kinetics.*

**Keywords:** bovine, CASA, cryopreservation, spermatic membrane, viability.

### Introdução

A integridade da membrana plasmática é fundamental para a sobrevivência e manutenção da viabilidade da célula espermática no trato reprodutivo feminino, garantindo a homeostase celular e a capacidade fertilizante (Graham e Mocé, 2005). Durante o processo de criopreservação, a célula espermática é submetida a estresse térmico, mecânico, químico e osmótico, que induzem a ocorrência de danos à membrana celular, decorrentes da desestabilização da bicamada lipídica que a constitui (Morris et al., 2012). Esta desestabilização ocorre à medida que a temperatura é diminuída e a membrana sofre uma transição de fase, a partir da fase fluida para a fase de gel (Purdy e Graham 2004a; Graham e Mocé, 2005). O grau de fluidez da membrana depende da temperatura e da relação entre os níveis de ácidos graxos saturados (colesterol) e insaturados (fosfolipídeos) (Lehninger et al., 2005).



Perda de colesterol da membrana plasmática de células criopreservadas tem sido relatada em suínos (50%) e garanhões (28%) (Moore et al., 2005), e esta pode causar uma capacitação prematura, reduzindo a viabilidade de espermatozoides criopreservados no trato reprodutivo feminino (Mocé et al., 2010a).

O colesterol pode ser facilmente incorporado ou extraído das membranas plasmáticas das células usando ciclodextrinas (Moore et al., 2005). As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos compostos por seis ( $\alpha$ -ciclodextrina), sete ( $\beta$ -ciclodextrina) ou oito ( $\gamma$ -ciclodextrina) unidades de glicopiranosose unidas por ligações  $\alpha$ - (1,4), cujas moléculas se caracterizam por ter uma superfície externa hidrofílica e uma cavidade interna lipofílica (Banchero et al., 2013).

Aumento das taxas de sobrevivência a criopreservação foi encontrado em equinos (Spizziri et al., 2010), bovinos (Purdy e Graham, 2004b), ovinos (Mocé et al., 2010b) caprinos (Farshad et al. 2011) e suínos (Tomás et al. 2013) pela adição de diferentes concentrações de colesterol durante o processo de criopreservação.

O propósito deste estudo foi testar a hipótese de que a incubação do sêmen *in natura* de touros da raça Nelore com ciclodextrina carregada com colesterol (CCC), previamente ao processo de criopreservação, melhora a viabilidade do sêmen congelado/descongelado.

Dessa forma, objetivou-se avaliar o efeito dos tratamentos com CCC sobre a integridade de membrana e parâmetros de motilidade espermática.

### Material e métodos

O experimento foi realizado durante os meses de setembro a novembro de 2014, no Laboratório de Reprodução Animal do Hospital Veterinário da Universidade Paranaense (UNIPAR), localizado no município de Umuarama, Paraná, Brasil, e na Fazenda Experimental desta mesma instituição, localizada na Latitude 23°42'57.15"S e Longitude 53°12'50.68"O, no município de Maria Helena, Paraná, Brasil. Todos os procedimentos realizados durante o experimento foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Experimentação Animal da Universidade Paranaense, sob protocolo nº 24780/2013.

