

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE REPRODUÇÃO ANIMAL E RADIOLOGIA
VETERINÁRIA

**UTILIZAÇÃO DO CASEINATO DE SÓDIO NA CONGELAÇÃO DE
SÊMEN OVINO**

LETÍCIA CRISTINA SALGADO

BOTUCATU-SP

Abril 2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE REPRODUÇÃO ANIMAL E RADIOLOGIA
VETERINÁRIA

**UTILIZAÇÃO DO CASEINATO DE SÓDIO NA CONGELAÇÃO DE
SÊMEN OVINO**

LETÍCIA CRISTINA SALGADO

Dissertação apresentada á Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista-UNESP, Campus de Botucatu, para Exame Geral de Qualificação de mestrado no programa de pós-graduação em Biotecnologia Animal.

Orientadora: Prof. Dra. Eunice Oba

BOTUCATU-SP

Junho 2020

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Salgado, Letícia Cristina.

Utilização do caseinato de sódio na congelação de sêmen ovino / Letícia Cristina Salgado. - Botucatu, 2020

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Eunice Oba

Capes: 50504002

1. Ovino. 2. Sêmen - Criopreservação. 3. Leite - Proteínas. 4. Gema de ovo.

Palavras-chave: Caseinato de sódio; Congelação; Diluente; Gema de ovo.

Nome do autor: Letícia Cristina Salgado

Título: **UTILIZAÇÃO DO CASEINATO DE SÓDIO NA CONGELAÇÃO DE SÊMEN OVINO**

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Eunice Oba

Presidente e orientadora

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária FMVZ - UNESP
Botucatu /SP

Profa. Dra. Camila De Paula Freitas Dell'Aqua

Membro titular

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária FMVZ - UNESP
Botucatu /SP

Prof. Dra. Ariane Dantas

Membro titular

Etec Dona Sebastiana de Barros

São Manuel /SP

Data da defesa da dissertação, 29 de abril de 2020.

DEDICATÓRIA

**Dedico esse trabalho e esse título a Deus,
principalmente a minha Avó Therezinha Secco**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a **Deus**, por me conceder saúde pra que pudesse trabalhar e por estar sempre regendo meus passos.

A minha família, especialmente minha mãe **Luciana** que sempre me incentivou a continuar e sempre apoiou as minhas escolhas, também pelo apoio financeiro e sua paciência comigo.

Meu pai **Orlando** por me ajudar a conceder essa oportunidade que me foi dada.

Ao meu irmão **Leandro** e meu padrasto **Adilson** que sempre estão ao meu lado.

Ao meu namorado **Helder** que sempre esteve ao meu lado ajudando e contribuindo pessoalmente com meu projeto e um dos principais incentivadores do meu crescimento.

Aos meus avós **Jovelino** e **Therezinha** que foram e são um exemplo de responsabilidade, ética e esforço. Dedico todo este meu projeto especialmente a minha Vó, que sempre foi à pessoa que mais me incentivou a sempre estudar e mostrar que o conhecimento abre o mundo de oportunidades.

Acredito que nós temos **o poder de atrair a realidade que desejamos**, mas os sonhos só se realizam com oportunidades. E na maioria das vezes elas só aparecem por causa das **PESSOAS...** “Alguém de bom coração que financia seus estudos; alguém que acredita no seu potencial e te dá um voto de confiança”; e é assim muitas vezes.

Diante disso, queria agradecer imensamente e especialmente a minha orientadora professora **Dra. Eunice Oba**, pela oportunidade de aqui estar. Ela me deu a chance de crescer, pelos seus ensinamentos, apoio e principalmente exemplo de profissionalismo e ética. Seu conhecimento científico me faz ver o quão pouco sei e o quanto ainda tenho que aprender.

Pela ajuda, conselhos e também pelos produtos cedidos pra realização do projeto, agradeço o amigo **Prof. Dr. José Antônio Dell’Aqua Junior**.

Pelo auxílio constante de seus ensinamentos e conhecimento com as análises efetuadas de Citometria de fluxo e da análise estatística, agradeço a querida **Prof. Dra. Camila Freitas Dell’Aqua**.

Ao colega e **Prof. Dr. André Maciel Crespilho** por dispor de seu tempo pra estar ajudando com as análises estatística do projeto.

Pela generosidade em ceder o laboratório CERAN, agradeço o Prof. **Dr. Frederico Ozanan Papa**.

Por ceder espaço e equipamentos do laboratório viabilizando o projeto, e seus conselhos sempre produtivos, agradeço o Prof. **Dr. Sony Dimas Bicudo**.

Com carinho e com o coração eternamente grato pela ajuda, apoio e dedicação dada ao projeto, agradeço aos amigos queridos **Lucas e Renan**.

Em especial ao **Rodrigo Garcia** que além de sua leal amizade e sua ajuda colaborou por ceder seus animais e sua propriedade pra realização do trabalho. E também em especial para **Viviane Codognoto** pela paciência, colaboração e principalmente pela grande amizade que cultivamos esses anos.

A todos meus amigos de vida em especial **Raphael e Diogo**, que disponibilizaram o seu tempo pra me ajudar com o manejo dos animais e por me apoiarem nessa jornada.

Aos meus companheiros de laboratório que sempre demonstraram apoio e estiveram do meu lado.

A faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu- UNESP, incluindo todos os professores e servidores, por permitir a realização de grande parte experimental deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram ao longo dessa jornada para meu conhecimento e desenvolvimento pessoal e profissional. Muito obrigada!

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”. (Marthin Luther King)

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Processo de obtenção de diferentes frações do leite por microfiltração.....15
- Figura 2-**Obtenção do caseinato de sódio a partir do leite cru desnatado.....15

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Ajuste do equipamento de análise computadorizada dos espermatozoides ovinos.....	4
Tabela 2 - Resultados obtidos por análise computadorizada do sêmen descongelado dos oito animais para seleção dos dois machos utilizados no teste de fertilidade.....	7
Tabela 3 - Valores médios e erro padrão, mínimo (Min) e máximo (Máx) dos parâmetros obtidos na pré-congelação dos oito animais.	9
Tabela 4 - Valores médios e erro padrão dos parâmetros cinéticos obtidos através de análise do CASA dos oito animais pós-descongelamento no momento zero.	10
Tabela 5 - Valores médios e erro padrão dos parâmetros cinéticos obtidos através de análise do CASA dos oito animais pós-congelação no momento 90 minutos (T90/TTR)	11
Tabela 6 - Valores médios e erro padrão dos parâmetros obtidos por citometria de fluxo pós congelação dos oitos animais em ambos os tempos (Tempo 0 e 90/TTR).....	12
Tabela 7 - Resultados obtidos no teste de fertilidade utilizando os machos selecionados e os diferentes diluentes utilizados.....	13

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ALH-amplitude lateral de cabeça
ALH-movimento lateral de cabeça
ANOVA-análise de variância
ATP-adenosina trifosfato
BCF-frequência de batimento de cauda
BSPs-binder of sperm proteins
CASA- análise computadorizada de espermatozoide
CDFA-diacetato de carboxifluoreceína
CG-caseinoglicopeptídeo
cis-PnA -ácido-parinárico
ConA-Concanavalia ensiformis
CS-caseinato de sódio
CSDM- células sem desestabilização de membrana
DNA- ácido desoxirribonucleico
eCG -gonadotrofina coriônica equina
EROs-espécies reativas de oxigênio
EthD-1- homodímero de etídio-1
FITC-isotiocianato de fluoresceína
H₂O₂-peróxido de hidrogênio
HDL-lipoproteína de alta densidade
HO₂- hidropexil
HOCl-ácido hipocloroso
HPM- alto potencial mitocondrial
IA-inseminação artificial
IAL- inseminação artificial por laparoscopia
IATF- inseminação artificial em tempo fixo
LDL-lipoprotéica de baixa densidade
LIN-linearidade
MEDIUM- espermatozoides com movimentos médios
MPAI-integridade das membranas plasmática e acrossomal

MP-motilidade espermática progressiva
MT-Motilidade espermática total
O₂- anion superóxido
O₂ cel integras- células íntegras com concentração de superóxido
OEP-Orvus Es Paste
OH -radicais hidroxil
PI- iodeto de propídio
PNA- arachis hypogea
PN-fosfocaseinato
PSA-pisum sativum
RAP- espermatozoides com movimento rápido
RO- alcoxil
ROO-peroxil
RSVP-ram Seminal Vesicles Protein
SLOW-espermatozoides com movimentos lentos
STATIC-espermatozoides parados
STR-retilinearidade
TALP-PVA-“Tyrodes Albumin, Lactate, Pyruvate” acrescido de polivinilpirrodilona
TTR- teste de estresse térmico
VAP-velocidade de trajeto
VCL-velocidade curvilinear
VSL-velocidade linear
ZP-zona pelúcida
YP-Yo-Pro

Sumário

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1 Célula espermática	2
2.2. Membrana Plasmática	4
2.3 Congelação.....	6
2.4 Meios Diluidores e Crioprotetores.....	9
2.4.1. Gema de ovo	11
2.4.2. Leite e Caseinato de Sódio.....	13
2.4.3 Atuação das caseínas frente às proteínas do plasma seminal	16
2.5 Avaliação do Espermatozóide Ovino	18
2.5.1. Análise Computadorizada do Sêmen (Computer-assisted semen analysis – CASA).....	20
2.5.2. Integridade de Membrana Plasmática e Acrossomal.....	21
2.5.4 Estresse Oxidativo	22
2.6 Teste de fertilidade	24
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	25
4. REFERÊNCIAS*	26
HIPÓTESE	42
OBJETIVOS	42
CAPÍTULO I	1
UTILIZAÇÃO DO CASEINATO DE SÓDIO NA CONGELAÇÃO DE SÊMEN OVINO	1
1. Introdução	2
2. Material e métodos.....	3
2.1 Aspectos éticos.....	3
2.2. Local do experimento.....	4
2.3. Animais	4
3. Delineamento experimental.....	4
3.1. Colheita e Processamento do sêmen	4
3.2 Congelação do Sêmen	5
3.3 Avaliação do sêmen.....	6

	xii
3.4 Teste de fertilidade	7
3.5 Análise Estatística.....	9
4. Resultados	9
Experimento 2.....	
5. Discussão.....	13
Agradecimentos	18
REFERÊNCIAS	18

RESUMO

SALGADO, L.C. **Utilização do caseinato de sódio na congelação de sêmen ovino**. Botucatu-SP. 2020, 84 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista (UNESP).

A congelação de sêmen é uma ferramenta de grande importância na reprodução de animais domésticos, auxiliando na difusão do do material genético, preservando-o por tempo indeterminado, além do maior aproveitamento do uso de reprodutores com genética superior comprovada. Para que a congelação de sêmen seja eficiente e alcance resultados satisfatórios com a inseminação, utiliza-se no processo o emprego de diluentes, que tem como função proteger a célula contra o choque térmico e manter o espermatozoide viável até o momento da inseminação. O uso de frações de leite como meio diluidor tem se tornado muito conhecida e de grande importância no processo, usando, por exemplo, as micelas de caseína que conferem função de proteção da membrana plasmática e manutenção da viabilidade espermática. Levando em conta essas informações, este trabalho teve como objetivo avaliar a ação do caseinato de sódio nas características seminais pós descongelação do sêmen utilizando diluentes a base de gema de ovo (BB) e o mesmo diluente acrescido de caseinato de sódio 2% (BC). No experimento I, foram colhidos 3 ejaculados de 8 animais (n=24) por eletroejaculação, este sêmen foi dividido em duas alíquotas, uma era diluída em meio comercial a base de gema de ovo e a outra alíquota diluída no mesmo meio mas acrescido de 2% de caseinato de sódio, em seguida foram envasadas em palhetas francesas com volume de 0,25 ml e refrigerado 4 horas à 5 °C em seguida congelado em nitrogênio líquido. Após a congelação as amostras foram avaliadas por análise computadorizada do movimento espermático (CASA), integridade de membranas plasmática e acrossomal e geração de anion superóxido e potencial mitocondrial por citometria de fluxo. Então submetidas a estresse térmico por 90min e novamente avaliadas Para o experimento II foi realizado teste de fertilidade “in vivo” utilizando a técnica de inseminação artificial por laparoscopia em 100 fêmeas da raça Dorper e Suffolk, usando o sêmen congelado com os respectivos meios diluentes, de dois animais dentre os oito colhidos no experimento I, um com boa qualidade seminal pós-congelação e o outro com baixa qualidade seminal. Foi realizada estatística descritiva dos resultados e apresentado em média e erro padrão da média, para as avaliações da qualidade seminal utilizou-se o teste t seguido de Tukey quando apresentaram distribuição normal pelo Kolmogorov-Smirnoff, e quando não utilizou-se o teste de Friedman seguido de Dunn. Para a Fertilidade utilizou-se modelo de regressão logística multivariada. Os resultados de cinética espermática apresentaram diferença estatística para os parâmetros de velocidade média de trajeto e velocidade curvilínea no grupo congelado com BotuBov e velocidade em linha reta e linearidade, o grupo acrescido de caseinato. Após o estresse térmico (T90) o BB manteve-se superior para os

valores de VAP e VCL ($P < 0.05$) e foi maior numericamente no VSL ($P = 0.06$), enquanto o BC se manteve-se superior apenas no LIN ($P < 0.05$). Nas avaliações por citometria de fluxo, foi observado logo após a descongelação que o BC foi superior nas células com membrana plasmática estabilizadas ($P < 0.05$), apresentou maiores valores na porcentagem de células com alto potencial mitocondrial ($P = 0.08$) e células com membrana plasmática e acrossomal integras ($P = 0.09$), enquanto que na porcentagem de células com alta geração de anion superóxido, apresentou menores valores do que BB ($P = 0.07$). Após o estresse térmico, o BC foi numericamente maior na porcentagem de células com alto potencial e mitocondrial e células com membrana plasmática e acrossomal integras ($P = 0.06$). No teste de fertilidade não houve diferença estatística. Concluiu-se que apesar de apresentarem apenas algumas diferenças estatísticas, os parâmetros de cinética espermática mostraram-se favoráveis ao grupo contendo caseinato de sódio em sua composição, assim como no teste de fertilidade, demonstrando que o uso do caseinato de sódio no meio diluente pode ser uma alternativa favorável para a criopreservação do sêmen na espécie ovina.

Palavra-chave: diluente, gema de ovo, caseinato, congelação.

ABSTRACT

SALGADO, L.C. **Utilização do caseinato de sódio na congelação de sêmen ovino.** Botucatu-SP. 2020, 84 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista (UNESP).

The reproduction of domestic animals, helping in the diffusion of the genetic material, preserving it indefinitely, in addition to the greater use of reproducers with proven superior genetics. In order for semen freezing to be efficient and achieve satisfactory results with insemination, the use of diluents is used in the process, which has the function of protecting the cell against thermal shock and keeping the sperm viable until the time of insemination. The use of milk fractions as a diluting medium has become very well known and of great importance in the process, using, for example, the casein micelles that provide a protective function of the plasma membrane and maintenance of sperm viability. Taking this information into account, this study aimed to evaluate the action of sodium caseinate on semen characteristics after semen thawed using egg yolk (BB) diluents and the same diluent plus 2% sodium caseinate (BC) In experiment I, 3 ejaculates were collected from 8 animals (n = 24) by electroejaculation, this semen was divided into two aliquots, one was diluted in commercial medium based on egg yolk and the other diluted in the same medium but added of 2% sodium caseinate, then they were packaged in French straws with a volume of 0.25 ml and refrigerated 4 hours at 5 ° C then frozen in liquid nitrogen. After freezing, the samples were evaluated by computerized analysis of sperm movement (CASA), integrity of plasma and acrosomal membranes and generation of superoxide anion and mitochondrial potential by flow cytometry. Then subjected to heat stress for 90 minutes and again evaluated. For experiment II, an in vivo fertility test was performed using the artificial insemination technique by laparoscopy on 100 Dorper and Suffolk females, using frozen semen with the respective diluents, of two animals among the eight harvested in experiment I, one with good seminal quality after freezing and the other with low seminal quality. Descriptive statistics of the results were performed and presented as mean and standard error of the mean. For the evaluations of seminal quality, the t test was used followed by Tukey when they presented normal distribution by the Kolmogorov-Smirnoff, and when the Friedman test was not used. followed by Dunn. For fertility, a multivariate logistic regression model was used. The results of sperm kinetics showed statistical difference for the parameters of mean path speed and curvilinear speed in the group frozen with BotuBov and speed in a straight line and linearity, the group plus caseinate. After thermal stress (T90), BB remained higher for VAP and VCL values (P <0.05) and

was higher numerically in VSL ($P = 0.06$), while BC remained higher only in LIN ($P < 0.05$). In evaluations by flow cytometry, it was observed right after thawing that BC was superior in cells with stabilized plasma membrane ($P < 0.05$), presented higher values in the percentage of cells with high mitochondrial potential ($P = 0.08$) and cells with integral plasma and acrosomal membrane ($P = 0.09$), while in the percentage of cells with high generation of superoxide anion, it presented lower values than BB ($P = 0.07$). After thermal stress, BC was numerically higher in the percentage of cells with high potential and mitochondrial and cells with integral plasma and acrosomal membrane ($P = 0.06$). In the fertility test, there was no statistical difference. It was concluded that despite having only a few statistical differences, the parameters of sperm kinetics were favorable to the group containing sodium caseinate in their composition, as well as in the fertility test, demonstrating that the use of sodium caseinate in diluent medium may be a favorable alternative for cryopreservation of semen in sheep.

Keyword: diluent, egg yolk, caseinate, freezing

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A ovinocultura brasileira é composta por um rebanho de aproximadamente de 17,9 milhões de cabeças distribuídas por todo o território brasileiro, porém, mais concentradas principalmente nas regiões sul e nordeste (IBGE, 2017). São criados predominantemente em sistema semi-intensivo (SOUZA et al., 2008), sendo a produção de carne e seus subprodutos o principal setor da atividade (STAUDT; SILVA, 2008).

Considerando seu potencial econômico, é admissível pensar em alternativas que elevem a produtividade de ovinos (NEVES, 1990), justificando assim a utilização de biotecnologias reprodutivas, como a inseminação artificial, uma alternativa que tem como intuito a melhoria da produção em um intervalo curto de tempo, levando em consideração o melhoramento genético do rebanho e a capacidade reprodutiva de animais com genética de alta linhagem (BARUSELLI et al., 2004; ARRUDA et al., 2011).

Para o emprego da inseminação artificial, se faz necessário a congelação do sêmen, tornando-se fundamental o conhecimento de particularidades da espécie em questão para o sucesso nesse processo. Peculiaridades reprodutivas são observadas em ovinos, como a composição da membrana celular do espermatozoide, ocasionando dificuldades no processo de congelação fazendo com que os resultados desta técnica não sejam completamente satisfatórios (QUINN; WHITE, 1969 QUINN et al., 1980), visto que a congelação leva a uma capacitação precoce do espermatozoide (LOPEZ-BREA, 1995; HOLT, 2000).

