



Uso de colesterol carregado por ciclodextrina na criopreservação de sêmen

Use of cholesterol loaded cyclodextrin for semen cryopreservation

B.W. Freitas¹, J.D. Guimarães, C.O. Silveira, L.L. Bezerra, P.P. Maitan

Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil.

¹Correspondência: bruna.waddington@gmail.com

Resumo

Os efeitos deletérios causados às células espermáticas pela criopreservação ocorrem por esse procedimento alterar a arquitetura estrutural da membrana plasmática, prejudicando a sobrevivência espermática pós-descongelamento. Em razão disso, novas estratégias têm sido pesquisadas a fim de minimizar os danos celulares inerentes ao choque térmico ocasionado no processamento do sêmen, entre as quais a incorporação do colesterol à membrana plasmática por ciclodextrina. Trata-se de uma técnica alternativa e que vem apresentando, *in vitro*, resultados promissores para ejaculados com baixa viabilidade pós-descongelamento devido a modificações na fluidez e na permeabilidade da membrana plasmática, incrementando a tolerância aos choques térmico e osmótico. Porém, as taxas de prenhez obtidas a campo ainda se apresentam insatisfatórias, possivelmente em razão de alguma interferência da alta proporção de colesterol sobre o processo fisiológico de capacitação espermática e de reação acrossomal, fundamentais para a ocorrência de fertilização. Na presente revisão, serão abordados aspectos relacionados ao uso de ciclodextrinas como carreadoras de colesterol previamente ao congelamento de sêmen.

Palavras-chave: ciclodextrina, colesterol, criopreservação, membrana plasmática, sêmen.

Abstract

The deleterious effects of seminal cryopreservation on sperm cells alter the structural architecture of the plasma membrane decreasing the survival of the sperm after thawing. As a result, new strategies have been researched in order to minimize the cell damage related to the thermal shock of semen processing, such as cholesterol-loaded cyclodextrins. This is an alternative technique that has shown, in vitro, promising results for ejaculated with low viability after thawing due to the modifications on the fluidity and permeability of the plasma membrane, increasing the tolerance to thermal and osmotic shock. However, the pregnancy rates at the field remain unsatisfactory, possibly due to some interference of high proportion of cholesterol on the physiological process of sperm capacitation and acrosome reaction, essential for the occurrence of fertilization. This review will discuss some aspects related to the use of cyclodextrins as cholesterol carriers previously to semen cryopreservation process.

Keywords: cholesterol, cryopreservation, cyclodextrin, plasma membrane, sperm.

Introdução

A sensibilidade espermática ao processo de criopreservação é associada à composição dos lipídeos da membrana plasmática, principalmente em relação à proporção colesterol:fosfolípídeo, a qual influencia diretamente a sua fluidez e estabilidade (Graham e Foote, 1987). Além da baixa relação colesterol:fosfolípídeo, estudos demonstram que a criopreservação leva à redução do conteúdo de colesterol da membrana plasmática (Cerolini et al., 2001; Moore et al., 2005; Srivastava et al., 2013), ocasionando o fenômeno denominado criocapacitação, que reduz a viabilidade espermática pós-descongelamento (Bailey et al., 2000).

Visando melhorar a condição do espermatozoide no pré-congelamento, diversos estudos têm sido conduzidos com o intuito de incrementar o conteúdo de colesterol nas membranas espermáticas. A incubação de espermatozoides com colesterol carregado por ciclodextrinas antes da criopreservação proporciona aumento na motilidade total e progressiva (Madison et al., 2013; Hartwig et al., 2014), na viabilidade espermática (Pamornsakda et al., 2011; Murphy et al., 2014), na redução de lesões nas membranas plasmática (Moore et al., 2005) e acrossomal (Oliveira et al., 2010) e da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS; Murphy et al., 2014). Tais benefícios são relacionados a modificações na fluidez e permeabilidade da membrana plasmática à água (Müller et al., 2008) e aos crioprotetores (Li et al., 2006; Glazar et al., 2009), o que promove aumento na tolerância ao choque osmótico (Aksoy et al., 2010).

Nesta revisão, serão abordados aspectos referentes à criopreservação seminal e à utilização das ciclodextrinas correadoras de colesterol nesse procedimento.