A preparação da Metil- $\beta$ -ciclodextrina (Sigma Aldrich<sup>®</sup>, EUA) carregada com colesterol (Sigma Aldrich<sup>®</sup>, EUA) foi realizada de acordo com a metodologia de Purdy e Graham (2004a). Em um tubo de vidro previamente esterilizado foram dissolvidos 200 mg de colesterol em 1 mL de clorofórmio e, em outro tubo, foi dissolvido 1 g de metil- $\beta$ -ciclodextrina em 2 mL de metanol. Em seguida, uma alíquota de 0,45 mL da solução de colesterol e clorofórmio foi adicionada à solução de ciclodextrina e homogeneizada até clarear a solução. Posteriormente, a solução foi acondicionada em uma placa de *petri* de vidro previamente esterilizada e os solventes removidos por evaporação usando placa aquecedora à temperatura de 40°C por um período de 30 horas, mantidos em capela de fluxo laminar horizontal. Os cristais resultantes da solução foram removidos da placa por raspagem com auxílio de uma lâmina de bisturi servindo como espátula e estocados em um tubo de vidro estéril à temperatura ambiente. A solução de trabalho de ciclodextrina carregada com colesterol (CCC) foi preparada pela adição de 50 mg de CCC em 1 mL de meio TRIS (3,78g TRIS-hidroxiaminometano, 2,11 ácido cítrico, 1,22g frutose) a 37°C com posterior homogeneização com auxílio de um agitador. Esta solução foi acondicionada em tubos para microcentrifuga de 1,5 mL (Eppendorf<sup>®</sup>) e mantida congelada a -80°C, sendo reaquecida a 37°C em banho-Maria e homogeneizada antes de sua utilização.

Foram utilizados três touros adultos da raça Nelore com idade média de três anos criados em condições extensivas na Fazenda Experimental da Unipar, em pastagem de *Urochloa sp.* com água e suplementação mineral disponíveis à vontade. Os animais foram considerados aptos à reprodução ao exame andrológico realizado previamente ao experimento, conforme parâmetros preconizados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013). Por meio de eletroejaculação, foram obtidos cinco ejaculados de cada um dos três touros, com intervalo de cinco dias entre cada coleta, totalizando quinze partidas de sêmen criopreservadas.

A avaliação das características físicas do ejaculado, conforme o CBRA (CBRA, 2013), consistiu na análise dos seguintes parâmetros: volume, aspecto, coloração, turbilhonamento, motilidade espermática progressiva retilínea, vigor e concentração espermática. Neste experimento, foram considerados aptos à criopreservação somente os ejaculados que apresentassem aspecto leitoso, vigor mínimo de três e motilidade mínima de 70%.

Em um tubo contendo 2 mL de solução formol-salina tamponada foi adicionada uma alíquota de 10  $\mu$ L do ejaculado, obtendo-se uma diluição de 1:200, a qual foi utilizada para determinação da concentração espermática por meio do método hematocimétrico em câmara de Neubauer (CBRA, 2013). Com base nos valores da concentração (espermatozoides/mL), o ejaculado foi subdividido em três tubos cônicos, correspondentes aos três tratamentos realizados: controle sem adição de CCC e adição de 2 mg ou 3 mg de CCC para cada 120 x 10<sup>6</sup> espermatozoides, correspondendo respectivamente a 100 e 150  $\mu$ L da solução de CCC. Após a adição de CCC, foi feita homogeneização manual e os tubos foram mantidos por um período de incubação de 15 minutos à temperatura ambiente, período necessário para que ocorresse a incorporação do colesterol à membrana plasmática do espermatozoide sem que ocorra interação com a gema de ovo contida no diluente



comercial utilizado, conforme protocolo utilizado por Purdy e Graham (2004a). Neste experimento, optou-se pela utilização de um meio diluente comercial para sêmen bovino (Botubov<sup>®</sup>, Botucatu, Brasil), visando incorporar melhores resultados na congelação espermática à praticidade da utilização de um meio diluente acessível e previamente preparado.

Logo após a adição do meio diluente, o sêmen foi envasado em palhetas de polietileno de 0,25 mL (IMV<sup>®</sup>, L'Aigle, França) com 30 milhões de espermatozoides totais, que foram congeladas conforme protocolo sugerido por Gonçalves et al. (2008). Foram utilizadas quatro horas de período de equilíbrio a temperatura de 5°C em caixa para transporte refrigerado de sêmen (Botuflex<sup>®</sup>, Botucatu, Brasil) (Chacur et al., 2012) e 15 minutos a -120°C (vapor de nitrogênio líquido) para posterior submersão em nitrogênio líquido (-196°C).