O processo de congelação leva a alterações morfológicas e funcionais dos espermatozoides, como redução da função mitocondrial, diminuição dos parâmetros de cinética espermática e mudanças na integridade das membranas além de reduzir a fertilidade (GILLAN et al., 2004; CELEGHINI, 2005). O uso de um meio de conservação utilizado no processo de congelação fornece um ambiente que mantém a função e a integridade das membranas, o mesmo é obtido por combinações variadas de componentes (CELEGHINI, 2005).

Para que a congelação de sêmen seja eficiente vem se investido no uso de diluentes que possuem em sua composição substâncias que protegem a célula contra o choque térmico ocasionado pelo processo de congelação,

fornecendo substratos necessários ao metabolismo espermático, estabilizando o pH, inibindo o crescimento bacteriano e mantendo o espermatozoide viável até o momento da inseminação (BORTOLOZZO et al., 2005).

Na espécie ovina diferentes componentes são utilizadas em seus diluentes sendo o mais comum a gema de ovo, usada na congelação de sêmen da espécie bovina (DAVIS et al., 1963), que tem como função proteger os espermatozoides contra o choque térmico a partir de lipoproteínas de baixa densidade que se fixam fortemente ao espermatozoide, sendo a principal proteína a lipoproteína 3 (FOULKES, 1977; AMANN & GRAHAM, 1993).

Uma alternativa à gema do ovo são diluentes à base de caseínas, que são fosfoproteínas encontradas no leite bovino, exercendo como função a estabilização da membrana plasmática dos espermatozoides por diminuírem a perda de lipídios integrais (MANJUNATH, 2012; PLANTE et al., 2015) mantendo a viabilidade e motilidade durante a congelação, fazendo com que ocorra diminuição da perda de lipídios e diminuindo também a ligação de proteínas aglutinantes que são prejudiciais aos espermatozoides (BERGERON et al., 2007).

Diante disso ainda há grande necessidade de melhorias nas técnicas de congelação de sêmen, sendo o objetivo deste estudo avaliar o diluente a base de gema de ovo com ou sem adição de caseinato de sódio na congelação de sêmen ovino, com a finalidade de melhorar a qualidade do sêmen congelado aumentando assim as taxas de fertilidade a campo gerando acréscimos à produção e reprodução da espécie.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Célula espermática

A morfologia espermática é de extrema importância como indicador de fertilidade, funcionando como um parâmetro de danos espermáticos gerados por agentes físicos ou químicos, importante tanto em homens quanto nos animais. Em razão disso, rotineiramente o estudo e classificação da morfologia do espermatozoide tem se tornado essencial na análise de sêmen (VERSTEGEN et al., 2002; GARCIA-HERREROS et al., 2006).

A espermatogênese é um processo complexo e ordenado que ocorre no interior dos túbulos seminíferos, é a função exócrina do testículo, onde as células

espermatogonais se transformam em espermatozoides após passarem por diversas modificações (HESS e FRANÇA, 2008; HERMO et al. 2010). O processo espermatogênico se caracteriza por uma série de eventos moleculares, bioquímicos e celulares que ocorrem dentro dos túbulos seminíferos (LUO et al., 2011).

A duração do ciclo do epitélio seminífero é particular para cada espécie, e corresponde ao tempo em que uma espermatogônia inicia seu ciclo até a efetiva formação do espermatozoide (SENGER, 2003). Já que na espécie ovina este ciclo tem uma duração aproximada de 10,57 dias e o tempo abrangido entre a mitose de uma espermatogônia até a liberação do espermatozoide no lúmen do túbulo seminífero corresponde a 42,28 dias (CARDOSO e QUEIROZ, 1988).

O sêmen é composto por um líquido contendo presença de espermatozoide e secreções (plasma seminal) das glândulas acessórias (vesiculares, bulbo uretrais e próstata), do ducto deferente, do testículo e do epidídimo. Sendo que o plasma seminal é de grande importância na monta natural, já que ele serve com protetor e carreador dos espermatozoides (HAFEZ E HAFEZ, 2004), além disso é composto por diversas proteínas, açúcares, enzimas, hormônios entre outros compostos (VIEIRA-NETO, 2017).

No momento que a célula germinativa se transforma em espermatozoides, essa célula se alonga e são formadas a cabeça e cauda (flagelo), onde a cauda subdividida em 3 partes: peça intermediária, principal e terminal (HAFEZ E HAFEZ, 2004). Simplificadamente os espermatozoides são células haploides, alongadas e é constituído principalmente por cabeça e cauda, que são unidas por uma região chamada de colo (FLESCH E GADELLA, 2000).

A cabeça apresenta formato arredondado e achatado, onde sua porção superior encontra-se o acrossoma, sendo constituída basicamente por uma pequena porção de citoplasma e o núcleo (FLESCH E GADELLA, 2000). O tamanho e formato da cabeça dos espermatozoides pode ser diferente de acordo com a espécie, além disso quando analisadas populações de espermatozoides em avaliações morfológicas de rotina pode não se notar que essa população do mesmo ejaculado apresente características morfológicas heterogêneas (RUBIO-GUILLÉN et al., 2007; RAMON et al., 2014). O núcleo do espermatozoide que se encontra na cabeça possui uma cromatina altamente condensada devido a

um evento conhecido como protaminação, onde protaminas substituem as histonas do DNA, levando a uma condensação acentuada da cromatina e é envolto pelo envelope nuclear (FLESCH E GADELLA, 2000; BALHORN, 2007).

A parte da cauda do espermatozoide é composta por colo que conecta a cabeça com a cauda, a cauda é composta por peça intermediária, principal e terminal (KNOBIL E NEILL, 2006). Essa cauda é formada por uma estrutura chamada axonema que é composta por dois microtúbulos centrais e envoltos por nove pares de microtúbulos radialmente disposto e ao redor deles (MORTIMER, 2000), mas à medida que chegam ao final dessa cauda os túbulos duplos vão se dissociando e sumindo, do qual o último a sumir é o túbulo central (BARTH E OKO, 1989).

Existe um conjunto de mitocôndrias localizadas na peça intermediária circundando o axonema e dispostas em espiral, que tem função de gerar energia para o batimento da cauda através de produção de ATP. Cada região da membrana plasmática apresenta funções e domínios específicos, como a que cobre a cabeça, que tem função de realizar interação com o oócito, a que cobre a peça intermediária e onde se localiza também as mitocôndrias, tem ligação com o influxo de cálcio (SINGH E RAJENDER, 2015; VICENTE-CARRILLO et al., 2016) e a produção de ATP gerando energia, sendo um dos precursores do início da motilidade (FLESCH E GADELLA, 2000).

2.2. Membrana Plasmática

As membranas espermáticas são estruturas especializadas que exercem funções de grande importância para a fecundação, composta por lipídeos que desempenham papel biológico, como moléculas alimentares, promovem integridade estrutural da membrana e depósito de energia altamente concentrado (ARRUDA et al., 2011). Para que mantenha a viabilidade do sêmen é necessário que se mantenha a integridade de membrana espermática, mantendo assim suas características como a sua homeostase preservando suas características de motilidade, requisitos indispensáveis para manutenção da capacidade de fecundação espermática.

O espermatozoide é coberto por membrana plasmática que é composta por fosfolipídios, a qual tem diferença de acordo com a região. Essa membrana estabelece canais através de suas extremidades hidrofóbicas externas e

hidrofílicas internas, deixando que haja passagem de íons e pequenas moléculas, havendo uma desestabilização e causando danos irreversíveis a essa membrana reduzindo a viabilidade celular (COSTA, 2015).

A estrutura da membrana plasmática sofre mudanças constantes de seus componentes e sua disposição por apresentarem movimentação livre. Este processo de movimentação esta diretamente relacionada com a fluidez da membrana, quando está em temperatura ambiente passa por uma fase chamada de liquido-cristalino. Além disso essa fluidez pode sofrer influência pela proporção de colesterol: lipídeo e os lipídeos presentes (AMANN e GRAHAM, 2010). Sendo assim quanto maior a quantidade de colesterol presente nessa membrana menos permeável, fluída e flexível ela se torna (AMANN e GRAHAM, 2010; ALBERTS, 1994; GIRAUD, 2000). A membrana plasmática apresenta maior resistência à célula espermática criopreservada devido a sua fluidez. (GIRAUD et al., 2000).

A maior quantidade entre os fosfolipídios encontrados nessa membrana são as fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilcolina e esfingomielina. As duas primeiras se encontram no folheto interno, enquanto as duas últimas estão inseridas no folheto externo da bicamada. A fosfatidilserina se desloca dos folhetos internos para os externos quando ocorrem danos graves à membrana, como resfriamento e congelação (GRAHAM, 2010; SILVA; GUERRA, 2011). Outro constituinte da membrana plasmática é o ácido docosahexanóico, principal ácido graxo presente na maioria dos mamíferos. Outro ácido é o docosapentanóico, sendo o principal constituinte da membrana em espécies como os equinos, ovinos e aves (GARCIA et al., 2011). O esteroide predominador é o colesterol que tem função de estabilização da membrana, preenchendo os espaços entre as cadeias de ácidos graxos e de fosfolipídios. Além disso, tem maior concentração na face extracelular devido a sua distribuição não ser uniforme na membrana (CROSS, 1998).

Englobando todos componentes intracelulares e revestindo toda a célula espermática, a membrana plasmática contém organelas que têm como função manter um gradiente químico de íons e de outros elementos solúveis, por sua permeabilidade entre os meios intracelulares e extracelulares (BRANDÃO, 2008). A membrana também atua como uma barreira seletiva para componentes

presentes no meio intra e extracelular. Cada região da membrana possui sítios de ligação com afinidades altamente específicas a determinadas moléculas (GWATHEMEY et al., 2006).

Relatos realizados por Poulos et al. (1973), demonstraram que existe maior presença de lipídios de cadeia insaturada na membrana plasmática em espécies com menor resistência à congelação. Wales & White (1959) relataram a existência de uma relação direta entre a resistência ao choque frio com o teor de colesterol presente nas células, o que significa, que quanto menor o teor de colesterol nas células, menor é a resistência ao choque frio.

Assim, é necessário a busca de elementos que consigam aumentar a proteção das células espermáticas, sendo que o conhecimento de meios diluentes a base de gema de ovo em sua composição de fosfolipídios, podem proteger a célula espermática, minimizando as injúrias causadas pelo processo de congelação. (MEDEIROS et al., 2002).

2.3 Congelação

Um dos ramos da biologia é a criobiologia, responsável por estudar os efeitos de baixas temperaturas sobre tecidos, células e organismo vivos. Com os resultados obtidos pelo estudo da criobiologia foi criada a congelação, uma técnica desenvolvida para preservação de células, tecidos e embriões abaixo do ponto de congelação da água, tendo como propósito manter a viabilidade das células por tempo indeterminado preservando sua composição (PEGG, 2002).

Entre muitas vantagens da técnica está a capacidade de transporte e armazenamento por extensos períodos de tempo, possibilitando a conservação de sêmen de um reprodutor para uma futura inseminação e uso de combinações genéticas de animais situados em propriedades de longas distancias, além de oferecer um controle de propagação de doenças e contaminantes (FERNANDES, 2012).

O processo de congelação mantém a vida útil de um espermatozoide por um período de tempo indeterminado sendo mantido a uma temperatura de -196°C em nitrogênio líquido, contudo uma enorme gama desses espermatozoides não consegue sobreviver ao processo de congelação e descongelação (NOAKES et al., 2001).

Assim como os eventos fisiológicos que ocorrem nas células de reação acrossomal e de capacitação espermática, o processo de congelação é conhecido por gerar danos as organelas, preferencialmente alterações nas membranas. (BAILEY et al., 2000). No processo de congelação, os espermatozoides estão sujeitos a diferentes fatores estressantes como: formação e dissolução de cristais de gelo, desidratação, aumento da concentração dos solutos, transição de fase dos fosfolípidios da membrana, estresse osmótico e tóxico pela adição e remoção de crioprotetores (BORTOLOZZO et al., 2008).

Diferentes processos fisiológicos são vistos durante a capacitação dos mecanismos envolvidos na troca dos lipídeos do meio interno pro meio externo da membrana, como efluxo de colesterol e fosforilação da tirosina, que são vistas nos espermatozoides criopreservados (SILVA e GADELLA, 2006). Semelhante a capacitação espermática, a congelação causa fluidez e exposição dos sítios de ligação á moléculas externas da membrana, exigindo rapidez na capacitação da célula (THOMAS et al., 2006).

A curva de congelação com mudança de temperatura de 5°C positivos indo até 50 °C negativos determina se as células espermáticas passarão por uma ultracongelação, podendo haver crescimento do gelo intracelular ou se permanecerão em equilíbrio com o seu meio extracelular (WATSON, 2000). Para evitar uma desidratação dos espermatozoides, utiliza-se muito a congelação rápida, que por sua vez, causa menos danos à célula (AZEVEDO et al.,2000). A técnica de resfriamento rápido do sêmen entre temperaturas de 30°C a 0°C pode levar a um estresse letal para algumas células, sendo este estresse ocasionado devido ao intervalo de temperatura, ao limite de temperatura e a taxa de resfriamento. Afetando variavelmente as espécies esse processo é conhecido e chamado como choque térmico (WATSON, 2000). Deve sempre levar em consideração que para encontrar a curva ideal para congelação, ela seja rápida evitando que a célula espermática se exponha muito tempo á altas concentrações de solutos mas também deve ser lenta o suficiente para deixar que os espermatozoides se desidratem (SNOECK, 2003).

O processo de congelação do sêmen associado à técnica de inseminação artificial (IA), trazem benefícios aos programas de seleção e melhoramento

genético, atuando como ferramenta para acelerar o resultado genético dos rebanhos. Mesmo com esses avanços já obtidos no campo da biotecnologia, as taxas de sobrevivência dos espermatozoides que passaram por congelação ainda são baixas, devido à crioinjúrias estruturais, funcionais e bioquímicas nos diversos componentes presentes na composição da célula (WATSON, 2000). O processo de criopreservação interfere na qualidade e viabilidade dos espermatozoides. As etapas do processo de congelação, as quais fazem parte a diluição, refrigeração congelação e descongelação, reduzem a capacidade fecundante dos espermatozoides utilizados para a inseminação artificial (LECEWICZ et al. 2018).

Na espécie ovina o sêmen apresenta maior sensibilidade ao choque térmico, calcula-se que 40-50% dos espermatozóides não sobrevivam ao processo de congelação/dcongelação, mas aqueles que sobrevivem mantém a sua capacidade fertilizadora (MAXWELL E WATSON, 1996; WATSON, 2000).

Como relatado por Jones e Mann (1977), o espermatozoide de ovinos sofre alterações estruturais devido sua alta susceptibilidade à peroxidação dos fosfolipídios presentes na membrana plasmática, sendo essas mudanças observadas principalmente na região acrossomal, levando a modificações no metabolismo e conteúdo celular, e irreversíveis alterações da motilidade espermática. A severidade das lesões ocasionadas pelo choque térmico no processo de refrigeração depende da quantidade de colesterol presente na membrana da célula espermática. O espermatozoide ovino é mais susceptível ao choque térmico por possuírem taxa mais alta de ácidos graxos, mas esse choque pode ser prevenido controlando o tempo e taxa de resfriamento deste sêmen (MADEIRA et al, 2013).

Nos protocolos de congelação mais conhecidos e utilizados, os espermatozoides são diluídos em um meio contendo crioprotetor e em seguida são envasados em palhetas e depois submetidos a uma curva de congelação com vapor de nitrogênio líquido (SALAMON & MAXWEL, 2000). De maneira geral, o sêmen passa por um processo de congelação lento e é armazenado em palhetas, usando vários diluentes que já são utilizados para refrigeração e diluição com associação de substância crioprotetoras.

2.4 Meios Diluidores e Crioprotetores

A interação entre meios diluidores e os espermatozoides é fator indispensável para a manutenção da capacidade fecundante da célula (MANJUNATH et al., 2002).

Basicamente meios diluidores utilizados para congelação são compostos por açúcares como exemplo: frutose e glicose que atuam como fonte energética para os espermatozoides e ajudam a manter a pressão osmótica. Já os crioprotetores podem ser penetrantes ou não penetrantes, os não penetrantes exemplo o glicerol, que age protegendo a célula, diminuindo o ponto de congelação da água, ou as substâncias tampão e sais (Tris e citrato de sódio), que mantêm o potencial Hidrogeniônico do meio - pH, e também os antibióticos (penicilina e estreptomicina) que atuam inibindo o crescimento microbiano, e os não penetrantes como leite ou gema de ovo agem fazendo proteção extracelular (GIBBONS, 2002; PURDY, 2006). Substâncias antioxidantes também podem ser adicionadas aos diluidores para reduzir os danos gerados através do estresse oxidativo na congelação do sêmen (GUERRA et al., 2004).

A constituição dos meios diluidores é feita de substâncias que permitem a conservação da membrana plasmática, diante da estabilização do pH do meio, proteção contra choque térmico e neutralização de agentes tóxicos produzidos pelos próprios espermatozoides. Devem também manter o equilíbrio eletrolítico e osmótico, inibir o crescimento bacteriano e fornecer energia (FURT, 2006). Então de maneira geral os meios diluidores devem conter carboidratos, para energia, tampões para manter o pH e pressão osmótica, em especial na espécie ovina, recomenda-se pH= 6,8 e osmolaridade 300 mOsm e antibióticos que inibam o crescimento bacteriano. Conforme os espermatozoides são resfriados até 5°C é importante à presença de crioprotetores não penetrantes que façam a proteção contra esse choque frio além de oferecer nutrição e/ou crioprotetores penetrantes que protejam a células dos danos deletérios da congelação (HAFEZ e HAFEZ, 2004; PURDY, 2006; OLIVEIRA et al., 2011).

Na nomenclatura crioprotetor significa qualquer substância que ofereça temporariamente, proteção aos danos ocasionados pela redução de temperatura, energia e manutenção de ambiente adequado à sobrevivência da célula armazenada (PURDY, 2006). Os crioprotetores são fundamentais para sobrevivência dos espermatozoides na congelação, tendo como função

minimizar e controlar os efeitos adversos na célula no decorrer do processo de congelação e descongelação (ROSSI et al., 2003).