Congelamento de sêmen

O congelamento de sêmen foi desenvolvido de forma empírica há cerca de 65 anos e continua baseado essencialmente no mesmo modelo proposto desde o seu advento. Historicamente, os danos causados pela criopreservação são explicados de acordo com duas hipóteses (Mazur, 1970): células resfriadas abruptamente são mortas em razão da formação de gelo intracelular, enquanto as células resfriadas lentamente são mortas em razão da exposição prolongada a soluções concentradas, o que resulta em desidratação celular (Mazur, 1970). Devido a isso, a criopreservação é um procedimento reconhecidamente deletério para as células espermáticas por reduzir sua sobrevivência e, por consequência, seu potencial fertilizante (Yeste et al., 2014b). Essa redução na fertilidade ocorre pelo impacto do processo de congelamento/descongelamento sobre a integridade da membrana plasmática e por outros parâmetros funcionais (Watson, 2000). Além disso, ocorrem variações entre indivíduos e ejaculados em relação à tolerância espermática ao congelamento, tanto na espécie equina (Tischner, 1979) como em outras espécies (Casas et al., 2009; Yeste et al., 2013, 2104a).

Antes de se dar início ao processo de congelamento, faz-se necessário o resfriamento do sêmen. À medida que a temperatura diminui (até 5°C), a membrana espermática passa por uma fase transitória do estado líquido para o gel (Amann e Pickett, 1987). Cada tipo de lipídeo passa pela fase de transição numa determinada temperatura: com isso, a membrana, que é composta por vários tipos de lipídeos diferentes, passa pela fase de transição ao longo de uma variação relativamente ampla de temperatura. No estado gel, as cadeias de fosfolipídeo alongam-se, o que resulta em membrana mais ordenada onde os movimentos lipídico e proteico ficam restritos (Amann e Pickett, 1987). Além disso, as proteínas integrais são excluídas dos domínios cristalinos no interior da membrana, de modo que muitas interações entre proteínas e lipídeos são perdidas, e aglomerados proteicos se formam nos domínios lipídicos líquidos remanescentes. Como resultado dessas alterações, a membrana torna-se instável, e sua funcionalidade é perdida (Amann e Pickett, 1987), culminando com extravasamento de conteúdo intracelular (Drobnis et al., 1993) e consequente redução do metabolismo celular. Os danos causados nessa fase são irreversíveis e culminam com o denominado choque térmico (Amann e Graham, 1993). As principais alterações provenientes dessa condição são o aumento do movimento circular, rápida queda da motilidade e danos nas membranas plasmática e acrossomal (Graham, 1996).

Tanto a relação colesterol:fosfolipídeo quanto o conteúdo de ácidos graxos insaturados que compõem a cadeia fosfolipídica são determinantes da fluidez da membrana (Amann e Pickett, 1987). Aquelas espécies cujos espermatozoides possuem membrana plasmática com maiores concentrações de ácidos graxos insaturados e alta relação colesterol:fosfolipídeo são conhecidas como resistentes ao choque térmico, que é o caso de espermatozoides de humanos, coelhos e galos (Watson, 1981). Isso ocorre porque o colesterol estabiliza a membrana, em virtude da sua interação com as cadeias de ácidos graxos (Watson, 1981), e mantém um arranjo lamelar aleatório de fosfolipídeos em temperaturas reduzidas (Amann e Pickett, 1987), ajudando a minimizar ou eliminar a fase de transição (Graham e Foote, 1987).

Diante disso, foi sugerido que a inclusão de colesterol ao meio diluidor aumentaria a viabilidade e a longevidade de espermatozoides (White, 1993). Estudos relativos à utilização de lipossomas visando solubilizar o colesterol para incorporá-lo à membrana apresentaram resultados variados (Parks et al., 1981; Ollero et al., 1996; Wilhelm et al., 1996). As ciclodextrinas têm sido, então, utilizadas para inserção ou remoção de colesterol de membranas biológicas ou sintéticas (Mocé et al., 2010).

Ciclodextrinas como carreadoras de colesterol

As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos obtidos pela degradação enzimática do amido e possuem caráter anfipático por apresentarem face externa hidrofílica e uma cavidade interna hidrofóbica (Dobziuk, 2006) que pode encapsular compostos insolúveis, tais como o colesterol. Essas moléculas possuem elevada afinidade para os esteróis e, em condições *in vitro*, são eficientes na remoção de colesterol das membranas de muitos tipos celulares (Christian et al., 1997), incluindo espermatozoides (Visconti et al., 1999; Companyó et al., 2007). Além disso, se forem pré-carregadas com o colesterol, podem inseri-lo em membranas celulares (Navratil et al., 2003).