Após o congelamento de cada partida, foram verificados os parâmetros espermáticos pós-descongelação, sendo incluídas no experimento somente aquelas que apresentaram após o descongelamento no mínimo 30% de motilidade espermática progressiva retilínea e três de vigor espermático, conforme padrão preconizado pelo CBRA (CBRA, 2013) para sêmen congelado/descongelado avaliado em microscopia óptica. A motilidade do sêmen *in natura* foi determinada pelo método subjetivo, enquanto que a motilidade das amostras de sêmen congelado/descongelado foram determinadas pelo método assistido por computador.

Amostras de cada partida foram descongeladas para realização dos testes hiposmótico (Martins et al. 2011), colorações supravital (Kaka et al., 2014) e fluorescente (Harrison e Vickers, 1990), análise morfológica do sêmen (CBRA, 2013) e análise espermática assistida por computador com o software HTMA IVOS-12 (CASA, Hamilton Thorn Research IVOS-12, Beverly, USA).

Para a análise estatística dos dados foi utilizado o *software* SAEG, versão 9.1.(SAEG-UFV, 2007). Análises descritivas por meio das determinações das médias e desvios-padrão foram feitas para todas as características estudadas. O teste de Lilliefors foi utilizado para verificação de normalidade das respostas das variáveis estudadas, exceto para as variáveis não paramétricas (turbilhonamento, vigor e motilidade) avaliadas em microscopia óptica, onde foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis (5%). A homogeneidade das variâncias entre grupos de tratamentos foi estudada utilizando-se o teste de Cochran-Bartlett. A análise de variância foi utilizada para avaliar o efeito dos touros nos aspectos físicos e morfológicos e testes complementares (Hiposmótico e Supravital) do sêmen *in natura* e o efeito da adição da ciclodextrina carregada com colesterol nos aspectos físicos e morfológicos e testes complementares (Hiposmótico, Supravital e Coloração de Epifluorescência) no sêmen congelado/descongelado. As variáveis da cinética espermática mensuradas pelo CASA foram submetidas a análise de variância para se avaliar o efeito dos tratamentos. Quando detectado efeito pelo teste F, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey (5%).

## Resultados e Discussão

Todos os ejaculados apresentaram parâmetros dentro da normalidade em relação aos aspectos físicos e morfológicos do sêmen *in natura*, estando de acordo com o preconizado pelo CBRA (2013) em relação aos pré-requisitos para o processo de criopreservação (Tab. 1). O percentual de defeitos espermáticos encontrados no sêmen *in natura* foi normal para touros adultos da raça Nelore (Freneau, 2011).

Tabela 1. Valores médios e desvios-padrão dos aspectos físicos e morfológicos dos ejaculados *in natura* de touros Nelore (n = 5).

Touro	Mot	Turb	Vigor	Conc	Maiores	Menores	Totais
1	78 + -8,3	2,2 + -0,83	3	595 + -187,14	10,6 + -4,6	0,6 + -0,89	11,2 + -4,38
2	84 + -5,4	2,6 + -0,54	3	998 + -239,23	17,2 + -3,89	1,2 + -0,83	18,4 + -4,66
3	86 + -5,47	3,2 + -0,83	3	997 + -385,70	18,8 + -2,58	2,8 + -2,16	21,6 + -1,81
Média geral	82,6 + -7,03	2,6 + -0,81	3	863,33 + -327,7	15,53 + -5,09	1,53 + -1,64	17 + -5,73

Não houve diferença entre os tratamentos controle, adição de 2 mg ou 3 mg de CCC para cada 120 x 10<sup>6</sup> espermatozoides (P > 0,05), ao analisar os resultados das análises de morfologia e dos testes de integridade de membrana plasmática, bem como para os valores de motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP) e demais parâmetros de cinética espermática avaliados pelo CASA (Tab. 2).