No desenvolvimento de estudos utilizando substâncias com o propósito de diminuir a injúrias causadas nas células durante o processo de congelação, sendo que os crioprotetores tem se mostrado bastante eficientes para realizar tal função. Também utilizados no processo de congelação do sêmen de diferentes espécies, reduzem o estresse osmótico por intermédio da reposição de água necessária para manutenção do volume celular, impede a formação de cristais de gelo grandes intracelularmente, interage com íons e macromoléculas, reduz o ponto de congelação da água, servindo desta maneira como um tampão para ajustes de possíveis alterações do potencial de hidrogênio - pH (MEDEIROS et al., 2002)

Os compostos dos crioprotetores utilizados no processo de congelação do sêmen são divididos em duas classes: não penetrantes e penetrantes. A primeira classe de crioprotetores não penetrantes é representada por macromoléculas com peso molecular alto, como exemplo os açúcares complexos (rafinose, trealose), água de coco, lipoproteínas da gema de ovo (NUNES, 2002), proteínas do leite e alguns aminoácidos que atuam por meio de osmose, provocando a evasão de água do interior da célula e prevenindo que cristais de gelo se formem no meio intracelular (AMANN & PICKETT, 1987). Os crioprotetores mais utilizados são os feitos a base de glicina- gema, glicina-gema-leite, água de côco, citrato-açúcar, gema, leite ou leite desnatado, lactose, sacarose, rafinose e os formulados a base de Tris-gema de ovo (SALAMON E MAXWELL, 2000 citados por BITTENCOURT et al., 2013).

Já a classe de penetrantes são substâncias que têm a capacidade de penetrar no interior da célula espermática. Ela se subdivide em dois grupos: amidas e alcoólicos (ASHWOOD-SMITH, 1987 ALVARENGA et al., 2005). Como crioprotetores amidas encontramos a lactamida e acetamida (KASHIWAZAKI et al., 2006), a dimetilacetamida (CALDERAM et al., 2008) e a dimetilformamida (OLIVEIRA et al., 2009), já os alcoólicos utilizados para conservação espermática, são principalmente o glicerol, dimetilsulfoxido (DMSO) e etilenoglicol Os crioprotetores penetrantes agem através da substituição parcial

e também pela ligação aos próprios eletrólitos à água, precavendo a exposição do material às altas concentrações de eletrólitos (CASTRO et al., 2011).

O crioprotetor penetrante mais utilizado na congelação do espermatozoide ovino é o glicerol. Quando utilizado para sêmen congelado pelo método de congelação espermática rápida, ou o de pellets, as melhores taxas de sobrevivência espermática são obtidas com 3 a 4% de glicerol, já no diluidor através do método convencional lento e com o uso, principalmente, de diluidores hipertônicos, a maioria dos estudos demonstraram que as melhores concentrações de glicerol se encontram entre 6% a 8% (SALAMON & MAXWELL, 2000).

Diferentes diluentes para congelação do sêmen ovino têm sido estudados, entre eles os mais utilizados são aqueles com base de citrato-açúcar-gema, leite ou leite desnatado, lactose, sacarose, rafinose e os formulados com TRIS-gema de ovo (SALAMON & MAXWELL, 2000), de glicina-gema, glicina-gema-leite (GONZALEZ et al., 1999) e água de coco (NUNES, 1998).

2.4.1. Gema de ovo

A gema do ovo começou a ser estudada na congelação de sêmen da espécie bovina (PHILLIPS & LARDY, 1940), apresentando resultados satisfatórios, quando comparados aos meios suplementados apenas com glicose, com aumento considerável da viabilidade espermática. A partir de então o mesmo diluente a base de gema de ovo foi utilizado para a conservação do sêmen da espécie ovina (DAVIS et al., 1963).

A proporção de gema de ovo utilizada para a congelação de sêmen é de 10 a 20%, sendo que as lipoproteínas contidas nesse substrato são de baixa densidade interagindo com a estrutura lipídica da membrana plasmática dos espermatozoides (BERGERON & MANJUNATH, 2006). A gema de ovo também atua aumentando a tolerância dos espermatozoides em soluções hiposmóticas e hiperosmóticas, como protetor osmótico. Assim, a sua adesão à membrana, exerce proteção durante a congelação, dada pela fração lipoprotéica de baixa densidade (LDL) (BOUSSEAU et al., 1998; BERGERON e MANJUNATH, 2006)

A gema está presente no meio diluidor, com ação crioprotetora, protegendo contra o choque pelo frio durante a refrigeração dos espermatozoides. A causa desse efeito é atribuída à sua composição de

lipoproteína de baixa densidade (LDL), ela adere à membrana espermática, levando ao influxo de fosfolípidios e colesterol pela membrana plasmática. Além disso, o LDL forma complexos com proteínas plasmáticas que fazem contato com o espermatozoide durante a ejaculação, impedindo o efluxo de fosfolípidios e colesterol da membrana espermática (Corcini et al., 2016).

A principal função da gema de ovo é proteger e estabilizar as membranas biológicas, diminuindo o efeito prejudicial do choque térmico, porém, o mecanismo de ação que concede essa proteção durante o congelamento do sêmen, ainda não está completamente esclarecido, sendo levantadas diversas hipóteses sobre o real desempenho da gema de ovo na célula espermática (HOLT, 2000).

Os componentes da gema de ovo são variados, visto que é um composto de origem animal e pode conter composições variadas devido as diferentes práticas empregadas no manejo alimentar das aves (BRAGA et al., 2005; RIBEIRO et al., 2007). Apresenta uma composição de 49,0% de umidade e 51,0% de sólidos totais, sendo que, destes, 30,9% são lipídeos totais (BARRETO et al. 2006). A composição dos lipídios é mais de 62% triglicérides, 33% fosfolípidos e menos de 5% colesterol, sendo menos de 1% dos lipídios da gema os carotenoides (ANTON et al., 2009). Além disso, por ser um composto biológico com presença de vitaminas, fosfolípidios, proteínas, glicose, antioxidante e componentes bactericidas é difícil definir toda a sua composição (HOUPALATHI et al., 2007).

De acordo com estudo realizado por Monreal e colaboradores (2014) a gema de ovo com objetivo de encontrar melhores índices na congelamento e na descongelamento mostrou-se satisfatória na criopreservação, agindo de maneira protetora, preservando a integridade estrutural e fornecendo proteção osmótica a membrana espermática devido a presença de lecitina e os lipídeos encontrados na gema.

Segundo estudo de WATSON (1995) a gema de ovo previne o dobramento de cauda dos espermatozoides que é provocado pelo choque térmico frio e protege a motilidade espermática. O uso da gema de ovo no meio diluidor apresentou melhoras pós-descongelamento do sêmen com uma maior taxa de motilidade e uma menor porcentagem de lesão de acrossoma (47% e 25%,

respectivamente), comparadas com amostras pós-congelação sem conter gema de ovo (19% para motilidade e 33% para lesão acrossomal) (DASKIN & TEKIN, 1996).

Em estudo Valente et al. (2010), observaram melhor termorresistência, fertilidade “*in vitro*” e “*in vivo*” pós-descongelação ao usarem diluente contendo gema de ovo na congelação de sêmen ovino quando comparado a tentativa retirar parcialmente ou totalmente da gema de ovo no diluente, alterando a sua constituição com suplementação de trealose e glicina, associada à substituição da glicose pela frutose, mais facilmente metabolizada pelo espermatozoide, notou-se que não foi capaz de compensar a insuficiência da gema de ovo. Teoricamente vale destacar que no processo de congelação e descongelação o grau de lesão encontrado é exposto durante a incubação espermática pós-descongelação, uma vez que quanto menor a longevidade destes gametas no trato feminino, maior o dano latente (BAG et al., 2004).

2.4.2. Leite e Caseinato de Sódio

O leite é constituído por proteínas totais (3,3 a 3,5%) e por proteínas provenientes do soro (20%) (DE KRUIF; HOLT, 2003). Estas proteínas são divididas em quatro grupos, sendo classificadas de acordo com suas estruturas e propriedades físico-químicas, se destacando o grupo das caseínas representando 80% das proteínas presentes no leite bovino (LOURENÇO, 2000; DE KRUIF; HOLT, 2003).

As caseínas são encontradas em quatro frações no leite: α 1 - caseína, α 2 - caseína, β - caseína e k - caseína, e as α -lactalbumina e β -lactoglobulina as principais proteínas do soro (MANJUNATH, 2012; McMAHON, OOMMEN, 2012; MENEZES et al., 2016; SILVA et al., 2019).

No leite as caseínas são encontradas na forma de micelas de caseínas (SILVA et al., 2019). Estas micelas são constituídas por caseínas, água e minerais, principalmente fosfato de cálcio, que funcionam como substâncias modeladoras com o intuito de manter sua integridade micelar, o que resulta em uma supramolécula coloidal dinâmica que se altera em função das mudanças nas condições físico-químicas como pH, temperatura, presença de enzimas, entre outros (McMAHON, OOMMEN, 2012; SILVA et al., 2019).

Constituintes do leite foram descritos por suas atividades auxiliando em propriedades de preservação do sêmen em baixas temperaturas (4°C) ou na congelação do mesmo (ALMIQUIST et al., 1954). Desse modo, estudos investigando as propriedades do leite demonstraram que sua ação protetora é significativa tanto para o leite desnatado quanto para o leite integral (ALMQUIST et al., 1954; FOOTE et al., 2002), inferindo que os lipídeos, ausentes no leite desnatado, não oferecem proteção ao espermatozoide durante o armazenamento ou criopreservação (BERGERON & MANJUNATH, 2006).

A partir do fracionamento do leite cru utilizando-se técnicas de microfiltração, ultrafiltração, diafiltração e liofilização, desenvolveu-se o estudo de meios diluentes utilizando frações purificadas do leite agindo de acordo com a sua capacidade de preservação do sêmen (BATTELLIER, 1997) (Figura 1).

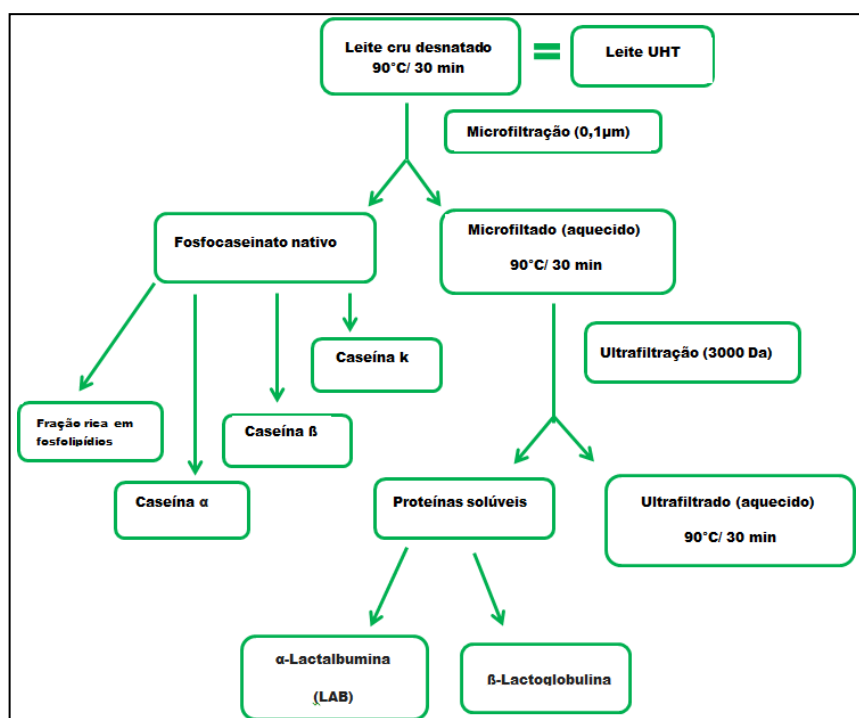


Figura 1: Processo de obtenção de diferentes frações do leite por microfiltração. Adaptado de Batellier (1997).

Posteriormente ao fracionamento foi encontrada uma fração com alto potencial protetor, chamado de fosfocaseinato nativo, que foi repartido em quatro subdivisões (caseína α , caseína β , caseína k e fração rica em fosfolípidios) α lactalbumina e β lactoglobulina (Figura 2) (BATELLIER, 1997).

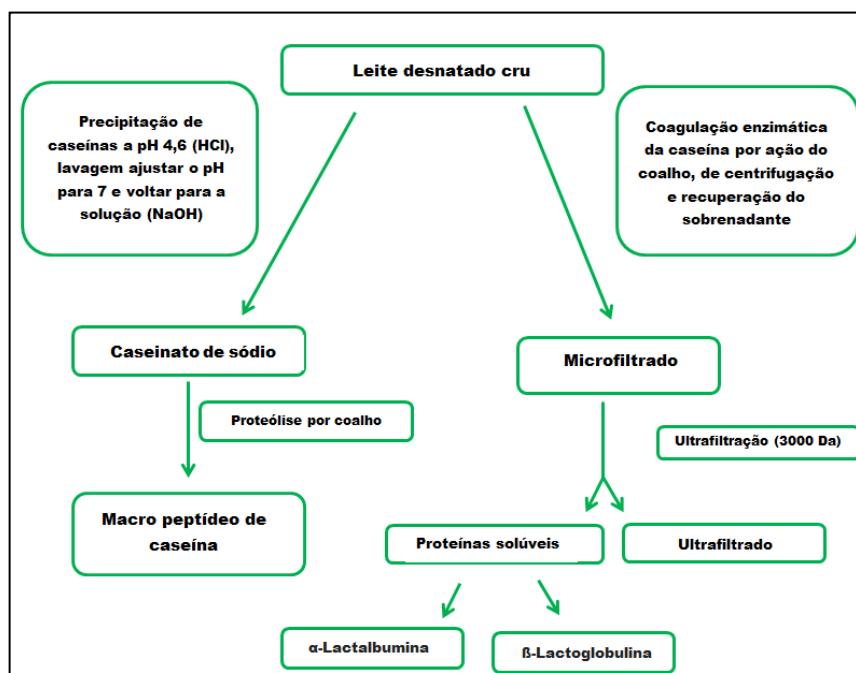


Figura 2: Obtenção do caseinato de sódio a partir do leite cru desnatado. Adaptado de Batellier (1997).

Utilizando a caseína ácida seca como matéria prima e realizando modificações no processo já feito no leite cru se observou a sintetização do caseinato de sódio, forma não micelar da caseína (BATELLIER, 1997; BARRAQUIO; VAN DE VORT, 1991).

Ganhando um destaque entre diversos compostos do leite, o fosfocaseinato apresentou desempenho efetivo no processo de congelação do sêmen, devido sua forte ligação com íons de Ca^{++} mostrando capacidade de proteção à membrana plasmática (HOCHACHKA, 1986; PAGL et al., 2006). Em estudo realizado por Batellier (1997), com objetivo de testar um meio que conferisse melhor qualidade na proteção as células espermáticas, realizou-se a comparação entre um meio com proteínas solúveis (originada do leite cru), fosfocaseinatos nativos e meio base contendo solução de sais de Hank's, glicose, lactose e com a adição de caseína β e verificou-se melhor capacidade protetora do fosfocaseinato nativo, no entanto apresentou resultados similares ao fosfocaseinato ativo o caseinato de sódio em relação ao processo de refrigeração por 96 horas.

Dessa maneira, a hipótese é que as micelas de caseínas oferecem proteção ao sêmen durante a congelação de sêmen de cavalos, ovinos e bovinos (CHOONG & WALES, 1962; MARTIN, 1966; BATELLIER et al., 1997). Entretanto, ainda não foram elucidadas como as micelas de caseínas protegem

o espermatozoide durante o processo de congelação (BERGERON & MANJUNATH, 2006).

2.4.3 Atuação das caseínas frente às proteínas do plasma seminal

Proveniente das glândulas sexuais acessórias, testículos e epidídimo, o plasma seminal compõe a porção fluida do sêmen durante a ejaculação. Tem como função o transporte e proteção das células espermáticas, sendo de extrema importância na monta natural, principalmente em ovinos e bovinos, onde o ejaculado é disposto direto na vagina (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

As proteínas do plasma seminal desempenham inúmeras funções referentes à fertilidade do macho participando do transporte espermático no momento da ejaculação e regulando a capacitação espermática (THÉRIEN et al., 1998). No trato reprodutor da fêmea, fornece nutrientes aos espermatozoides, além de proteção e participam da reação acrossomal (KILLIAN et al., 1993; YANAGIMACHI, 1994; BELLIN, 1998). Contudo, alguns efeitos do plasma seminal já foram descritos como prejudiciais, visto que diminuíram a atividade da célula espermática e a motilidade em bovinos no momento em que entraram em contato com o espermatozoide (DOTT; 1974; BASS et al., 1983).

Comparando o sêmen de ovinos com alta e baixa taxa de fertilidade, foi observada a presença inúmeras proteínas altamente expressas atuando no funcionamento dos espermatozoides. As principais proteínas são pertencentes à família *Binder of Sperm Proteins* (BSP's), como a *Ram Seminal Vesicles Protein* (RSVP) (FERNANDEZ-JUAN et al., 2006; SOUZA et al., 2012).

As BSP's atuam se ligando ao espermatozoide no momento da ejaculação promovendo a desestabilização da membrana espermática, devido ao efluxo de colesterol, sendo esse um dos requisitos para o início da capacitação espermática (MANJUNATH e THÉRIEN, 2002). No oviduto, as BSP's auxiliam na interação entre o espermatozoide ao epitélio uterino (GWATHMEY et al., 2006). A ação das BSP's é contraditória, uma vez que essa desestabilização causa a remoção de lipídeos da membrana deixando-a mais sensível ao choque térmico, tornando-se um fator prejudicial durante a congelação de sêmen (MANJUNATH et al., 2007). Todavia, o efeito das BSP's é dose dependente,

sendo a exposição contínua prejudicial à membrana (MANJUNATH; THÉRIEN, 2002).

Já foi demonstrado que variações individuais entre machos ovinos em relação às proteínas do plasma seminal tem sido a justificativa para alterações que comprometam a viabilidade e fertilidade destes (O'MEARA et al., 1997), sendo diferenças observadas entre as raças de ovinos em relação aos parâmetros seminais ocasionadas por alterações do diâmetro testicular (MAIA et al.; 2011).

Ainda não está muito bem esclarecido qual o mecanismo de atuação das caseínas sobre as células espermáticas. Contudo, foi constatada que as BSP's têm capacidade de ligação a moléculas presentes em diluentes a base de gema de ovo e leite (MANJUNATH et al., 2002; LUSIGNAN et al., 2011), sendo as micelas de caseínas provavelmente responsáveis pela proteção do espermatozoide quando utilizado diluentes a base de leite (BERGERON & MANJUNATH, 2006).

Vários estudos demonstram que as micelas de caseínas obtidas do leite podem proteger os espermatozoides de garanhões, cabritos e carneiros durante o armazenamento do sêmen a temperaturas de 4 a 5 °C. (CHOONG & WALES, 1962; MARTIN, 1966; O'SHEA & WALES, 1966; BATELLIER et al. , 1997; LEBOEUF et al., 2003).

Essa interação entre as micelas de caseína e as BSP's conhecida como sequestro, inibe a ação prejudicial ocasionada pela alta concentração de BSP's do plasma seminal, podendo então evitar o efluxo de colesterol da membrana espermática atuando de maneira positiva nos processos de criopreservação do sêmen (BERGERON & MANGUNATH, 2006; LUSIGNAN, et al., 2011), mantendo a viabilidade e motilidade espermática (BERGERON et al., 2007).