As formas mais comuns de ciclodextrina possuem de seis a oito unidades glicosídicas, designadas alfa, beta ou gama ciclodextrinas (Saenger, 1980). Destas, a β -ciclodextrina é a que apresenta maior afinidade por compostos lipídicos, especialmente o colesterol (Yancey et al., 1996; Christian et al., 1997). No entanto, a adição de grupamentos metil à molécula da ciclodextrina aumenta tanto sua solubilidade em água quanto sua capacidade de solubilizar compostos hidrofóbicos (Yancey et al., 1996). A incorporação de colesterol à metil- β -ciclodextrina apresenta melhores resultados quanto à motilidade espermática quando comparada a outros tipos de ciclodextrinas (Graham, 1998; Combes et al., 2000), embora a 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina tenha sido efetiva em espermatozoides de ovinos (Mocé et al., 2010).

As concentrações utilizadas na incubação de espermatozoides com ciclodextrinas variam entre 1 e 2 mg / $1,2 \times 10^8$ espermatozoides, para a maioria das espécies (Purdy e Graham, 2004; Moore et al., 2005; Mocé e Graham, 2006; Purdy et al., 2010), e a incubação à temperatura ambiente por 15 minutos é suficiente para a inclusão do colesterol à membrana espermática, embora em alguns estudos a incubação tenha sido realizada por



mais de três horas e/ou em temperaturas mais elevadas (Purdy e Graham, 2004; Mocé e Graham, 2006; De Graaf et al., 2007). No entanto, é importante que a incubação seja feita em meio livre de gema de ovo ou de leite desnatado, uma vez que esses componentes interferem na transferência do colesterol para a membrana espermática (Combes et al., 2000; Purdy e Graham, 2004).

O tratamento de espermatozoides com ciclodextrina carregada com colesterol tem se mostrado eficiente na incorporação do colesterol na membrana plasmática, por aumentar seu conteúdo em duas a três vezes em espermatozoides de bovinos, garanhões e ovinos (Purdy e Graham, 2004; Moore et al., 2005; Mocé et al., 2010). Além disso, a incubação de sêmen ovino e suíno com esse aditivo exerceu efeito benéfico contra choque por frio (Morrier et al., 2004; Galantino-Homer et al., 2006) e reduziu a fosforilação da tirosina, bem como a reação acrossomal, além de melhorar a viabilidade celular (Bailey et al., 2008).

De maneira geral, o tratamento com ciclodextrina carregada com colesterol antes da criopreservação melhora as taxas de sobrevivência espermática avaliadas por motilidade e viabilidade (Purdy e Graham, 2004; Moore et al., 2005; Mocé e Graham, 2006; Mocé et al., 2010). Embora o incremento observado nessas características seja variável entre os estudos, a maioria dos autores relata aumentos de 10 a 20%.

Considerações finais

A utilização de aditivos no congelamento de sêmen de diversas espécies tem sido alvo de pesquisa em diversos centros de estudo de reprodução animal. Embora as pesquisas acerca da ciclodextrina apresentem resultados ainda pouco satisfatórios, as evidências sobre a modificação da fluidez de membrana e a possibilidade de melhoria nas taxas de capacitação de espermatozoides descongelados são indícios de que a técnica pode ser aperfeiçoada para alcançar maior efetividade. A combinação desse tipo de aditivo com outros e até mesmo diferentes crioprotetores deve ser verificada, a fim de beneficiar ainda mais os resultados observados tanto *in vitro* quanto *in vivo*, visando à obtenção de concentração de colesterol suficiente para proteção da membrana espermática contra os efeitos deletérios ocasionados pela criopreservação, sem, entretanto, prejudicar os processos de capacitação espermática e reação acrossomal necessários para a fertilização.