Tabela 2. Valores médios e desvios-padrão das variáveis estudadas no sêmen congelado/descongelado de touros Nelore, submetidos ao tratamento controle, adição de 2mg ou 3mg de Ciclodextrina carregada com colesterol para cada  $120 \times 10^6$  espermatozoides

Características	Concentração CCC (mg)		
	Controle	2	3
Morfologia espermática			
DEFM	21,5 ± 9,9 <sup>a</sup>	23,2 ± 7,4 <sup>a</sup>	22,2 ± 8,8 <sup>a</sup>
DEFMEN	2,0 ± 2,6 <sup>a</sup>	2,1 ± 2,0 <sup>a</sup>	1,7 ± 1,8 <sup>a</sup>
DEFT	23,5 ± 10,8 <sup>a</sup>	25,3 ± 7,4 <sup>a</sup>	24,0 ± 9,6 <sup>a</sup>
Testes de integridade de membrana plasmática			
Supravital (%)	53,0 ± 11,3 <sup>a</sup>	54,8 ± 7,8 <sup>a</sup>	55,1 ± 9,5 <sup>a</sup>
Hiposmótico (%)	33,9 ± 10,2 <sup>a</sup>	30,6 ± 7,4 <sup>a</sup>	30,9 ± 8,0 <sup>a</sup>
Fluorescência (%)	27,1 ± 7,9 <sup>a</sup>	28,2 ± 5,7 <sup>a</sup>	29,1 ± 6,5 <sup>a</sup>
Cinética espermática pelo sistema CASA			
MT (%)	61,1 ± 11,8 <sup>a</sup>	64,2 ± 13,5 <sup>a</sup>	63,7 ± 11,6 <sup>a</sup>
MP (%)	45,8 ± 9,7 <sup>a</sup>	48,8 ± 10,2 <sup>a</sup>	49,4 ± 8,4 <sup>a</sup>
RAP (%)	56,0 ± 12,3 <sup>a</sup>	60,7 ± 14,5 <sup>a</sup>	60,2 ± 13,1 <sup>a</sup>
VSL (µm/s)	70,7 ± 4,9 <sup>a</sup>	71,8 ± 2,9 <sup>a</sup>	71,2 ± 3,8 <sup>a</sup>
VCL (µm/s)	137,8 ± 13,9 <sup>a</sup>	137,3 ± 10,2 <sup>a</sup>	131,6 ± 8,6 <sup>a</sup>
VAP (µm/s)	85,2 ± 7,6 <sup>a</sup>	86,1 ± 5,2 <sup>a</sup>	84,0 ± 6,3 <sup>a</sup>

Letras iguais na mesma linha indicam não haver diferença estatística (Anova -  $P > 0,05$ ); Média ± dp = Média e desvio padrão; DEFM: % de defeitos maiores; DEFMEN: % de defeitos menores; DEFT: % de defeitos totais; CASA: Computer-assisted Sperm Analysis; MT= Motilidade Total; MP= Motilidade progressiva; RAP= Porcentagem de espermatozoides rápidos; VSL= velocidade linear progressiva, VCL= Velocidade curvilinear, VAP= Velocidade média de trajeto.

A morfologia espermática possui alta correlação com a fertilidade (Arruda et al. 2011), portanto deve ser sempre considerada quando se propõe novas técnicas que visem melhorar este aspecto. Estudos anteriores em que foram adicionadas diferentes concentrações de colesterol à membrana espermática tanto em bovinos (Purdy e Graham, 2004b; Mocé e Graham, 2006) como em outras espécies (Tomas et al. 2013; Mocé et al. 2010b; Spizziri et al., 2010), não trazem dados referentes à morfologia. Neste estudo, foi observado que a adição de colesterol, independentemente da concentração, não foi capaz de reduzir quantitativa ou qualitativamente os defeitos nas células espermáticas submetidas ao processo de criopreservação. Isto se deve ao fato de que provavelmente, maiores concentrações de colesterol favoreçam as espermatogônias na fase inicial de gametogênese, sendo necessária durante a meiose e diferenciação dos espermatócitos (Schenk e Hoeger, 2010), não havendo, portanto, efeito após a espermição. Porém, alguns defeitos são adquiridos durante o trânsito epididimário ou ainda pela manipulação do sêmen. Sendo assim, novas observações são necessárias para uma melhor compreensão desta hipótese.