Além da função de reduzirem as perdas de lipídeos da membrana espermática, as micelas de caseínas também mantêm sua função preservada durante a estocagem, indicando assim que as proteínas do leite em interação com as proteínas do plasma seminal são a base da proteção do espermatozoide (MANJUNATH, 2012)

As micelas de caseína e as proteínas do soro do leite que conferem a real função de proteção, atuando seja por interação proteína com proteína ou

proteína com caseína, se deve a utilização do leite desnatado com participação de lipídeos ou lipoproteínas (LPL). Quando realizado o armazenamento do sêmen, as caseínas e outras proteínas do leite (α lactoalbumina e β lactoglobulina) interagem com as BSPs, com diferentes afinidades, prevenindo efeitos danosos ocasionados pelo plasma seminal (LUSIGNAN, et al., 2011).

Quando comparado aos extensores à base de Tris e gema de ovo, os diluentes a base de leite desnatado apresentaram resultados satisfatórios em ovinos (ARI et al., 2011) supondo que a caseína contida no leite possa ser mais eficiente para a proteção dos espermatozoides durante a criopreservação (ALLAI et al., 2015). O leite desnatado também se mostrou eficiente e com resultados superiores ao Tris quando adicionado a espermatozoides colhidos de epidídimo de ovinos (ALI MEHR & ATAYI, 2016).

Redução de danos gerados pelo processo de congelação do sêmen suíno foi observado utilizando a caseína, notando uma diminuição da atividade das caspases e manutenção da integridade do DNA (COUTINHO DA SILVA, et al 2012) Tatemoto e colaboradores (2015), demonstraram em estudo com fertilização "*in vitro*" que a adição da caseína aumentou a taxa de clivagem em suínos.

Todavia, as ações da caseína quando adicionada a meios de congelação devem continuar sendo testados (DELL VALE et al., 2013).

2.5 Avaliação do Espermatozóide Ovino

O espermatozoide é uma célula altamente especializada produzida por meio de um processo contínuo caracterizado por fases que ocorre nos túbulos seminíferos no testículo, sendo esse processo chamado de espermatogênese (EDDY et al., 2003). Este processo é dividido em três fases: a fase espermatocitogênica, onde acontecem divisões mitóticas das células primordiais conhecidas como espermatogônias (fase proliferativa), a fase meiótica, onde se tem a redução do número de cromossomos resultando em células haploides e a fase de diferenciação, ou espermiogênica, o que consiste em alterações morfológicas em que as espermátides se diferenciam em espermatozoides, sendo estes liberados no interior dos túbulos seminíferos em um processo conhecido como espermição (GARNER; HAFEZ, 2004).

Este é dividido em partes: cabeça, colo e cauda. A cabeça é composta por um núcleo haploide e pela presença de acrossoma. Este núcleo contém DNA enrolado sob a forma de nucleoproteínas, sendo a cabeça responsável pela proteção do material genético (SOLDI & BOLNADI, 2013). O colo, localizado entre a cabeça e a cauda, possui a finalidade de armazenamento dos centríolos (EDDY et al., 2003).

Quando comparado a outras espécies, o espermatozoide ovino possui particularidades como uma taxa maior de ácidos graxos poli-insaturados e saturados (DARIN-BENNETT & WHITE, 1977), sendo a relação entre colesterol e fosfolípidios menor nessa espécie (DARIN-BENNETT & WHITE, 1977; BICUDO et al., 2009). Além disso, os ácidos graxos poli-insaturados da membrana espermática tem influência na fluidez dos lipídios, sendo sugeridos como o principal responsável pela susceptibilidade ao choque térmico que causa injúria e desorganização da membrana, e uma maior atuação de radicais livres (WATSON, 1981; WHITE, 1993; OLLERO et al., 1998; BICUDO et al., 2009).

Essas particularidades do espermatozoide ovino levam a diminuição da atividade respiratória e a uma criocapacitação elevada (MONREAL, et al., 2014), de modo que este está sujeito a sofrer crioinjúrias durante o processo de congelação, como a peroxidação dos fosfolípidios de sua membrana plasmática, gerando alterações estruturais extensas principalmente na região acrossomal, o que leva a uma perda irreparável da motilidade espermática e ocasiona alterações estruturais, especialmente na região acrossomal, modificações no metabolismo da célula e do conteúdo intracelular (JONES & MANN, 1977).

Em estudo realizado por Parks & Hammerstedt (1985), com a finalidade de comparar a quantidade de lipídios encontrados na membrana plasmática de espermatozoides de carneiros da porção anterior da cabeça, já que esta região tem grande importância fisiológica devido a sua ligação com a reação acrossomal e capacitação e também a sua predisposição a sofrer danos durante o processo de congelação. Estes mesmo autores obtiveram como resultados mudanças distintas na composição lipídica da membrana plasmática que cobre o acrossoma dos espermatozóides de carneiro em maturação. Para avaliar tais danos ocasionados pelo processo de criopreservação é realizado análises do sêmen.

2.5.1. Análise Computadorizada do Sêmen (Computer-assisted semen analysis – CASA)

Um método de baixo custo empregado para realizar avaliação da motilidade e da porcentagem de células móveis de sêmen é análise indireta usando a microscopia óptica, uma técnica simples, mas que pode ter variações (MALMGREN, 1997; VERSTEGEN et al., 2002).

Na busca de uma tecnificação e uma objetividade nessa avaliação, diferentes métodos têm sido empregados, sendo um deles o método de análise computadorizada do movimento espermático – “computer-assisted semen analysis” (CASA). Por ser um sistema automático e computadorizado, realiza captura de várias imagens como se fossem fotos em diferentes campos da lâmina observada, sendo que a junção destas imagens forma um filme com o trajeto de cada célula espermática.

Essas fotos são tiradas por um sistema de computador com um estroboscópio acoplado, onde um software faz a junção das imagens, a digitaliza e forma o vídeo (AMANN & KARTZ, 2004). Marcações são realizadas em cada foto durante o trajeto realizado por onde passa a cabeça do espermatozoide, mesmo com a presença do flagelo que impulsiona o espermatozoide, o sistema avalia somente o movimento da cabeça, por ser tecnicamente mais fácil de acompanhar o movimento. (AMANN & KARTZ, 2004).

O computador é programado para cada espécie animal com uma micrometragem máxima e mínima, sendo considerado o espermatozoide como objetos de tamanhos dentro dessa faixa pré-determinada. Se forem observadas partículas com tamanho abaixo do mínimo pré-determinado, são consideradas parte do fundo e não são contadas (MORTIMER & MAXWELL, 1999). Logo após a identificação do espermatozoide, há a união dessas fotos e assim traça-se a trajetória de cada célula espermática, que são classificadas de acordo com o movimento padrão definidos como imóvel, linear rápido, linear lento e móvel não progressivo (MORTIMER & MAXWELL, 1999).

Este método possibilita obter informações mais expressivas com relação à cinética da célula espermática e uma avaliação de forma mais objetiva e correta da motilidade espermática, apontando também as porcentagens de células móveis, a quantificação e as características específicas do movimento dos espermatozoides (GARNER, 1997; MORTIMER, 1997; COX et al., 2006).

Estudos apontaram uma relação de significância entre a motilidade do espermatozoide e a taxa de fertilidade a campo (KJAESTAD et al., 1993, CORREA et al., 1997), mas diferente das outras espécies de animais de criação, o sistema CASA demorou um pouco mais para ser utilizado na espécie ovina. Robayo et al. (2008) estudaram a relação entre os padrões de motilidade analisados pelo CASA e a migração dos espermatozoides de carneiros no muco cervical de ovelhas, os mesmos relatam que a VAP e a VCL indicaram ser os únicos parâmetros cinéticos que tiveram correlação positiva com a capacidade de migrar desses espermatozoides no com das ovelhas. Sugerindo que esses parâmetros específicos, são características importantes para que haja capacidade desses espermatozoides em migrar através deste muco e concluir seu processo de fertilização.

2.5.2. Integridade de Membrana Plasmática e Acrossomal

Essencial na hora da fecundação, a membrana espermática é uma estrutura especializada e exerce funções biológicas, como depósito de energia altamente concentrado por serem moléculas alimentares e também favorecem a sua integridade estrutural (ARRUDA et al., 2011).

A integridade de membrana do espermatozoide ovino é rapidamente diminuída na descongelação do sêmen, já a motilidade não é tão afetada. Aproximadamente 30% dos espermatozoides ovinos apresentam lesão na membrana plasmática mesmo mantendo boa motilidade após processo de congelação e descongelação (VALCÁRCEL et al., 1994).

O uso de corantes fluorescentes, conhecidos como sondas, têm sido utilizadas para avaliação espermática, sendo estas capazes de identificar condições subcelulares, mostrar alterações metabólicas e estruturais das células e de seu interior (SOUSA et al., 2012). A leitura dessas alterações que foram marcadas pelas sondas fluorescentes pode ser avaliada em citômetro de fluxo ou em microscópio de fluorescência. A vantagem da citometria de fluxo é que é possível avaliar, contar e classificar células em uma solução aquosa e possível também realizar associações de diferentes sondas fluorescentes de forma imparcial, com incomparável sensibilidade, rapidez e precisão em um número de células relevante estatisticamente (CORDELLI et al., 2005).

Para que haja fertilização eficiente é necessário que o espermatozoide possua integridade de membrana plasmática e acrossoma. Um evento essencial é a reação acrossômica onde ocorre a liberação de enzimas acrossômicas fundamentais para que haja a fusão do espermatozoide com membrana plasmática do oócito e respectiva penetração na matriz extracelular da zona pelúcida (FLESH & GADELLA, 2000; JUHÁSZ et al., 2000; CELEGHINI et al., 2007). A reação acrossomal envolve uma série de eventos diversificados, polimerização da actina, influxo de cálcio, inativação ou a ativação das proteínas devido a fosforilação da tirosina, elevação do pH (SIDDIQUE E ATREJA, 2012), além de alterações no citoesqueleto dos espermatozoides (BREITBART et al., 2005).

A integridade do acrossoma é verificada pelo preenchimento fluorescente da matriz acrossomal de espermatozoides com acrossoma lesado por lecitinas marcadas. As lecitinas se ligam especificamente as cadeias de carboidratos e glicoproteínas presentes no acrossoma (GRAHAM et al., 1990), sendo as mais utilizadas a aglutinina do *Pisum sativum* (PSA), da *Arachis hypogea* (PNA) e da *Concanavalia ensiformis* (ConA). (JUHÁSZ et al., 2000; GRAHAM, 2001; SILVA & GADELLA, 2006; CELEGHINI et al., 2007; RAPHAEL, 2007).

Quando associada ao isotiocianato de fluoresceína (FITC-PSA) a aglutinina PSA, cora com eficácia o acrossoma lesado na coloração verde amarelado facilitando a identificação e utilizado em diferentes espécies para corar espermatozoides (GRAHAM et al., 1990; CELEGHINI, 2005; ARRUDA et al., 2007; RAPHAEL, 2007).

2.5.4 Estresse Oxidativo

Os espermatozoides de ovinos, quando comparado a outras espécies, é o que mais tem sensibilidade à lesão por estresse oxidativo devido a sua menor razão molar de colesterol para fosfolipídios em relação a sua taxa de ácidos graxos poli-insaturados (COYAN et al., 2012). A espécie ovina gera altos níveis de peróxido de hidrogênio, ocasionado principalmente pelas grandes quantidades de ácidos graxos poliinsaturados / saturados e baixas proporções de colesterol / fosfolipídios na membrana plasmática, quando comparados com outras espécies. Assim essa relação leva a uma maior vulnerabilidade aos danos causados pelas espécies reativas de oxigênio e

consequentemente perda da integridade da membrana e do acrossoma (ALVARES E STOREY, 1992). Quando a célula espermática utiliza o metabolismo oxidativo como fonte de energia principal gera uma enorme quantidade de metabólitos ativos de oxigênio, isto é, as espécies reativas de oxigênio (EROS) (SILVA, 2006). Este termo é utilizado para identificar os intermediários reativos causados pelo metabolismo do oxigênio, tendo como exemplos: o radical superóxido (O_2^-), o radical hidroxila (OH^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (MAIA & BICUDO, 2009).

Além disso, devido ao pequeno tamanho dos espermatozoides, estes, não têm presença de citoplasma suficiente para segurar o equilíbrio entre os sequestradores de espécies reativas de oxigênio (EROs) e os geradores de EROs (SHAFIEI et al., 2015). Para a manutenção funcional das células espermáticas é fundamental a presença de ácidos graxos, mas o aumento das taxas de EROs levam a alterações nas funções das mitocôndrias e afetam a motilidade espermática (HENKEL, 2005; DU, 2009).

A capacidade antioxidante do sêmen e o excesso de produção de EROs, leva a alterações nas funções da própria célula espermática como a capacidade fecundante, a motilidade, peroxidação dos lipídios da membrana plasmática e inibição do metabolismo (GUERRA et al, 2004).

Para averiguação da peroxidação lipídica da membrana pode-se utilizar sondas fluorescente lipofílicas. Entre essas sondas a mais utilizada é um análogo de ácido graxo, o ácido-parinárico (cis-PnA), no entanto ele se torna mais susceptível a peroxidação lipídica, quando comparado aos ácidos graxos biológicos. Outras sondas fluorescentes podem ser utilizadas, sendo elas sondas que derivam de lipídios e fluoresceína (PAP et al, 1999; BALL; VO, 2002).

A sonda fluorescente BODIPY® 581/591 C₁₁ (C11-BODIPY^{581/591}- Molecular Probes®) incorpora membrana celular e tem sido utilizada de uma maneira bem prática na identificação de peroxidação lipídica e oxidação das células vivas, inclusive dos espermatozoides. Essa sonda pode ser utilizada em qualquer aparelho com leitor a *laser*, assim como na citometria de fluxo (BALL; VO, 2002; BROUWERS; GADELLA, 2003; NEILD et al., 2005).

2.6 Teste de fertilidade

A cérvix da ovelha é longa, fibrosa e tubular. Caracteriza-se por possuir espessa parede e luz constricta, com o canal cervical formada por várias proeminências de forma transversa ou espiralada, com saliências fixas conhecidas como anéis anulares (de três a oito anéis), medindo cerca de 4 a 7 cm de comprimento (SILVA et al., 2005). Essa anatomia dificulta a passagem da pipeta de inseminação pela cérvix, é um dos principais fatores que limita a propagação da inseminação artificial na espécie ovina (OLIVEIRA, 2009).

Para que haja seleção e rápido melhoramento genético de diferentes espécies uma das biotécnicas utilizada nos dias de hoje é a inseminação artificial (IA). Essa técnica gera centenas de animais selecionados por estação reprodutiva, devido à congelação de sêmen de animais de alta qualidade genética para a utilização em protocolos de inseminação artificial (O'MEARA et al., 2008).

A inseminação artificial em tempo fixo (IATF) surgiu com intuito de facilitar o manejo, devido ao fato de não necessitar a observações de cio, além de ser uma importante técnica para o melhoramento genético do rebanho (BICUDO, 2016). A IATF consiste em sincronização do estro e ovulação utilizando protocolos farmacológicos hormonais, com aplicações de gonadotrofina coriônica equina (eCG), de prostaglandina e utilização de implante de progesterona (P4) um dos protocolos muito usados para realização da técnica. (LEÃO, 2009). Apesar disso, diferentes tipos de protocolos e variações são comumente usados, com mudanças na duração, horário de aplicação, uso ou não de prostaglandinas, dose, via de administração de progestágenos e momento de aplicação de gonadotrofinas (FONSECA, 2016).

Uma técnica muito utilizada atualmente é a inseminação artificial por laparoscopia, ela foi descrita pela primeira vez em 1992 por Killen e Caffrey. O uso da técnica de inseminação artificial por laparoscopia (IAL) consiste na deposição de sêmen intrauterino tem sido estudado mais afundo e aperfeiçoada cada dia mais, com intuito de minimizar a limitação com relação à passagem da cérvix. É uma técnica menos invasiva do que uma cirurgia convencional (EVANS et al., 2004 ; ANEL et al., 2006), tem obtido resultados elevados e a utilização do sêmen se torna mais eficiente quando comparado a IA transcervical ou outras técnicas (STEFANI et al. 1990 ; FANTINATI et al., 2005 ; SHIPLEY et

al., 2007) . A laparoscopia é uma técnica que exige mão de obra especializada e equipamentos de trabalho caros, em consequência disso à implantação da mesma em um rebanho necessitará da relação de custo benefício proporcionado e do manejo adotado para o rebanho (ANEL et al., 2006).

O sêmen utilizado para a IAL pode ser fresco, refrigerado ou congelado, sendo os dois primeiros com melhores índices de fertilidade (BICUDO et al., 2005). A taxa de fecundação realizando o emprego desta técnica associada com a utilização do sêmen congelado é maior do que a taxa quando se utiliza a inseminação artificial transcervical (BICUDO et al., 2003) e as taxas de ovelhas prenhas usando a técnica inseminação por laparoscopia também são altas (LUTHER, 2008).

Grandes índices convincentes de fertilidade a campo no uso da IATF foram relatados por Medeiros et al. (2002) e Almeida et al (2008).Esses autores também mostram diferentes momentos onde houve a utilização da inseminação artificial (IA) comercial, mostrando que a IAL é muito melhor por ter resultados mais satisfatórios de fertilidade em programas comerciais. Mesmo que IAL seja um procedimento semi-cirúrgico e necessite de mão de obra especializada e materiais caros, a técnica de depositar o sêmen direto no corno uterino apresentou índices mais elevados de fertilidade em pequenos ruminantes comparados as demais técnicas. (KILLEN; CAFFREY, 1982; MYLNE et al., 1997; MEDEIROS et al., 2002).

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como ferramenta importante para a evolução na congelação do sêmen ovino, o uso de diluentes definidos é de grande responsabilidade e muito respeitável para a reprodução ovina. Meios à base de gema de ovo tem sido muito utilizada em diferentes espécies para o processo de congelação. A adição de caseinato de sódio a esses meios tem apresentado vantagens em estudos realizados em bovinos e equinos com sêmen congelado. Deste modo apresentando eficiência em melhorar a qualidade das células espermáticas, protegendo os espermatozoides dos danos causados pelo processo e consequentemente aumentando a taxa de fertilidade, podendo assim valorizar a utilização do sêmen congelado e suas praticidade no emprego da técnica de

Inseminação artificial por laparoscopia elevando o conhecimento e demonstrando suas vantagens entre os produtores e criadores.

4. REFERÊNCIAS*

ALBERTS, B.; BRAY, D.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Membrane Structure. In: **Molecular Biology of the Cell**. 3 ed.: Garland Publishing, New York, Cap. 10, p. 478-506, 1994.