Referências

- Aksoy M, Akman O, Lehimcioglu NC, Erdem H.** Cholesterol-loaded cyclodextrin enhances osmotic tolerance and inhibits the acrosome reaction in rabbit spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, v.120, p.166-172, 2010.
- Amann RP, Graham JK.** Spermatozoal function. In: Mckinnon AO, Voss JL (Ed.). *Equine reproduction*. Malvern: Lea & Fabiger, 1993. p.715-745.
- Amann RP, Pickett BW.** Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *J Equine Vet Sci*, v.7, p.145-173, 1987.
- Bailey JL, Bilodeau JF, Cormier N.** Sperm cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *J Androl*, v.21, p.1-7, 2000.
- Bailey JL, Lessard C, Jacques J, Bréque C, Dobrinski I, Zeng W, Galantino-Hommer HL.** Cryopreservation of boar semen and its future importance to the industry. *Theriogenology*, v.70, p.1251-1259, 2008.
- Casas I, Sancho S, Briz M, Pinart E, Bussalleu E, Yeste M, Bonet S.** Freezability prediction of boar ejaculates assessed by functional sperm parameters and sperm proteins. *Theriogenology*, v.72, p.930-948, 2009.
- Cerolini S, Maldjian A, Pizzi F, Gliozzi TM.** Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Reproduction*, v.121, p.395-401, 2001.
- Christian AE, Haynes MP, Phillips MC, Rothblat GH.** Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. *J Lipid Res*, v.38, p.2264-2272, 1997.
- 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*, n.56, p.127-132, 2000.
- Companyó M, Iborra A, Villaverde J, Martínez P, Morros A.** Membrane fluidity changes in goat sperm induced by cholesterol depletion using beta-cyclodextrin. *Biochim Biophys Acta*, v.1768, p.2246-2255, 2007.
- De Graaf SP, Evans G, Gillan L, Guerra MM, Maxwell WM, O'Brien JK.** The influence of antioxidant, cholesterol and seminal plasma on the *in vitro* quality of sorted and nsorted ram spermatozoa. *Theriogenology*, v.67, p.217-227, 2007.
- Dobziuk H.** Molecules with holes – cyclodextrins. In: Dodziuk H. (Ed.). *Cyclodextrins and their Complexes: Chemistry, Analytical Methods, Applications*. Weinheim: Wiley, 2006. p.1-30.
- Drobnis EZ, Crowe LM, Berger T, Anchoroguy TJ, Overstreet JW, Crowe JH.** Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. *J Exp Zool*, v.265, p.432-437, 1993.
- Galantino-Homer HL, Zeng WX, Megee SO, Dallmeyer M, Voelkl D, Dobrinski I.** Effects of 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin and cholesterol on porcine sperm viability and capacitation status following cold shock or incubation. *Mol Reprod Dev*, v.73, p.638-650, 2006.



- Glazar AI, Mullen SF, Liu J, Benson JD, Critser JK, Squires EL, Graham JK.** Osmotic tolerance limits and membrane permeability characteristics of stallion spermatozoa treated with cholesterol. *Cryobiology*, v.59, p.201-206, 2009.
- Graham JK.** Cryopreservation of stallion spermatozoa. *Vet Clin North Am Equine Pract*, v.12, p.131-147, 1996.
- Graham JK.** Sperm physiology: response to freezing & analysis of sperm function. In: Annual Meeting of Society for Theriogenology, 1998, Baltimore, MD. Proceedings... Baltimore: Society for Theriogenology, 1998. p.54-59.
- Graham JK, Foote RH.** Effects of several lipids, fatty acyl chain length and degree of unsaturation on the motility of bull sperm after cold shock and freezing. *Cryobiology*, v.24, p.42-52, 1987.
- Hartwig FP, Lisboa FP, Monteiro GA, Maziero RR, Freitas-Dell'Aqua CP, Alvarenga MA, Papa FO, Dell'Aqua Jr JA.** Use of cholesterol-loaded cyclodextrin: an alternative for bad cooler stallions. *Theriogenology*, v.81, p.340-346, 2014.
- Li G, Saenz J, Godke RA, Devireddy RV.** Effect of glycerol and cholesterol-loaded cyclodextrin on freezing-induced water loss in bovine spermatozoa. *Reproduction*, v.131, p.875-886, 2006.
- Madison RJ, Evans LE, Youngs CR.** The effect of 2-hydroxypropyl-cyclodextrin on post-thaw parameters of cryopreserved jack and stallion semen. *J Equine Vet Sci*, v.33, p.272-278, 2013.
- Mazur P.** Cryobiology: the freezing of biological systems. *Science*, v.168, p.939-949, 1970.
- 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, Purdy PH, Graham JK.** Treating ram sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins improves cryosurvival. *Anim Reprod Sci*, v.118, p.236-247, 2010.
- Moore AI, Squires EL, Graham JK.** Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. *Cryobiology*, v.51, p.241-249, 2005.
- Morrier A, Thériault M, Castonguay F, Bailey J.** Effect of cholesterol loaded methyl- β -cyclodextrin on ram sperm during cryopreservation, cold-shock and artificial insemination. In: Society for the Study of Reproduction Meeting, 2004, Vancouver, Canada. Proceedings... Vancouver, 2004. p.239.
- Müller K, Müller P, Pincemy G, Kurz A, Labbe C.** Characterization of sperm plasma membrane properties after cholesterol modification: consequences for cryopreservation of rainbow trout spermatozoa. *Biol Reprod*, v.78, p.390-399, 2008.
- Murphy C, English AM, Holden SA, Fair S.** Cholesterol-loaded-cyclodextrins improve the post-thaw quality of stallion sperm. *Anim Reprod Sci*, v.145, p.123-129, 2014.
- Navratil AM, Bliss SP, Berghorn KA, Haughian JM, Farmerie TA, Graham JK, Clay CM, Roberson MS.** Constitutive localization of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor to low density membrane microdomains is necessary for GnRH signaling to ERK. *J Biol Chem*, v.278, p.31593-31602, 2003
- Oliveira CH, Vasconcelos AB, Souza FA, Martins-Filho OA, Silva MX, Varago FC, Lagares MA.** Cholesterol addition protects membrane intactness during cryopreservation of stallion sperm. *Anim Reprod Sci*, v.118, p.194-200, 2010.
- Ollero M, Muinõ-Blanco T, López-Pérez MJ, Cebrián-Pérez JA.** Surface changes associated with ram sperm cryopreservation revealed by counter-current distribution in an aqueous two-phase system: effect of different cryoprotectants. *J Chromatogr B: Biomed Sci Appl*, v.680, p.157-164, 1996.
- Pamornsakda T, Pojprasath T, Suwimonteerabutr J, Tharasanit T.** Effects of cholesterol-loaded cyclodextrins on the quality of frozen-thawed equine epididymal sperm. *Cryobiology*, v.63, p.90-95, 2011.
- Parks JE, Meachan TN, Saacke RG.** Cholesterol and phospholipids of bovine spermatozoa. II. Effect of liposomes prepared from egg phosphatidylcholine and cholesterol on sperm cholesterol, phospholipids, and viability at 4°C and 37°C. *Biol Reprod*, v.24, p.399-404, 1981.
- Purdy PH, Graham JK.** Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. *Cryobiology*, v.48, p.36-45, 2004.
- Purdy PH, Mocé E, Stobart R, Murdoch WJ, Moss GE, Larson B, Ramsey S, Graham JK, Blackburn HD.** The fertility of ram sperm held for 24h at 5 degrees C prior to cryopreservation. *Anim Reprod Sci*, v.118, p.231-235, 2010.
- Saenger W.** Cyclodextrin inclusion compounds in research and industry. *Angewandte Chem Int Ed English*, v.19, p.344-362, 1980.
- Srivastava N, Srivastava SK, Ghosh SK, Kumar A, P, Jerome A.** Acrosome membrane integrity and cryocapacitation are related to cholesterol content of bull spermatozoa. *Asian Pacific J Reprod*, v.2, p.126-131, 2013.
- Tischner M.** Evaluation of deep-frozen semen in stallions. *J Reprod Fertil Suppl*, n.27, p.53-59, 1979.
- Visconti PE, Galantino-Homer H, Ning X, Moore GD, Valenzuela JP, Jorgez CJ, Alvarez JG, Kopf GS.** Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm. β -cyclodextrins initiate transmembrane signaling leading to an increase in protein tyrosine phosphorylation and capacitation. *J Biol Chem*, v.274, p.3235-3242, 1999.