Parâmetros de cinética espermática como MT e MP possuem grande correlação com a fertilidade, juntamente com a viabilidade avaliada por testes de integridade de membrana (Purdy e Graham, 2004a; Mocé e Graham, 2006; Chacur et al., 2012; Kaka et al., 2014), que fornecem informações valiosas sobre a integridade estrutural e atividade bioquímica da membrana, e possuem alta correlação com a viabilidade da célula espermática.

Como descrito anteriormente, não houve diferença significativa entre os tratamentos em relação aos testes de integridade de membrana e análise de cinética espermática quando se comparou os grupos tratados com o grupo controle, diferentemente do encontrado por Mocé e Graham (2006). Estes autores, utilizando touros da raça Holandesa, ao analisar a viabilidade espermática por citometria de fluxo, observaram melhora estatisticamente significativa com a adição de 2 mg de CCC para cada  $120 \times 10^6$  espermatozoides ao sêmen fresco não diluído previamente à criopreservação. Porém, não observaram interferência sobre a MT e MP, corroborando com os resultados encontrados neste trabalho.

Purdy e Graham (2004b), utilizando também sêmen de animais da raça Holandesa, obtiveram melhora significativa nos parâmetros de motilidade e viabilidade espermática, entretanto não observaram diferença significativa em testes de fertilidade *in vitro* e *in vivo* utilizando sêmen acrescido de 1,5 mg de CCC para cada  $120 \times 10^6$  espermatozoides.

Esta divergência de resultados sugere que a adição de colesterol nem sempre melhora os parâmetros em questão, e, mesmo quando isso ocorre, não implica em aumento de fertilidade da célula espermática, apesar da



viabilidade e cinética espermática serem relevantes na determinação do potencial de fertilidade dos espermatozoides (Verstegen et al., 2002; Aman e Waberski, 2014).

Como previamente estabelecido, a variação na composição lipídica da membrana espermática pode gerar respostas divergentes frente a um mesmo tratamento com colesterol (Tomás et al., 2013). Portanto, a resposta aos tratamentos com colesterol poderá ser diferente entre espécies, raças e até mesmo indivíduos (Mocé et al., 2010a).

Desta forma, novos estudos devem ser conduzidos para verificar-se a interação entre o perfil lipídico de espermatozoides de diferentes raças e/ou espécies com a resposta aos tratamentos com a adição de colesterol à membrana espermática, uma vez que o presente estudo foi o único a utilizar animais zebuínos, e obter resultados divergentes daqueles descritos na literatura, utilizando animais taurinos.

### Conclusão

Conclui-se que a adição de CCC ao ejaculado *in natura* de touros da raça Nelore previamente à criopreservação, nas concentrações testadas, não melhorou os parâmetros de morfologia, integridade de membrana e cinética espermática.