ALI MEHR, M. A.; ATAYI, M. Effect of different extenders on recovery and storage of epididymal ram spermatozoa. **Iranian Journal of Veterinary Science**, v. 8; n. 2, p.1-9, 2016.

ALLAIA, L.; DRUARTC, X.; CONTELLD, J.; LOUANJLIE, N.; MOULAA, A. B.; BADIA, A.; ESSAMADIB, A.; NASSERB, B.; EL AMIRIA, B. Effect of argan oil on liquid storage of ram semen in Tris orskim milk based extenders. **Animal Reproduction Science**, v. 160, p. 57–67, 2015.

ALMEIDA, V.M.; PEÑA-ALFARO, C.E. **Iseminação artificial em tempo fixo em cabras togenburg**: avaliação de protocolo de sincronização de estro com onze dias de progesterona, In: Congresso Internacional de Caprinos e Ovinos. FEINCO, 5, 2008, São Paulo. Anais. 2008

ALMIQUIST, J.O; FLIPSE, R.J.; THACKER, D.L. Fertility of bovine spermatozoa in heated fomogenized milk and skim milk. **Journal of Dairy Science**, Champaing, v.37, p. 1302-1307, 1954.

ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; MEDEIROS, A.S.L. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.105-113, 2005.

ALVAREZ, J.G.; STOREY, B. T. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. **Journal of Andrology**, v. 13, n 3, p. 232–241, 1992.

AMANN, R.P.; GRAHAM, J.K. Spermatozoal Function. In: **Equine reproduction**, p. 1053, 2010.

AMANN, R.P.; GRAHAM, J.K. Spermatozoal function. In: McKinnon AO, Voss JL (Ed.). **Equine reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger,. p.715-745, 1993.

AMANN, R.P.; KARTZ, D.F. Reflections on CASA after 25 years. **J Androl**,v.25, p.317-325, 2004.

AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal Equine Vet Science**, v.7, p.145-173, 1987.

ANEL, L.; ALVAREZ, M.; MARTINEZ-PASTOR, F.; GARCIA-MACIAS, V.; ANEL, E.; DE PAZ, P. Improvement strategies in ovine artificial insemination. **Reproduction in Domestic Animals**, v.41, p.30–42, 2006.

ANTON, M.; BELHOMME, C.; SIRVENTE, H., et al. What are the keypoints to understand the physicochemical and biological activities of egg compounds? In: European Poultry Symposium on Quality of Poultry Meat 19, European Symposium on the Quality of Eggs and Egg Products 18, 2009, Turku, Finland.

ARI, U.C., KULAKSIZ, R., OZTURKLER, Y. Freezability of tushin ram semen extended with goat or cow milk based extenders. **Reproduction in Domestic Animals**, v.46, p.975–979, 2011.

ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; PERES, K.R. et al. Biotécnicas aplicadas à avaliação do potencial de fertilidade do sêmen eqüino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 1, p. 8-16, 2007.

ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C.; ALONSO, M.A.; CARVALHO, H.F.; OLIVEIRA, L.Z.; NASCIMENTO, J.; SILVA, D.F.; AFFONSO, F.J.; LEMES, K.M.; JAIMES, J.D. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, p.145-151, 2011.

ASHWOOD-SMITH, M.J. Mechanisms of cryoprotectant action. **Symp Soc Exp Biol**, v.41, p.395-406, 1987.

AZEVEDO H.C.; MACHADO R.; SIMPLÍCIO A.A.; SOARES A.T. Características do sêmen caprino congelado: influência do tipo de palheta e concentração espermática. **Rev. Cient. Rur.** 5(2): 148157, 2000.

BAG, S.; JOSHI, A.; NAQVI, S.M.K.; MITTAL, J.P. Effect of post-thaw incubation on sperm kinematics and acrossomal integrity of ram spermatozoa cryopreserved in medium-sized French straws. **Theriogenology**, v.62, p.415-424, 2004.

BAILEY, J.L.; BILODEAU, J.F.; CORMIER, N. Semen, cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. **J. Androl.**, v.21, p.1-6, 2000.

BALHORN, R. The protamine family of sperm nuclear proteins. **Genome biology**, v. 8, n. 9, p. 227, 2007.

BALL, B.A.; VO, A. Detection of lipid peroxidation in equine spermatozoa based upon the lipophilic fluorescent dye C11-BODIPY581/591. **Journal of Andrology**, v.23, p.259-269, 2002.

BARRAQUIO, V.L.; VAN DE VOORT, F.R. Sodium caseinate from skim milk powder by extrusion processing: physicochemical and functional properties. **Journal of Food Science**, v. 56, n. 6, p. 1552-1556, 1991.

BARRETO, S.C.S.; ZAPATA, J.F.F.; FREITAS, E.R.; FUENTES, M.F.F.; NASCIMENTO, R.F.; ARAÚJO, S.R.S.M.; AMORIM, A.G.N. Ácidos graxos da gema e composição do ovo de poedeiras alimentadas com rações com farelo de coco. **Pesq Agropec Bras**, v.41, p.1767-1773, 2006.

BARTH, A. D.; OKO, R. J. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Iowa: Iowa State University: Ed. Ames, p. 285, 1989.

BARUSELLI, P. S.; REIS, E. L.; MARQUES, M. O.; NASSER, L. F.; BO, G. A. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 479-486, 2004.

BASS, J. W.; MOLAN, P. C.; SHANNON, P. Factors in seminal plasma of bulls that affect the viability and motility of spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 68, p. 275-280, 1983.

BATELLIER, F. **Identification, purification et mécanisme d'éléments contenus dans le lait, agissant sur les spermatozoïdes équin.**1997. Tese (doutorado). Sciences et Techniques, Université François Rabelais de Tours, Tours. Disponível em: Acesso em: 12 fevereiro. 2019.

BATELLIER, F.; MAGISTRINI, M.; FAUQUANT, J.; PALMER, E. Effect of milk fractions on survival of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 48, p. 391- 410, 1997.

BELLIN, M. E.; OYARZO, J. N.; HAWKINS, H. E.; ZHANG, H.; SMITH, R. G.; FORREST, D. W.; SPROTT, L. R.; AX, R. L. Fertility-associated antigen on bull sperm indicates fertility potential. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 2032-2039, 1998.

BERGERON, A.; BRINDLE, Y.; BLONDIN, P.; MANJUNATH, P. Milk caseins decrease the binding of the major bovine seminal plasma proteins to sperm and prevent lipid loss from the sperm membrane during sperm storage. **Biology of Reproduction**, v. 77, n. 1, p. 120-126, 2007.

BERGERON, A.; MANJUNATH, P. New Insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. **Molecular Reproduction and Development**, v.73, p.1338-1344, 2006.

BICUDO, S. D.; RODELLO, L.; BITTENCOURT, R.F.; MONTEIRO, C.D.; CROCOMO, L.F.; FALLEIROS, M.B.; BISCARDE, C.E.A.; OLIVEIRA, T.M. Gargalos tecnológicos na reprodução assistida em ovinos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. n.6, p.167-181, 2009.

BICUDO, S.D. **O diagnóstico ultrassonográfico de gestação em ovinos.** Disponível em<www.fmvz.unesp.br/Informativos/ovinos/repman3.htm>. Acesso em fevereiro/2019.

BICUDO, S.D.; AZEVEDO, H.C.; SILVA MAIA, M.S. *et al.* Aspectos peculiares da inseminação artificial em ovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, supl. 1, p.127-130, 2005.

BICUDO, S.D.; SOUSA, D.B.; TAKADA, L. Possibilidades e limitações da inseminação com sêmen ovino refrigerado e biotécnicas associadas como estratégias de intensificação do manejo reprodutivo. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, p.120-126, 2003.

BITTENCOURT, R.F.; OBA, E.; RIBEIRO FILHO, A.D.L.; CHALHOUB, M.; AZEVEDO, H.C.; BICUDO, S.D. Avanços na criopreservação do sêmen ovino I: diluidores e crioprotetores. **Ciência Animal Brasileira**, v.14, n.4, p.522-536, 2013.

BORTOLOZZO F.P.; BERNARDI M.L.; BENNEMANN P.E.; WENTZ I. **Inseminação artificial em suínos**. In: Gonçalves P.B. D. 2008.

BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I.; DALLANORA, D. Situação atual da inseminação artificial em suínos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, n.1, p.17-32, 2005.

BOUSSEAU, S.; BRILLARD, J.P.; MARQUANT-LE GUIENNE, B.; GUÉRIN, B.; CAMUS, A.; LECHA, T. M. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. **Theriogenology**. v.50, p.699-706, 1998.

BRAGA, C.V.P.; FUENTES, M.F.F.; FREITAS, E.R.; CARVALHO, L.E.; SOUSA, F.M.; BASTOS, S.C. Efeito da inclusão do farelo de coco em rações para poedeiras comerciais. **Revista Brasileira Zootecnia**, v.34, p.76-80, 2005.

BRANDÃO, A. C. **Efeito do laser diodo sobre as características de motilidade, de integridade de membranas plasmática e acrossomal e de potencial de membrana mitocondrial de espermatozoides criopreservados de equinos**. 2008. 87 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

BREITBART, H.; COHEN, G.; RUBINSTEIN, S. Papel do citoskeleton de actina na capacitação espermática de mamíferos e reação acrossomal. **Reprodução**, v.129, p. 263 – 268, 2005.

BROUWERS, J.F.H.M.; GADELLA, B.M. In situ detection and localization of lipid peroxidation in individual bovine sperm cells. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 35, p. 1382-1391, 2003.

CALDERAM, I.B.K.; MASCHIO, É.F.; MADEIRA, E.M.; ULGUIM, R.R.; RAMBO, G.; CORRÊA, É.K.; LUCIA, J.T.; DESCHAMPS, J.C.; CORRÊA, M.N. inseminação artificial intra-uterina em leitoas com sêmen criopreservado com dimetilacetamida e glicerol. **Ciência Rural**, v.38, p.1978-1983, 2008.

CARDOSO, F.M.; QUEIROZ, G.F. Duration of the cycle of the seminiferous epithelium and daily sperm production of Brazilian hairy rams. **Animal Reproduction Science**, v. 17, p. 77-88, 1988.

CASTRO, S. V.; CARVALHO, A. A.; SILVA, C. M. G. et al. Agentes crioprotetores intracelulares: características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e oócitos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, n. 2, p. 1-17, 2011.

CELEGHINI, E.C.C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozóides utilizando sondas fluorescentes**. 2005. 186f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária e Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo.

CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C. et al. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, n. 5, p. 479-488, 2007.

CHOONG, C.H.; WALES, R.G. The effect of cold shock on spermatozoa. **Aust J Biol Sci**, v.15, p.543–551, 1962.

CHOONG, C.H.; WALES, R.G. The use of various diluents for deepfreezing CORCINI, C.D.; GOULARTE, K.L.; BONGALHARDO, D.C.; LUCIA JR. T.; JARDIM, R.D.; VARELA JUNIOR, A.S. Effect of egg yolk plasma on dog sperm cryopreservation. **Andrologia** v.48,n.1:114– 5, 2016.

CORDELLI, E.; ELEUTERI, P.; LETER, G.; RESCIA, M.; SPANO, M. Flow cytometry applications in the evaluation of sperm quality: semen analysis, sperm function and DNA integrity. **Contraception**, v.72, p.273-279, 2005.

CORREA, J.R.; PACE, M.M.; ZAVOS, P.M. Relações entre características de espermatozóides congelados e descongelados avaliados através da análise de rotina do sêmen, testes funcionais de espermatozóides e fertilidade de touros em um programa de inseminação artificial. **Theriogenology** , v. 48 , p. 721 – 731, 1997.

COSTA, J. M. S. **Efeito da adição de antioxidantes no sêmen de carneiros sobre a qualidade espermática após descongelamento**. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus de Ciências Agrárias, Petrolina-PE.

COUTINHO DA SILVA, M. A.; SEIDEL, G. E.; SQUIRES, E. L.; GRANHAM, J. K. Effects of components of semen extenders on the binding of stallion spermatozoa to bovine or equine zonae pellucidae. **Reproduction**, v. 143, n. 5, p. 577-585, 2012.

COX, J.F.; ALFARO, V.; MONTENEGRO, V.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Computer-assisted analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm migration in cervical mucus. **Theriogenology**, v.66, p.860-867, 2006.

COYAN, K.; BUCAK, M.N.; BAVIERA, N.; TAŞPINAR, M. & AYDOS, S. A. Eergothioneine atenua o dano ao DNA do espermatozóide Merino pós-descongelado . **Small Ruminant Research** , v.106 , p.165–167, 2012.

CROSS, N. L. Role of cholesterol in sperm capacitation. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 7-11, 1998.

DARIN-BENNETT, A.; WHITE, I. G. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. **Cryobiology**, v. 14, p. 466–470, 1977.

DASKIN, A.; TEKIN, N. The effect of egg-yolk on the quality of frozen Angora buck semen. **Turk-Veterinerlik ve Hayvancilik Dergesi**, v.20, n.5, p.395-398, 1996.

DAVIS, I.S.; BRATTON, R.W.; FOOTE, R.H. Livability of bovine spermatozoa at 5, -25, and -85°C in TRIS-buffered and citrate-buffered yolk-glycerol extenders. **Journal of Dairy Science**, v.46, p.333–336, 1963.

DE KRUIF, C. G.; HOLT, C. Casein micelle structure, functions and interactions advanced dairy chemistry. In: FOX, P. F.; MC SWEENEY, P. L. H. **Advanced dairy chemistry, proteins**. 3. ed. New York: Kluwer Academic, Chap. 5, v. 1, 2003.

DEL VALLE, I., SOUTER, A., MAXWELL, W.M.C., MUINO-BLANCO, T., CEBRIÁN-PÉREZ, J. Function of ram spermatozoa frozen in diluents supplemented with casein and vegetable oils. *Animal Reproduction Science*, v. 138, 213– 219, 2013.

DEL VALLE, I.; SOUTER, A.; MAXWELL, W.M.C.; MUINO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. Function of ram spermatozoa frozen in diluents supplemented with casein and vegetable oils. **Animal Reproduction Science**, v. 138, 213– 219, 2013.

DOTT, H. M. The effects of bovine seminal plasma on the impedance change frequency and glycolysis of bovine epididymal spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 38, p. 147-156, 1974.

DU, L.Y.; CAO S.X.; GUO W. & LIU T.Z. Antioxidation of melatonin on boar semen preservation, *Jian. J. Agric. Sci.* V.25, p.315-319, 2009.

EDDY, E. M., TOSHIMORI, K., O'BRIEN, D. D. Fibrous sheath of mammalian spermatozoa. **Microscopy Research and Technique**, v.61, p.103-155, 2003.

EVANS, G.; HOLLINSHEAD, F.K.; MAXWELL, W.M.C. Preservation and artificial insemination of sexed semen in sheep. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 16, p.455–64, 2004.

FANTINATI, P.; ZANNONI, A.; BERNARDINI, C.; WEBSTER, N.; LAVITRANO, M.; FORNI, M.; SEREN, E.; BACCI, M.L. Laparoscopic insemination technique with low numbers of spermatozoa in superovulated prepuberal gilts for biotechnological application. **Theriogenology**, v.63, p.806–17, 2005.
fazenda. São Paulo: Andrei, p. 331, 2006.

FERNANDES, G. O. **Efeito de antibacterianos na qualidade espermática e na microbiota do sêmen ovino**. 2012. 75f. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília. 2012.

FERNÁNDEZ-JUAN, M. et al. Immunohistochemical localization of sperm preserving proteins in the ram reproductive tract. **Journal of Andrology**, Schaumburg, v.132, p.721–732, 2006.

FERNÁNDEZ-JUAN, M.; GALLEGO, M.; BARRIOS, B.; OSADA, J.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A.; MUIÑO-BLANCO, T. Immunohistochemical localization of sperm preserving proteins in the ram reproductive tract. **Journal of Andrology**, Schaumburg, v.132, p. 721-732, 2006.

FLESCH, F. M.; GADELLA, B. M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1469, p. 197-235, 2000.

FLESCH, F.M.; GADALLENA, B.M. Dynamics of the mammalian sperm membrane in the processo of fertilization. *Biochimica et Byophysica Acta*, v.1469, n. 3, p. 197-235, 2000.

FONSECA, J.F. **Otimização da eficiência reprodutiva em caprinos e ovinos**. Embrapa caprinos. Disponível em acessado em fevereiro-2019.

FOOTE, R.H.; BROCKETT, C.C.; KAPROTH, M.T. Motility and fertility of bullsperm in whole milk extender containing antioxidants. **Animal Reproduction Science**, v.71, p13–23, 2002.

FOULKES, J.A. The separation of lipoproteins from egg yolks and their effect on the motility and integrity of bovine spermatozoa. **J Reprod Fertil**, v.49, p.277-284, 1977.

FURST, R. **Efeito de diferentes tempos de equilíbrio, taxas de congelamento e concentrações espermáticas na fertilidade do sêmen equino**. 2006, 96f Tese (Doutorado) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG: 2006.

GARCIA, B. M.; FERNANDEZ, L. G.; FERRUSOLA, C. O.; SALAZAR-SANDOVAL, C.; RODRIGUEZ, A. M.; MARTINEZ, H. R.; TAPIA, J. A.; MORCUENDE, D.; PENA, F. J. Membrane lipids of the stallion spermatozoon in relation to sperm quality and susceptibility to lipid peroxidation. **Reprod. Dom. Anim.**, v. 46, p. 141-148, 2011.

GARCIA-HERREROS, M.; APARICIO, I.M.; BARON, F.J.; GARCIA MARTIN L.J.; GIL, M.C. Standardization of samples preparation, staining and sampling methods for automated sperm head morphometry analysis of boar spermatozoa. **Int J Androl**, v.29, p.553-563, 2006.

GARNER, D. L.; HAFEZ, E. S. E. Espermatozóides e plasma seminal. In: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7. ed. Barueri: Manole, Cap. 7, p. 97-110, 2004.

GARNER, D.L. Ancillary tests of bull semen quality. **Veterinary Clinics of North America**, v.13, p.313-327, 1997.

GIBBONS, A. Inseminación artificial con semen congelado en cabras da raza angora. **Revista Taurus**, v. 4, n. 16, p. 24-32, 2002.

GILLAN, L.; MAXWELL, W. M. C.; EVANS, G. Preservation and evaluation of semen for artificial insemination. **Reproduction Fertility and Development**, v. 16, p. 447-454, 2004.

GIRAUD, M.N.; MOTTA, C.; BOUCHER, D.; GRIZARD, G. Membrane fluidity predicts the outcome of cryopreservation of human spermatozoa. **Human Reproduction**, v.15, p.2160-2164, 2000.

GONZALEZ, C. I. M.; OBA, E.; BICUDO, S. D. Avaliação do sêmen ovino (*Ovis aries*) congelado em palhetas e pellets com diferentes meios diluidores In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 13., 1999, Belo Horizonte, MG, 1999. Anais... Belo Horizonte: **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 23, n. 3, p. 280-281, 1999.