- Watson PF.** The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci*, v.60, p.481-492, 2000.
- Watson PF.** The effects of cold shock on sperm cell membranes. In: Morris GJ, Clark A. (Ed.). *Effects of low temperatures on biological membranes*. London: Academic Press, 1981. p.189-218.
- White IG.** Lipids and calcium uptakes of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reprod Fertil Dev*, v.5, p.639-658, 1993.
- Wilhelm KH, Graham JK, Squires EL.** Effects of phosphatidylserine and cholesterol liposomes on the viability, motility, and acrosomal integrity of stallion spermatozoa prior to and after cryopreservation. *Cryobiology*, v.33, p.320-329, 1996.
- Yancey PG, Rodriguez WV, Kilsdonk EPC, Stoudt GW, Johnson WJ, Phillips MC, Rothblat GH.** Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. Demonstration of kinetic pools and mechanism of efflux. *J Biol Chem*, v.271, p.16026-16034, 1996.
- Yeste M, Estrada E, Casas I, Bonet S, Rodríguez-Gil JE.** Good and bad freezability boar ejaculates differ in the integrity of nucleoprotein structure after freeze-thawing but not in ROS levels. *Theriogenology*, v.79, p.929-939, 2013.
- Yeste M, Estrada E, Pinart E, Bonet S, Miró J, Rodríguez-Gil JE.** The improving effect of reduced glutathione on boar sperm cryotolerance is related with the intrinsic ejaculate freezability. *Cryobiology*, v.68, p.251-261, 2014a.
- Yeste M, Estrada E, Rocha LG, Marín H, Rodríguez-Gil JE, Miró J.** Cryotolerance of stallion spermatozoa is related to ROS production and mitochondrial membrane potential rather than to the integrity of sperm nucleus. *Andrology*, v.2, p.1-13, 2014b.
-