### Referências

- Aman RP, Waberski D. Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology*, v.81, p.05-17, 2014.
- Arruda RP, Celeghini ECC, Alonso MA, Carvalho HF, Oliveira LZ, Nascimento J, Silva DF, Affonso FJ, Lemes KM, Dueñez Jaimes J. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. *Rev Bras Reprod Anim*, v.35, p.145-151, 2011.
- Banchero M, Ronchetti S, Manna L. Characterization of Ketoprofen/Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin complexes prepared using supercritical carbon dioxide. *Journal of Chemistry*, v.2013, p.1-8, 2013.
- Chacur MGM, Dias HS, Papa PM, Papa FO, Melo-Onã CM. Effect of refrigeration systems upon frozen bull sperm viability assessed by computer-assisted sperm analysis and fluorescent probes. *Semina: Ciências Agrárias*, v.33, p.1923-1930, 2012.
- Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA). Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. CBRA. 3ed. Belo Horizonte, MG, 2013, 104p.
- Farshad A, Amidi F, Khor AK, 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-australasian Journal of Animal Sciences*, v.24, p.181-189, 2011.
- Freneau G E. Aspectos da morfologia espermática em touros. *Rev Bras Reprod Anim*, v.35, p.160-170, 2011.
- Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. 2. ed. São Paulo, SP: Editora Roca, 2008.
- Graham JK, Mocé E. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. *Theriogenology*, v.64, p.492-504, 2005.
- Harrison RA, Vickers SE. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J Reprod Fert*, v.88, p.343-52, 1990.
- Kaka A, Wahid H, Rosnina Y, Yimer N, Khumran AM, Sarsaifi K, Behan AA, Kaka U, Ebrahimi M.  $\alpha$ -Linolenic acid supplementation in BioXcell® extender can improve the quality of post-cooling and frozen-thawed bovine sperm. *Anim Reprod Sci*, 2014.
- Lehninger AL, Nelson, DL, Cox, MM. Princípios de Bioquímica. 4ed. São Paulo, SP: Editora Sarvier. 2005.1120p.
- Martins LF, Pinho RO, Paraizo RM, RR Oliveira, EF Castilho, Guimarães JD. Avaliação de diferentes osmolaridades de soluções hiposmóticas e tempos de incubação no teste hiposmótico do semen de touros Nelore. *Rev Bras Zootec*, v.40, p.1519-1525, 2011.
- Mocé E, Graham JK. Cholesterol-loaded cyclodextrins added to fresh bull ejaculates improve sperm cryosurvival. *J Anim Sci*, v.84, p.826-833, 2006.
- Mocé E, Blanch E, Tomás C, Graham JK. Use of cholesterol in sperm cryopreservation: present moment and perspectives to future. *Reprod Domest Anim*, v.45, p.57-66, 2010a
- Mocé E, Purdy PH, Graham JK. Treating ram sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins improves cryosurvival. *Anim Reprod Sci*, v.118, p.236-247, 2010b.
- Moore AI, Squires EL, Graham JK. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. *Cryobiology*, v.51, p.241-249, 2005.
- John Morris G, Acton E, Murray BJ, Fonseca F. Freezing injury: The special case of the sperm cell. *Cryobiology*, v.64, p.71-78, 2012.
- Purdy, PH, Graham, JK. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. *Cryobiology*, v.48, p.36-45, 2004a.



**Purdy PH, Graham, JK.** Effect of adding cholesterol to bull sperm membranes on sperm capacitation, the acrosome reaction, and fertility. *Biol Reprod*, v.71, p.522-527, 2004b.

**Sistema de análise estatística e genética (SAEG).** SAEG versão 9.1. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, Central de Processamento de Dados, p.68, 2007.

**Schenk, S, Hoeger, U.** Lipid accumulation and metabolism in polychaete spermatogenesis: Role of the large discoidal lipoprotein. *Molecular Reproduction and Development*, v.77, p.710-719, 2010.

**Spizziri BE, Fox MH, Bruemmer JE, Squires EL, Graham JK.** Cholesterol-loaded-cyclodextrins and fertility potential of stallions spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, v.118, p.255-264, 2010.

**Tomás C, Blanch E, Hernández M, Gil MA, Roca J, Vázquez JM, Martínez EA, Mocé E.** Treating boar sperm with cholesterolloaded cyclodextrins widens the sperm osmotic tolerance limits and enhances the in vitro sperm fertilising ability. *Anim Reprod Sci*, v.129, p.209-220, 2011.

**Tomás C, Blanch E, Cebrián B, Mocé E.** *In vivo* fertilising ability of frozen-thawed boar sperm treated with cholesterol-loaded cyclodextrins prior to cryopreservation. *Anim Reprod Sci*, v.140, p.77-82, 2013.

---