GRAHAM, J. K. Principles of cooled semen. In: **international congress equine reproduction**. Oklahoma. Proceedings, p. 1308, 2010.

GRAHAM, J.K. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. **Animal Reproduction Science**, v. 68, n. 3-4, p. 239-247, 2001.

GRAHAM, J.K.; KUNZE, E.; HAMMERSTEDT, R.H. Analysis of sperm cell viability, acrossomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. **Biology of Reproduction**, v. 43, p. 55-64, 1990.

GUERRA, M. M. P.; EVANS, G.; MAXWELL, W. H. C. Papel de oxidantes e antioxidantes na andrologia (Revisão de Literatura). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 28, p. 187-195, 2004.

GWATHEMEY, T.M.; IGNOTT, G.G.; MUELLER, J.L.; MANJUNATH, P.; SUAREZ, S.S. Bovine seminal plasma proteins PDC-109, BSP-A3, and BSP-30kDa share functional roles in storing sperm in the oviduct. **Biology of Reproduction**, Madison, v.75, p. 501-507, 2006.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**. Barueri-SP: Manole, ed.7., p.513, 2004.

HENKEL R. The impact of oxidants on sperm function. **Andrologia**, v.37, p.205-206, 2005.

HERMO, L.; PELLETIER, R.M.; CYR, D.G.; SMITH, C.E. Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 2: Changes in spermatid organelles, 2010.

HESS, R. A.; FRANÇA, L. R. Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. In: CHENG, C. Y. Molecular Mechanisms in Spermatogenesis.

Series: **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.636, p.1-15, 2008.

HOCHACHKA, P. W. Defense strategies against hypoxia and hypothermia. **Science**, v. 231, p. 234-241, 1986.

HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Anim Reprod Sci**, v.62, p.3-22, 2000.

HOUPALATHI, R.; LÓPEZ-FANDIÑO, R.; ANTON, M.; SCHADE, R. **Bioactive egg compounds**. New York: Springer Verlag, p. 296, 2007.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2017

JONES, I. L.; MANN, T. Toxicity of exogenous fatty acid peroxides towards spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 50, p. 255-260, 1977.

JUHÁSZ, J.; NAGY, P.; KULCSÁR, M. et al. Methods for semen and endocrinological evaluation of stallion: a review. **Acta Veterinaria BRNO**, v.69, n. 4, p. 247-259, 2000.

KASHIWAZAKI, N.; OKUDA, Y.; SEITA, Y.; HISAMATSU, S.; SONOKI, S.; SHINO, M.; MASAOKA, T.; INOMATA, T. Comparison of glycerol, lactamide, acetamide and dimethylsulfoxide as cryoprotectants of Japanese White Rabbit spermatozoa. **J Reprod Dev**, v.52, p.511-516, 2006.

KILLEN, I.D.; CAFFERY, G.J. Uterine insemination of ewes with the aid of a laparoscope. **Australian Veterinary Journal**, v. 59, p.95, 1982.

KILLIAN, G. J.; CHAPMAN, D. A.; ROGOWSKI, L. A. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. **Biology of Reproduction**, v. 49, p. 1202-1207, 1993.

KJAESTAD, H.; ROPSTAD, E.; BERG, K.A. Evaluation of spermatological parameters used to predict the fertility of frozen bull semen. *Acta Vet. Scand.*, v.34, n.3, p.299–303, 1993.

KJAESTAD, H.; ROPSTAD, E.; BERG, K.A. Avaliação de parâmetros espermatológicos utilizados para prever a fertilidade do sêmen de touros congelados. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 34, p. 299 – 303, 1993.

KNOBIL, E.; NEILL, J. D. E. U. O. A. E., 2006. 3191P. Knobil and Neill's physiology of reproduction. 3. United of America: Elsevier, 2006.

LEÃO, K.M. **Técnicas de Inseminação Artificial**. 2009. Trabalho apresentado durante a disciplina Seminário II (Monografia), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 2009.

LEBOEUF, B.; GUILLOUET, P.; BATELLIER, F.; BERNELAS, D.; BONNE, J.L.; FORGERIT, Y.; RENAUD, G.; MAGISTRINI, M. Effect of native phosphocaseinate on the in vitro preservation of fresh semen. **Theriogenology**, v.60, p.867–877, 2003.

Lecewicz, M., Strzezek, R., Kordan, W., Majewska, A. Effect of extender supplementation with low-molecular-weight antioxidants on selected quality parameters of cryopreserved canine spermatozoa. **Journal of Veterinary Research**, v.62, n. 2, p.221-227, 2018.

LOPEZ-BREA, J.G. Congelación de semen en la especie ovina: características biológicas de las dosis descongeladas. 1995. (Tese de Doutorado) Universidade de Castilla-La Mancha, Madri. Acesso em 4 de junho de 2019.

LOURENÇO, E. J. **Tópicos de proteínas de alimentos**. Jaboticabal, São Paulo: Edição Funep, Cap. 5, p.179-231, 2000.

LUSIGNAN, M. F.; MANJUNATH, P.; LAFLEUR, M. Thermodynamics of the interaction between bovine Binder of SPerm BSP1 and lowdensity lipoprotein from hen's egg yolk. **Thermochimica Acta**, v. 516, n. 1, p. 88-90, 2011b.

LUSIGNAN, M.F.; BERGERON, A.; LAFLEUR, M.;MANJUNATH, P. The major proteins of bovine seminal plasma Interact with caseins and whey proteins of milk extender. **Biology of reproduction**, v. 85, n. 3, p. 457-64, 2011a.

LUTHER, J.S. Application of laparoscopic artificial insemination techniques to the North Dakota sheep industry. *Sheep Res. Rep.*, p.24-26, 2008.

MADEIRA, E.M.; BIANCHI, I.; VIEIRA, M.B.; SCHNEIDER, A.; SEVERO, N.C.; FEIFER, L.F.M.; CORRÊA, M.N. Avaliação de diferentes crioprotetores intra e extracelulares na criopreservação de sêmen de touros. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.65(2), p.415-420, 2013.

MAIA, M. S.; BICUDO, S. D. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.33, n.4, p.183-193, 2009.

MAIA, M. S.; MEDEIROS, I. M.; LIMA. C. A. C. Características reprodutivas de carneiros no Nordeste do Brasil: parâmetros seminais. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 35, n. 2, p. 175-179, 2011.

MALMGREN, L. Assessing the quality of raw semen a review.**Theriogenology**, v. 48, p. 523-530, 1997.

MANJUNATH, P. New isights into the understanding of the mechaniiism of sperm pro by extender componentes. **Animal Reproduction**, v. o, n. 4, p. 809-815, 2012.

MANJUNATH, P.; BERGERON, A.; LEFEBVRE, J.; FAN, J. Seminal plasma proteins: function and interaction with protective agents during semen preservation. **Spermatology**, v. 65, p. 217-228, 2007.

MANJUNATH, P.; NAUC, V.; BERGERON, A.; MÉNARD, M. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 67, p. 1250-1258, 2002.

MANJUNATH, P.; THÉRIEN, I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 53, p. 109-119, 2002.

MARTIN, I.C.A. Diluents for the preservation of ram spermatozoa. Diluents used at 37°C and 5°C containing casein. **Australian Journal of Biological Sciences**, v.19, p.645-653, 1966.

MAXWELL, W.M.C.; WATSON, P.F..Recent progress in the preservation of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v.42, n.1, p. 55-65, 1996.

MCMAHON, D. J.; OOMMEN, B. S. Casein Micelle Structure, Functions, and Interactions. Cap 6, pag. 185-209. IN: McSWEENEY, P.L.H., FOX, P.F. (eds.), **Advanced Dairy Chemistry: Volume 1A: Proteins: Basic Aspects**, 4th Edition. 2012.

MEDEIROS, A.L.N.; MEDEIROS, C.H.N.; VIERIA, D.G.I.; MEDEIROS, M.N.; MONTEIRO, A.W.U.; FACÓ, O.; GUSMÃO, A.L. Inseminação artificial por laparoscopia em ovelhas mestiças em condições de campo no Sertão Central do Ceará (dados preliminares). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Suplemento, v.5, p. 84 -86, 2002.

MENEZES, E. B.; TILBURG, M. V.; PLANTE, G.; OLIVEIRA, R. V.; MOURA, A. A.; MANJUNATH, P. Milk proteins interact with goat Binder of Sperm (BSP) proteins and decrease their binding to sperm. **Cell Tissue Res**. p. 1-16, 2016.

MONREAL, A. C. D.; LIMA, N. N.; SOUZA, A. S.; SOUZA, M. I. L.; CARAMALAC, S. M.; CARAMALAC, S. M.; URT, M. A. G. Glicina Gema Leite para criopreservação de sêmen de carneiros sem raça definida. **Revista Agrarian**, v.7, n.23, p.124-131, 2014.

MORTIMER, S. T. CASA—Practical **Aspects Journal of andrology**, v. 21, n.4, p. 515-524, 2000.

MORTIMER, S.T. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. **Human Reproduction update**, v.3, n.5, p.403-439, 1997.

MORTIMER, S.T.; MAXWELL, W.M.C. Kinematic definition of ram sperm hyperactivation. **Reprod Fertil Dev**,v.11, p.25-30, 1999.

MYLNE, M.J.A.; HUNTON, J.R.; BUCKRELL, B.C. Artificial Insemination of Sheep. In: Current Therapy in Large Animal. **Theriogenology**, p. 585-597, 1997.

NEILD, D.M.; BROUWERS, J.F.H.M.; COLENBRANDER, B.; AGUERO, A.; GADELLA, B. M. Lipid peroxide formation in relation to membrane stability of fresh and frozen thawed stallion spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, v. 72, p. 230-238, 2005.

NEVES, J. P. Novas técnicas de inseminação artificial em ovinos. In: Caprinocultura e Ovinocultura. **Sociedade Brasileira de Zootecnia**, Piracicaba, p. 57-67, 1990.

NOAKES, D.E., PARKISON, T.J., ENGLAND, G.C.W. **Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics**. London: Saunders, ed.8, p.886, 2001.

NUNES, J.F. Inseminação artificial em caprinos. In: Gonsalvez, P.B.D., Figueiredo, J.R., Freitas, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Varela, p.111-125, 2002.

NUNES, J.F. Utilização da água de coco como diluidor do sêmen de animais domésticos e do homem. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.22, n.2, p.109-112, 1998.

O'MERA, C.M; HANRAHAN, J.P.; PRATHALIGAM, N.S.; OWEN, J.S.; DONOVAN, A.; FAIR, S.; WARDA, F.; WADE, M.; EVANS, A.C.O. LONERGAN, P. Relation ship between in vitro sperm functional tests and in vivo fertility of rams following cervical artificial insemination of ewes with forzen-thawed semen. **Theriogenology**, v. 69, n.4, p. 513-522, 2008.

O'SHEA, T.; WALES, R. Effect of casein, lecithin, glycerol, and storage at Condiluted ram and bull semen. **Aust .J.Biol.Sci.**, v.19, p. 871– 882, 1966.

OLIVEIRA, M.E.F. **Técnicas de inseminação artificial em ovinos e caprinos**. Acessado em fevereiro. 2019. Online. Disponível em: http://www.farmpoint.com.br/tecnicas-de-inseminacao-artificial-em-ovinos-ecaprinos_noticia_52391_3_30_.aspx.

OLIVEIRA, R.V; NUNES J.F; SALGUEIRO, C.C.M; CAVALCANTES, F.M.M; BRASIL, O.O; MOURA, A.A.A.N. Avaliação do espermatozoides caprinos congelados em meio á bas de água de cocô em pó (ACP-101 ®) ou TRIS. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária em Zootecnia**, v.6, p.1295-1302, 2011.

OLLERO, M.; BESCÓS, O.; CEBRIAN PÉREZ, J. A.; MUIÑO-BLANCO, T. Loss of plasma membrane proteins of bull spermatozoa through the freezing-thawing process. **Theriogenology**, v.49, p. 547-555, 1998.

PAGL, R.; AURICH, J. E.; MULLER-SCHLOSSER, F.; KANKOFER, M.; AURICH, C. Comparison of an extender containing defined milk protein fractions with a skim milkbase extender for storage equine semen at 5°C. **Theriogenology**, v. 66, p. 1115-1122, 2006.

PAP, E.H.; DRUMMEN, G.P.; WINTER, V.J.; KOOIJ, T.W.A.; RIJKEN, P.; WIRTZ, K.W.A.; OP DEN KAMP, J.A.F.; HAGE, W.J., POST, J.A. Ratio-fluorescence microscopy of lipid oxidadion in living cells using C11-BODIPY^{581/591}. **FEBS Letters**, v.453, p. 278-282, 1999.

PARKS, E. J.; HAMMERSTEDT, H. R. Developmental changes occurring in the lipids of ram epididymal spermatozoa plasma membrane. **Biology of Reproduction**, v. 32, p.653- 668,1985.

- PEGG, D.E. The History and Principles of Cryopreservation. **Seminars in Reproductive Medicine**, v.20, n.1, p.05- 14, 2002.
- PHILLIPS, P.H.; LARDY, H.A. A yolk-buffer pabulum for the preservation of bull semen. **Journal Dairy Science**, v.23, p.399- 404, 1940.
- PLANTE, G.; LUSIGNIAN, M. F.; LAFLEUR, M.; MANJUNATH, P. Interaction of milk Proteins and Binder of Sperm (BSP) proteins from boar, stallion and ram semen. **Reprod. Biol. Endocrinol.**, v. 13, p. 92, 2015.
- POULOS, A.; DARIN-BENNETT; A.; WHITE, I. G. The phospholipid-bound fatty acids and aldehydes of mammalian spermatozoa. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 46, p. 541-549, 1973.
- PURDY, P. H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v. 63, p. 215-225, 2006.
- QUINN, P.J.; WHITE, I.G. Chemical and ultrastructural changes in ram sperm after cold washing, shock and freezing. **Journal Reproduction Fertility**, v. 18, p.209-220, 1969.
- QUINN, P.J.; CHOW, P.; WHITE, I.G. Evidência de que o fosfolípido protege os espermatozoides do carneiro do choque frio em um local da membrana plasmática. **Journal Reproduction Fertility**, v. 60, p. 403 – 407, 1980.
- RAMON, M.; JIMENEZ-RABADAN, P.; GARCIA-ALVAREZ, O.; MAROTO-MORALES, A.; SOLER, A. J.; FERNANDEZ-SANTOS, M. R.; PEREZ-GUZMAN, M. D.; GARDE, J. J. Understanding sperm heterogeneity: biological and practical implications. **Reproduction in domestic animals**, v. 49 Suppl 4, p. 30-6, 2014.
- RAPHAEL, C.F. **Efeito da centrifugação nas características de movimento, integridade e peroxidação lipídica das membranas do espermatozóide eqüino refrigerado**. 2007. 111f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade São Paulo, São Paulo.
- RIBEIRO, B.R.C.; LARA, L.J.C.; BAIÃO, N.C.; LOPEZ, C.A.A.; FIUZA, M.A.; CANÇADO, S.V.; SILVA, G.M.M. Efeito do nível de ácido linoleico na ração de matrizes pesadas sobre o peso, composição e eclosão dos ovos. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, p.789-796, 2007.
- ROBAYO, I.; MONTENEGRO, V.; VALDÉS, C.; COX, J.F. Avaliação CASA dos parâmetros cinemáticos dos espermatozoides ram e sua relação com a eficiência da migração no muco cervical de ruminantes. **Reproduction Domestic Animal**, v.43, p. 393 – 399, 2008.
- ROSSI T.C.; PAPA F.O.; SANTOS T.B.; MACEDO L.P.; ALVARENGA M.A.; MELO C.M.; DELL'AQUA JUNIOR J.A. Efeito da utilização de diferentes crioprotetores e suas associações no processo de congelamento de sêmen eqüino com meio MP50. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, n.3, p.350-352, 2003.

RUBIO-GUILLÉN, J.; GONZÁLEZ, D.; GARDE, J. J.; ESTESO, M. C.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M. R.; RODRÍGUEZ-GÍL, J. E.; MADRID-BURY, N.; QUINTERO-MORENO, A. Effects of Cryopreservation on Bull Spermatozoa Distribution in Morphometrically Distinct Subpopulations. **Reproduction in domestic animals**, v. 42, 2007.

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. **Animal. Reproduction. Science**, v.62, p.77-111, 2000.

SENGER, P. L. Endocrinology of the male and spermatogenesis. In:_. Pathways to pregnancy and parturition. 2ed. Moscow: Current conceptions, Inc, cap.10, p. 214- 239, 2003.

SHAFIEI, M.; FOROUZANFAR, M., HOSSEINI, S.M., ESFAHANI, M.H.N. Efeito da superóxido dismutase mimética e catalase na qualidade do sêmen de caprinos pós-caudo. **Theriogenology**, v. **83**, p.1321-1327. 2015.

SHIPLEY, C.F.B.; BUCKRELL, B.C.; MYLNE, M.J.A.; POLLARD, J.; HUNTON, J.R. Artificial insemination and embryo transfer in sheep. In: Youngquist RS, Threlfall WR (eds). Current Therapy in Large Animal **Theriogenology**, v. 2.p 629–41. Saunders Elsevier, St. Louis, MO, USA, 2007.

SIDDIQUE , R.A.; ATREJA, S.K. Efeito do Spermine-NONOate na reação acrossoma e fosforilação da tirosina proteica associada em espermatozóides de búfalos de Murrah (*Bubalus bubalis*). **Animal Reproduction Science**, v.131, p. 81 – 87, 2012.

SILVA, J.C.; QUINTELA, A.; ANDRADE MOURA, J.C.; RESENDE, J.; MARTINS, L.; CHALHOUB, M.; RIBEIRO FILHO, A.L.; BITTENCOURT, T.; GUSMÃO, A.L. **Colheita transcervical de embriões ovinos da raça Dorper no semi-árido nordestino**. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 16, 2005, Goiânia. Anais. Belo Horizonte: CBRA, 2005.

SILVA, N. N., CASANOVA, F., PINTO, M. S., CARVALHO, A. F., & GAUCHERON, F. Casein micelles: from the monomers to the supramolecular structure. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.22, p.1-15, 2019.

SILVA, P. F. N. Physiology of peroxidation process im mammalian sperm. Doctoral Thesis, Utrecht University, Faculty of Veterinary Science, Ultrech, 177f, 2006.

SILVA, P.F.N. & GADELLA, B.M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, v. 65, p. 958–978, 2006.

SILVA, S. V.; GUERRA, M. M. P. Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 4, p. 370-384, 2011.

SINGH, A. P.; RAJENDER, S. CatSper channel, sperm function and male fertility. **Reproductive biomedicine online**, v. 30, n. 1, p. 28-38, 2015.

SINGH, B. K. Compêndio de andrologia e inseminação artificial em animais de

SNOECK, P.P.N. **Aspectos da criopreservação de sêmen equino: composição do meio diluidor, curvas de congelação e fertilidade.** 2003. 116f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2003.

SOLDI, M.; BONALDI, T. The proteomic investigation of chromatin functional domains reveals novel synergisms among distinct heterochromatin components. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 12, n. 3, p. 764-780, 2013.

SOUSA, D.B.; BICUDO, S.D.; AZEVEDO, H.C.; MAIA, M.S. Ranqueamento/agrupamento do sêmen congelado de carneiros da raça Santa Inês analisados pelo sistema CASA e sondas fluorescentes pela análise estatística multivariada. **Vet Zootec**, v.20, p.649-657, 2012.

SOUZA, C. E., REGO, J.P., LOBO, C.H., OLIVEIRA, J.T., NOGUEIRA, F. C., DOMONT, G. B., FIORAMONTE, M., GOZZO, F. C., MORENO, F. B., MONTEIRO-MOREIRA, A.C., FIGUEIREDO, J.R., MOURA, A. A. Proteomic analysis of the reproductive tract fluids from tropically-adapted Santa Ines rams. **Jornal of proteomics**, v.75, p.4436-4456, 2012.

SOUZA, F. A. A.; LOPES, M. A.; DEMEU, F. A. Panorama da ovinocultura no estado de São Paulo. **Revista Ceres**, v. 55, n. 5, p. 384-388, 2008.

STAUDT, N. P.; SILVA, R. O. P. Perspectivas da produção de ovinos no estado de São Paulo. **Revista Análises e Indicadores do agronegócio**, v. 3, n. 5, p. 1-4, 2008.

STEFANI, J.S.; PAHLA, M.D.C.; CHRISTMAN, L.; ROSA, J.M.; SILVEIRA, M.C .; RODRIGUES, J.L. Laparoscopic versus surgical transfer of ovine embryos. **Theriogenology** 33, 330, 1990.

TATEMOTO, H.; OSHIRO, R.; SHIMADA, H.; KONNO, T.; YAMANAKA, K.; ASHIZAWA, K. Addition of casein to the diluents during sêmen transportation improves the post-thaw qualities of okinawan native agu pig spermatozoa. **Nishihara**: Editora, p75-86, 2015.

HÉRIEN, I.; MOREAU, R.; MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 768–776, 1998.

THOMAS, A.D.; MEYERS, S.A.; BALL, B.A. Capacitation-like changes in equine spermatozoa following cryopreservation. **Theriogenology**, v.65, p.1531-1550, 2006.

VALCÁRCEL, A.; DE LAS HERAS, M. A.; PERÉZ, L.; MOSES, D.F.; BALDASSARRE, H. Fluorescent staining as a method of assessing membrane damage and post-thaw survival of ram spermatozoa. **Theriogenology**, v. 41, p. 483-489, 1994.

VALENTE, S.S.; PEREIRA, R.M.; BAPTISTA, M.C.; MARQUES, C.C.; VASQUES, M.I.; SILVA PEREIRA, M.V.C.; HORTA, A.E.M.; BARBAS, J.P. In

vitro and in vivo fertility of ram semen cryopreserved in different extenders. **Anim Reprod Sci**, v.117, p.74-77, 2010.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v.57, p.149-179, 2002.

VICENTE-CARRILLO, A.; ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ, M.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. The CatSper channel modulates boar sperm motility during capacitation. **Reproductive biology**, p. 2-10, 2016.

VIEIRA-NETO, M. F. **Efeito da flunixin meglumina na atividade espermática de machos ovinos e caprinos**. 2017. Dissertação (Mestrado - Programa de pós-graduação em Ciências Veterinárias), Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza-CE.

WALES, R. G.; WHITE, I. G. The susceptibility of spermatozoa to temperature shock. **J. Endocrinol.** v. 19, p. 211-220, 1959.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 61, p. 481-492. 2000.

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

WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the criopreservation of spermatozoa and assessment of their pos-thawing fuction. **Reproduction Fertility Development**, v.7, n.4, p.871-91, 1995.

WATSON, P.F. The causes of reduce fertility with cryopreserved semen. **Anim. Reprod. Sci**, v.60-1, p.481-492, 2000.

WHITE, I. G. Lipids and calcium uptakes of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. **Reproduction Fertility and Development**, v. 5, n. 6, p. 639–658, 1993.

YANAGIMACHI, R. Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. **Zygote**, v. 3, p. 371-372, 1994.

HIPÓTESE

Diluyente a base de gema de ovo acrescido de caseinato de sódio melhora a qualidade do sêmen congelado e o índice de fertilidade na inseminação artificial.

OBJETIVOS

Objetivo geral:

O presente estudo tem como objetivo avaliar a ação do caseinato de sódio adicionado ao meio de congelação nas características seminais e na fertilidade espermática do sêmen congelado de ovinos.

Objetivos específicos:

-Avaliar e comparar as características seminais pós-descongelação do sêmen congelado em diluentes a base de gema de ovo (BotuBov[®]) e mesmo diluyente acrescido de caseinato de sódio 2%

-Comparar a fertilidade do sêmen congelado com os diferentes diluentes pela técnica de inseminação artificial por laparoscopia.

CAPÍTULO 1

UTILIZAÇÃO DO CASEINATO DE SÓDIO NA CONGELAÇÃO DE SÊMEN OVINO

(Artigo redigido segundo as normas da revista Theriogenology

<https://www.journals.elsevier.com/theriogenology/>)

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar o emprego da adição de 2% de caseinato de sódio em meio comercial a base de gema de ovo no sêmen congelado de ovinos. Assim, utilizou-se 8 machos da raça Dorper, de cada animal foram coletados três ejaculados, sendo cada um dividido em duas alíquotas, uma congelada com meio comercial a base de gema de ovo e a outra com mesmo meio acrescido de 2% de caseinato de sódio. As avaliações pós descongelação foram realizadas no momento T0 e T90. Avaliou-se os parâmetros cinéticos através do CASA e integridade de membrana plasmática e acrossomal e estresse oxidativo por citometria de fluxo. Para o teste de fertilidade foram congelados dois animais selecionados de acordo com a qualidade seminal pós descongelamento, sendo um de inferior qualidade e outro superior. 100 fêmeas foram inseminadas por laparoscopia. No experimento II utilizou o modelo de regressão logística multivariada, diferenças foram consideradas quando $P < 0,05$ e tendências quando $0,05 < P \leq 0,01$. Com relação à cinética houve diferença estatística para os parâmetros de velocidade média de trajeto e velocidade curvilínea o grupo congelado com BotuBov e velocidade em linha reta e linearidade, o grupo acrescido de caseinato. No tempo T90 a velocidade em linha reta manteve uma tendência ($P < 0,06$) sendo dessa vez o BotuBov superior ao caseinato e no o parâmetro de linearidade o caseinato foi superior ao BotuBov. Na análise de citometria de fluxo logo após a descongelação, houve diferença estatística para células sem desestabilização de membrana, sendo o grupo com caseinato superior ao BotuBov e para as células com alto potencial mitocondrial ($P = 0,08$) e integridade de membrana plasmática e acrossomal ($P = 0,09$) o grupo com caseinato apresentou valores numéricos maiores em relação ao BotuBov, em contrapartida, este apresentou valores numéricos maiores que o caseinato na porcentagem de células com alta concentração de ânion superóxido ($P = 0,07$). Também na citometria no tempo 90 minutos mostrou diferença estatística para células com alto potencial mitocondrial e com membrana plasmática e acrossomal integras, onde o grupo com caseinato foi numericamente superior ($P = 0,06$). No teste de fertilidade não houve diferença estatística significativa em relação à taxa de prenhez entre os grupos Botu-Bov® (23%, 11/48) e caseinato de sódio (33%, 17/52 e não foram observadas diferenças entre a interação macho *versus* diluente utilizado ($p = 0,70$). Concluiu-se que independente do diluente utilizado, os parâmetros

41 seminais tendem a cair conforme passa pelo processo de congelação. Apesar
42 de não apresentarem diferenças estatísticas, os parâmetros de cinética
43 espermática mostraram-se favoráveis ao grupo contendo caseinato de sódio em
44 sua composição, assim como no teste de fertilidade, demonstrando que o uso
45 do caseinato de sódio no meio diluente pode ser uma alternativa favorável para
46 a criopreservação do sêmen na espécie ovina.
47

48 **1.Introdução**

49 Para que haja otimização da produtividade é necessária uma atenção
50 redobrada com a reprodução, investindo cada vez mais na aquisição de machos
51 com boas características reprodutivas e que consiga se adaptar ao ambiente
52 onde estão vivendo e possam ser eficientes, além disso, o investimento em
53 biotécnicas de reprodução vem com intuito de facilitar a difusão e o acesso ao
54 banco de material genético de alta qualidade [1].

55 O processo de congelação favorece a utilização dos espermatozoides por
56 tempo indeterminado, possibilita uma disseminação do material genético entre
57 longas distâncias além de reduzir custos relacionados à manutenção com os
58 reprodutores [2], mas este processo pode apresentar fatores limitantes para
59 reprodução de algumas espécies animal [3]. Durante a criopreservação do
60 sêmen ocorrem mudanças nas características espermáticas que são causadas
61 pelo frio, levando a danos irreversíveis as células [4,5].

62 A utilização de ingredientes básicos e aditivos em diluentes usados para
63 congelação do sêmen tem por finalidade fornecer proteção com o uso de
64 substratos energéticos, componentes e tampões contra danos criogênico,
65 proporcionando a sobrevivência das células durante o processo de diluição,
66 resfriamento e congelação [6,7]. Os diluidores podem conter ingredientes
67 químicos puros como também componentes de origem vegetal e animal [8]. O
68 diluente mais utilizado, principalmente no sêmen ovino, é de origem animal,
69 formulado a partir de gema de ovo, se origina de uma formulação para
70 congelação do sêmen de bovino [9].

71 Outro componente do meio diluente de origem animal muito utilizado é o
72 leite, é um meio isotônico, que contem muito componentes que auxiliam na
73 conservação e manutenção da viabilidade espermática. Sua eficácia tem sido
74 associada a sua fração proteica, que pode atuar com tampão, protegendo contra

75 mudanças de pH e agindo como sequestrador de metais pesados que possam
76 ser encontrados no encontrados nos meios [10]. Segundo Cunha [11] o leite
77 possui carboidratos em abundância que seriam usados pelo espermatozoide
78 para produzir energia. Compreende-se que o leite apresenta duas substâncias
79 responsáveis por estas características, uma é a lactose que atua como artifício
80 energético e a caseína que tem capacidade de aumentar a atividade cinética da
81 célula espermática. Em estudo Bergeron & Manjunath [12], relataram que o
82 sêmen de diferentes espécies tem sido refrigerado com eficácia utilizando
83 micelas de caseína isoladas no leite, e com a adição de glicerol tende a aumentar
84 efetivamente a qualidade de congelação do sêmen bovino. A caseína em
85 diluidores de sêmen a base de leite e de ovo, podem realizar interação entre as
86 proteínas do plasma seminal (BSP), devido a sua afinidade com essas proteínas
87 com domínios de fibronectina tipo II, de modo que e se ligam ao LDL e a caseína
88 reduzindo os efeitos prejudiciais na membrana plasmática [12].

89 A inseminação artificial em ovinos vem sido aplicada há várias décadas,
90 trazendo benefícios como exemplo o aproveitamento de um macho para um
91 número maior de fêmeas utilizando a diluição do sêmen, a utilização de machos
92 com alta qualidade genética comprovada por teste de progênie, aumentar a
93 variedade genética dentro do rebanho e também prevenir supostas doenças que
94 possam acometer o trato reprodutivo. Quando a técnica é aliada a um bom
95 protocolo de sincronização hormonal e utilizado boas tecnologias aplicadas ao
96 sêmen, a IA possibilita estações reprodutivas mais curtas, ate mesmo com
97 ovelhas sazonais, apresentando vantagens diretas na padronização dos lotes e
98 aumentando o valor dos produtos gerados.

99 Assim, esse estudo teve como objetivo avaliar a ação do caseinato de
100 sódio adicionado ao meio de congelação nas características seminais e na
101 fertilidade espermática do sêmen congelado de ovinos.

102102

103 **2. Material e métodos**

104 2.1 Aspectos éticos

105 A pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da
106 Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, a UNESP, Campus de Botucatu-

107 SP (protocolo CEUA 0243/2018) seguindo as normas do Colégio Brasileiro de
108 Experimentação Animal (COBEA).

109

110 2.2. Local do experimento

111 A congelação e avaliação seminal foram realizados no Laboratório de
112 Estudos em Biotecnologia Aplicada a Reprodução de Ovinos e Caprinos
113 localizado na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia a UNESP, Campus
114 Botucatu- SP no setor de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária. O teste
115 de fertilidade aconteceu em uma propriedade localizada no município de
116 Porangaba, latitude 23° 10' 33", longitude 48° 07' 33" e altitude 525m.

117 2.3. Animais

118 Foram utilizados oito ovinos machos da raça Dorper com idade entre 2 a
119 4 anos, alojados em baias individuais recebendo alimentação em chocho
120 composta de silagem e farelo de milho, água *ad libitum* em bebedouros e
121 suplementação com sal mineral.

122 Previamente ao início do experimento, os animais foram submetidos à
123 colheita de sêmen com finalidade de esgotar esses animais e melhorar a
124 qualidade seminal, sendo também condicionados ao uso de cabresto e ao
125 estímulo elétrico gerado pelo eletroejaculador.

126 3. Delineamento experimental

127 3.1. Colheita e Processamento do sêmen

128 As colheitas de sêmen foram realizadas por eletroejaculação durante duas
129 semanas com intervalo de 24 horas entre elas, totalizando três colheitas por
130 animal. Os animais foram imobilizados em tronco de contenção para colheita de
131 sêmen com o uso cabresto onde receberam um estímulo elétrico através do
132 eletroejaculador (Eletrojet Premium®), sendo utilizada uma fêmea em cio da
133 mesma espécie ao lado para estimulação olfativa e visual.

134 Após a colheita, o ejaculado foi analisado quanto a cinética espermática
135 através de análise computadorizada pelo sistema CASA (Hamilton Thorne
136 Research – IVOS 12, Beverly, MA, USA) utilizando o "setup" (Tabela 1) ajustado
137 para características seminais de ovinos.

138 Tabela 1 – Ajuste do equipamento de análise computadorizada dos
139 espermatozoides ovinos.

Parâmetro	Ajustes
Número de imagens adquiridas por campo	30
Contraste mínimo de células	56 pixels
Tamanho mínimo de células	6 pixels
Linearidade (LIN)	70%
Média mínima para VAP	<40,0µm/s
VAP mínimo para células progressivas	<80,0 µm/s
VSL mínimo para células lentas	<20 µm/s
Tamanho da cabeça estática	0,56 a 6,53
Intensidade da cabeça estática	0,73 a 1,32
Intensidade de Iluminação	3800
Alongamento estático	0-89
Magnificação	1,95
Temperatura	38°C

140 Abreviaturas: Velocidade de trajeto (VAP), velocidade linear (VSL).

141 Logo em seguida foi aferido o volume total em proveta volumétrica e a
142 concentração avaliada em câmara de Neubauer, para a divisão em duas frações
143 iguais de acordo com o delineamento experimental. Assim uma fração foi diluída
144 em BotuBov® (Botupharma, Botucatu, Brazil), meio comercial a base de gema
145 de ovo (BB); e outra diluída em BotuBov® acrescido de 2% de caseinato de sódio
146 (BC) (Botupharma, Botucatu, Brazil), ambas as frações diluídas em doses
147 inseminantes na concentração de 100 milhões de espermatozoides viáveis por
148 palhetas.

149 3.2 Congelação do Sêmen

150 As amostras dos 8 animais foram envasadas em palhetas francesas de
151 0,25 mL de volume, lacradas com álcool polivinílico, distribuídas em grade telada
152 e acondicionadas em refrigerador (Minitub®) à temperatura constante de 5°C
153 durante 4 horas, onde foram colocadas bolsas de tamanhos diferentes por baixo
154 e por cima dessas palhetas diminuindo a velocidade da queda de temperatura.

155 Para o processo de refrigeração utilizou-se o método adaptado de Rodello
156 [13] onde duas bolsas com volume de 200 mL de água e uma bolsa de 400 mL

157 de água, dispostas e retiradas em tempos determinados da seguinte maneira:
158 após as bolsas estarem aquecidas a 32°C, a bolsa de 400 mL ficava em baixo
159 do suporte e as outras duas em cima, após 35 minutos de refrigeração a primeira
160 bolsa de 200 mL foi removida, aos 50 minutos de refrigeração a segunda bolsa
161 de 200 mL foi retirada, por fim a bolsa de 400 mL foi removida com 60 minutos
162 de refrigeração e só então as amostras ficavam em contato direto com o suporte
163 por mais 3 horas.

164 Decorrido o período total de 4 horas de refrigeração, as palhetas de cada
165 grupo experimental foram submetidas a uma pré-congelação por 20 minutos em
166 uma caixa isotérmica de poliestireno (40 litros) sendo mantidas horizontalmente
167 em uma grade telada colocada a uma distância de três centímetros da lâmina de
168 nitrogênio líquido e, posteriormente, submersas nele depois foram colocadas em
169 raques e armazenadas no botijão criogênico.

170 3.3 Avaliação do sêmen

171 Para avaliação do sêmen as palhetas foram descongeladas por
172 submersão em água a 37°C por 30 segundos, sendo posteriormente abertas e
173 seu conteúdo, individualmente, colocado em micro tubos plásticos de 2 mL
174 previamente aquecidos a 37°C. A primeira avaliação foi realizada imediatamente
175 após a descongelação e foi denominada tempo zero (T0) e a outra análise foi
176 realizada do mesmo modo com temperatura a 37°C por 90 minutos que foi
177 designada de teste de estresse térmico (TTR/90).

178 Estas amostras após a descongelação foram avaliadas quanto à cinética
179 espermática pelo método CASA em câmara de Makler pré-aquecida a 37 °C,
180 foram avaliados cinco campos de cada amostra. Analisou-se a motilidade
181 espermática total (MT), motilidade espermática progressiva (MP), velocidade de
182 trajeto (VAP), velocidade linear (VSL), velocidade curvilínea (VCL),
183 retilinearidade (STR), linearidade (LIN) e porcentagem de espermatozoides com
184 movimento rápido (RAP).

185 Para a avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal
186 e potencial mitocondrial foi utilizado o equipamento BD LSR Fortessa (Becton
187 Dickinson, Mountain View, CA, USA) equipado com lasers de excitação: azul
188 488-nm, 100 mW e filtros de emissão 530/30nm e 695/40nm; vermelho 640-nm,
189 40 mW com filtro 660/20nm; e o violeta 405-nm, 100 mW, com o filtro 450/50nm.

190 No mínimo 10.000 células por amostra foram analisadas e os dados foram
 191 avaliados pelo software BD FACSDiva™ software v 6.1. As amostras foram
 192 diluídas em TALP-PVA (Parrish et al [14] modificado:100mM NaCl, 3,1mM KCl,
 193 25,0mM NaHCO₃, 0,3mM NaH₂PO₄, 21,6mM DL-lactato de sódio 60%,2,0mM
 194 CaCl₂, 0,4mM MgCl₂, 10,0mM Hepes-livre de ácido, 1,0mM piruvato de sódio,
 195 1,0mg/mL álcool polivinil-PVA e 25µg/mL gentamicina) na concentração de
 196 5x10⁶ espermatozoides/mL e em uma alíquota de 500 µL dessa solução foi
 197 adicionado a associação de Hoechst 33342 (H342, 7µM, Sigma - 14533), iodeto
 198 de propídio (PI, 1,5µM, Sigma - P4170) e FITC-PSA (aglutinina de Pisum sativum
 199 conjugada ao isotiocianato de fluoresceína, 2ng, Sigma - L0770) de acordo
 200 Freitas-Dell'Aqua et al. [15] e modificado pela adição da sonda MitoStatus Red
 201 (MST, 20nM, BD pharmigen - 564697) de acordo com Camargo et al.[16]. As
 202 amostras foram incubadas durante 20 min à 37°C ao abrigo da luz.

203 3.4 Teste de fertilidade

204 Com base nos resultados obtidos na análise de cinética espermática com
 205 o sêmen no pós-descongelamento, foram selecionados dois animais, sendo um
 206 deles de qualidade seminal inferior e outro com qualidade seminal superior. Os
 207 dois animais selecionados foram submetidos a uma nova congelação de sêmen.
 208 As variáveis utilizadas para classificar os animais que foram posteriormente
 209 utilizados na segunda fase do experimento foram motilidade total, motilidade
 210 progressiva e espermatozoides com movimentos rápidos.

211211

212 Tabela 2: Resultados obtidos por análise computadorizada do sêmen
 213 descongelado dos oito animais para seleção dos dois machos utilizados no teste
 214 de fertilidade:

215215

	Motilidade Total	Motilidade Progressiva	Rápidos
M 1	65.0 ± 7.7	28.7 ± 4.1	35.7 ± 5.6
M 2	57.2 ± 6.2	24.3 ± 3.1	32.2 ± 4.8
M 3	59.2 ± 5.0	25.3 ± 3.7	32.5 ± 4.9
M 4	71.8 ± 1.9	33.0 ± 2.4	40.7 ± 4.4
M 5	65.5 ± 4.3	30.2 ± 3.0	39.7 ± 4.2
M 6	68.7 ± 5.4	36.0 ± 5.4	46.3 ± 5.5

M 7	53.7 ± 5.3	23.3 ± 3.1	29.7 ± 4.1
M 8	61.5 ± 7.4	30.1 ± 4.1	40.5 ± 6.0
P	0.4859	0.2924	0.3225

216

Abreviatura: M = macho

217

218 Foram utilizadas 100 ovelhas de idade entre 12 e 24 meses, divididas em
219 quatro grupos e inseminadas aleatoriamente da seguinte maneira:

220 GRUPO 1 (n=22): ovelhas inseminadas com sêmen de qualidade inferior
221 diluídas em Botu-Bov[®];

222 GRUPO 2 (n=29): ovelhas inseminadas com sêmen de qualidade inferior
223 diluídas em Botu-Bov[®] adicionado ao meio 2% de caseinato de sódio;

224 GRUPO 3 (n=26): ovelhas inseminadas com sêmen de qualidade superior
225 diluídas em Botu-Bov[®];

226 GRUPO 4 (n=23): ovelhas inseminadas com sêmen de qualidade superior
227 diluídas em Botu-Bov[®] adicionado ao meio 2% de caseinato de sódio;

228 As fêmeas passaram por sincronização de estro para realização da
229 inseminação artificial por laparoscopia. Foi realizada a colocação de dispositivos
230 intravaginais impregnados com 60mg de acetato de medroxiprogesterona
231 (Progespon[®]- Zoetis) que foi mantido por 14 dias e aplicação de 350 UI de
232 gonadotrofinas coriônica equina eCG (Novormon[®]-Zoetis) via intramuscular.

233 Após a sincronização, os animais seguiram para o procedimento de
234 inseminação onde, previamente foram submetidos a jejum hídrico de 12 horas e
235 alimentar de 24 horas. Foram sedados utilizando Acepromazina-Acepran[®] (0,05
236 mg/kg) e realizado um bloqueio anestésico no local com Lidocaína 2% com
237 vasoconstritor (Xylestesin[®]) aplicando 2mL no ponto de cada colocação dos
238 trocateres.

239 Foi realizada a devida contenção dos animais em macas apropriadas e
240 inseriram-se dois trocateres nas seguintes regiões: paramediana retroumbilical
241 esquerda para inserção da bainha inseminadora e região paramediana
242 retroumbilical direita para inserção da ótica. O sêmen utilizado para as
243 inseminações foi descongelado em banho-maria por 15 minutos em temperatura
244 42°C e foi preparada a bainha inseminadora.

245 Após a introdução dos trocateres realizou-se a observação e localização
246 dos cornos uterinos e com auxílio da bainha e pipeta inseminadora, injetou-se

247 metade da dose total de sêmen (0,25mL) na flexura maior de cada corno uterino
248 separadamente.

249 Feito os procedimentos, os animais receberam uma dose de pentabiótico
250 (Zoetis®) dose de 30.000 UI/kg de penicilina benzatina e antiinflamatório Flunixin
251 Meglumine-Chemitec® (1mg/kg).

252 Após 30-35 dias da inseminação foi realizado o diagnostico de gestação
253 por uso de ultrassonografia (Aloka®), onde se procedeu a remoção das fezes da
254 ampola retal que foi preenchida com solução aquosa de carboximetilcelulose,
255 e com o uso de transdutor linear prostático na frequência de 7,5 MHz (Modelo
256 UST-660-7,5). Foram realizados mais dois exames ultrassonográficos após 15
257 dias para confirmação da manutenção da gestação e descarte de possibilidade
258 de não gestação.

259 3.5 Análise Estatística

260 Os resultados das avaliações da qualidade espermática foram avaliados
261 pelo software GraphPad Instat 5.0 (San Diego, CA, EUA) e expressos em média
262 e erro padrão. Para as médias obtidas com distribuição normal, utilizou-se teste
263 t seguida de Tukey, considerando os diferentes grupos como tratamento. E os
264 que não tiveram distribuição normal foram aplicados os testes não paramétrico
265 de Friedman, seguido do teste de Dunn. Para análise dos dados gerados da
266 fertilidade foi utilizado modelo de regressão logística multivariada através do
267 software computacional Bioestat 3.0. Nesse modelo a taxa de concepção na IAL
268 foi considerada como variável dependente, sendo os efeitos principais dos
269 machos doadores de sêmen, meio diluidor utilizado para criopreservação
270 espermática, raça das fêmeas inseminadas, bem como suas possíveis
271 interações consideradas como variáveis preditivas.

272 4.Resultados

273 Os resultados da análise descritiva da avaliação seminal pré-congelação
274 do sêmen fresco, estão descritos na tabela 3.

275 Tabela 3. Valores médios e erro padrão (\pm), mínimo (Min) e máximo (Máx) dos
276 parâmetros obtidos na pré-congelação dos oito animais.

277277

278278

279279

	Variável	Média ± Erro	Min Máx
280280	MT	85 ± 1,4	65 / 95
281281	MP	69 ± 1,3	50 / 79
282282	VAP	138 ± 2,3	107 / 155
283283	VSL	120 ± 4,1	42 / 138
284284	VCL	217 ± 6,9	121 / 277
285285	STR	89 ± 0,5	82 / 94
286286	LIN	56 ± 1,0	47 / 66
287287			
288288			
289289			
290290			
291291			

292 Abreviaturas: MT (%), motilidade total; VAP ($\mu\text{m/s}$), velocidade média de
 293 percurso; VSL ($\mu\text{m/s}$), velocidade em linha reta; VCL ($\mu\text{m/s}$), velocidade
 294 curvilínea; STR (%), retilinearidade; LIN (%), linearidade; (%);
 295295

296 De acordo os resultados da cinética espermática logo após a
 297 descongelação (Tabela 4) foi observado que não houve diferença estatística
 298 para os parâmetros de motilidade total, progressiva, porcentagem de
 299 espermatozoides rápidos e retilinearidade, mas para velocidade média de trajeto
 300 e velocidade curvilinear o grupo congelado com BotuBov apresentou resultados
 301 superiores, enquanto que para velocidade em linha reta e linearidade, o grupo
 302 acrescido de caseinato foi superior.

303303

304 Tabela 4. Valores médios e erro padrão dos parâmetros cinéticos obtidos através
 305 de análise computadorizada do movimento espermático pelo CASA dos de 8
 306 animais sendo 3 ejaculados de cada (n=24), pós-descongelamento no momento
 307 zero.

308308

Variável	BB	BC	P
MT	54 ± 4,7	58 ± 4,1	0,29
MP	22 ± 2,5	20 ± 2,4	0,25
VAP	90 ± 3,2 ^a	80 ± 2,3 ^b	≤0,05
VSL	67 ± 1,9 ^b	74 ± 1,9 ^a	≤ 0,05
VCL	139 ± 4,5 ^a	118 ± 3,8 ^b	≤0,05
RAP	29 ± 3,6	27 ± 3,3	0,46
STR	83 ± 0,8	84 ± 0,5	0,15
LIN	57 ± 0,8 ^b	60 ± 0,7 ^a	≤ 0,05

309309

310 Abreviaturas: MT (%), motilidade total; MP (%), motilidade progressiva; VAP
 311 ($\mu\text{m/s}$), velocidade média de percurso; VSL ($\mu\text{m/s}$), velocidade em linha
 312 reta; VCL ($\mu\text{m/s}$), velocidade curvilínea; RAP (%), espermatozoides movimentos
 313 rápidos; STR (%), retilinearidade; LIN (%), linearidade, Letras minúsculas
 314 distintas na mesma linha diferem ($p \leq 0,05$) pelo teste t.

315315

316 Nas avaliações após estresse térmico por 90min (Tabela 5), também não
 317 foi observado diferenças para os parâmetros de motilidade total, progressiva,
 318 porcentagem de espermatozoides rápidos e retilinariadade; além disso, neste
 319 momento a velocidade em linha reta do grupo BotuBov foi maior que a do
 320 caseinato ($P < 0.06$). Já para o parâmetro de linearidade o caseinato foi superior
 321 ao BotuBov.

322322

323 Tabela 5. Valores médios e erro padrão dos parâmetros cinéticos obtidos através
 324 de análise do CASA de 8 animais sendo 3 ejaculados de cada ($n=24$), pós-
 325 congelação no momento 90 minutos (T90/TTR).

326326

327327

Variável	BB	BC	P
MT	39 \pm 4,3	38 \pm 4,1	0,87
MP	13 \pm 1,8	10 \pm 1,4	0,14
VAP	86 \pm 1,8 ^a	81 \pm 1,9 ^b	$\leq 0,05$
VSL	69 \pm 1,7	65 \pm 1,4	0,06
VCL	135 \pm 3,4 ^a	123 \pm 3,3 ^b	$\leq 0,05$
RAP	22 \pm 2,6	19 \pm 2,2	0,15
STR	80 \pm 0,6	81 \pm 0,9	0,35
LIN	54 \pm 0,8 ^b	56 \pm 1,0 ^a	$\leq 0,05$

334334

335335

336336

337 Abreviaturas: MT (%), motilidade total; MP (%), motilidade progressiva; VAP
 338 ($\mu\text{m/s}$), velocidade média de percurso; VSL ($\mu\text{m/s}$), velocidade em linha
 339 reta; VCL ($\mu\text{m/s}$), velocidade curvilínea; ; RAP (%), espermatozoides
 340 movimentos rápidos; STR (%), retilinearidade; LIN (%), linearidade, Letras
 341 minúsculas distintas na mesma linha diferem ($p \leq 0,05$) pelo teste t.

342342

343 Na análise de citometria de fluxo (Tabela 6), logo após a descongelação,
 344 demonstrou diferença estatística para células sem desestabilização de
 345 membrana, sendo o grupo com caseinato superior ao BotuBov. Já para as
 346 células com alto potencial mitocondrial ($P=0,08$) e integridade de membrana
 347 plasmática e acrossomal ($P=0,09$) o grupo com caseinato apresentou valores
 348 numéricos maiores em relação ao BotuBov, em contrapartida, este apresentou
 349 valores numéricos maiores que o caseinato na porcentagem de células com alta
 350 concentração de ânion superóxido ($P=0,07$).

351351

352 Tabela 6. Valores médios e erro padrão dos parâmetros obtidos por citometria
 353 de fluxo pós congelação dos oitos animais em ambos os tempos (Tempo 0 e
 354 90/TTR).

355

TempoT0				Tempo T90/TTR		
Variáveis	BB	BC	p	BB	BC	p
CSDM	21,6 ± 2,6 ^b	25,2 ± 2,5 ^a	≤0,05	15,8 ± 1,6	18,0 ± 1,3	0,11
HPM	22,2 ± 2,5	25,3 ± 2,5	0,08	15,6 ± 1,6	18,4 ± 1,3	0,06
MPAI	36,4 ± 10,8	40,6 ± 3,1	0,09	21,4 ± 1,9	23,9 ± 1,8	0,06
O2	71,3 ± 2,8	67,7 ± 2,8	0,07	76,2 ± 2,5	74,5 ± 2,0	0,26

356

357 BB: (20% de gema de ovo), BC: (20% de gema de ovo + de 2% de caseinato de
 358 sódio). CSDM, células sem desestabilização de membrana; HPM, alto potencial
 359 mitocondrial; MPAI, integridade das membranas plasmática e acrossomal; O2,
 360 células com alta concentração de anion superóxido. Letras minúsculas distintas
 361 na mesma linha diferem ($p \leq 0,05$) pelo teste t.; T0: Tempo zero; T90 (TTR):
 362 Tempo de 90 minutos.

363363

364 Ainda na tabela 6, os resultados da análise de citometria após o estresse
 365 térmico de 90min, mostrou que não houve diferença estatística para as células
 366 sem desestabilização de membrana e porcentagem de células com alta

367 concentração de anion superóxido; e que para células com alto potencial
368 mitocondrial e com membrana plasmática e acrossomal integras, o grupo com
369 caseinato foi numericamente superior (P=0.06).

370 Em relação ao teste de fertilidade não houve diferença estatística
371 significativa em relação à taxa de prenhez entre os grupos Botu-Bov® (23%,
372 11/48) e caseinato de sódio (33%, 17/52) sendo o valor de p= 0,25. Não foram
373 observadas diferenças entre a interação macho *versus* diluente utilizado
374 (p=0,70), onde o macho que apresentava qualidade seminal superior teve 31%
375 de taxa de prenhez (15/49) e o animal com baixa qualidade seminal foi 26%
376 (13/51) como descritos na tabela 7.

377377

378 Tabela 7. Resultados obtidos no teste de fertilidade utilizando os machos
379 selecionados e os diferentes diluentes utilizados:

Macho Alta Fertilidade					Baixa Fertilidade			
	Total	Prenhez	Taxa de prenhez	P	Total	Prenhez	Taxa de prenhez	P
Caseinato	23	8	34,78		29	9	31,03	
Botubov	26	7	26,92		22	4	18,18	
Total	49	15	30,61	0,7569	51	13	25,49	0,3481

380

381 5.Discussão

382 O processo de criopreservação do sêmen é influenciado por inúmeros
383 fatores sendo a técnica e o meio diluente utilizados os mais relevantes, de modo
384 que os resultados obtidos por esta técnica ainda são baixos devido a lesões
385 ocasionadas no espermatozoide durante a congelação [17, 18,6], tornado a
386 técnica um desafio.

387 Nossos resultados utilizando diluente comercial à base de gema de ovo
388 (Botu-Bov®) acrescido ou não de 2% de caseinato de sódio demonstraram
389 diferenças significativas entre os parâmetros espermáticos pós-descongelação.

390 Segundo a análise computadorizada do sêmen (CASA), técnica precisa e
391 rápida para a avaliação de parâmetros espermáticos relacionados à cinética
392 espermática [20, 21,22], no momento T0 e T90 não houve diferenças estatísticas
393 entre grupos para os parâmetros de motilidade total, progressiva, porcentagem
394 de espermatozoides rápidos e retilinearidade; sendo a motilidade total inferior no

395 momento T0 e superior no momento T90 aos resultados descritos por Kulaksiz
396 et al. [23], ambos utilizando uma proteína do leite como meio diluente. Kulaksiz
397 et al. [23] pode concluir que o extensor contendo leite teve melhores resultados
398 de motilidade no pós-descongelamento, demonstrando assim sua capacidade
399 de preservar a motilidade espermática quando comparado a outros diluentes,
400 sendo que em nosso estudo não chegamos a esse resultado devido a
401 inexistência de diferença estatística entre grupos. Contudo, Gündoğan [24]
402 relatou melhoria na motilidade espermática quando se utilizou Tris como diluente
403 quando comparado ao citrato de sódio e extensores contendo leite desnatado.
404 Já Jerez et al. [25] relataram melhor motilidade progressiva pós-
405 descongelamento quando se utilizou leite de soja acrescido de glicerol em
406 carneiros, se mostrando uma combinação adequada para o processo de
407 congelação em ovinos.

408 Utilizando diluentes contendo caseinato definidos na refrigeração de
409 sêmen equino, foi observado que estes mantiveram a motilidade progressiva do
410 sêmen quando armazenado a 4 °C e a 5 °C por mais de 24 horas quando
411 comparado com extensores com base em sólidos secos de leite não gordurosos
412 que não são tão definidos em sua composição [26,27]. Esses parâmetros de
413 velocidade dos espermatozoides também foram maiores no extensor com
414 proteína do leite definido demonstrando que o mesmo atua mantendo e até
415 mesmo melhorando a qualidade do sêmen durante o armazenamento a frio
416 quando [26], diferindo dos nossos resultados, podendo essas diferenças estar
417 correlacionadas a espécie avaliada.

418 Diluentes à base de gema de ovo foram utilizados para a congelação de
419 sêmen bovino demonstrando melhores resultados pós-descongelamento em
420 parâmetros como motilidade total, motilidade progressiva e porcentagem de
421 espermatozoides rápidos [28], sendo que esses parâmetros não apresentaram
422 diferenças em nosso estudo na comparação entre os grupos no momento T0. Já
423 quando se utilizou diluentes contendo caseinato de sódio definido e lecitina de
424 soja para a refrigeração de sêmen equino, foi observado queda de motilidade
425 total [29] em ambos os grupos corroborando com nossos dados.

426 Com relação a velocidade média de percurso (VAP) e velocidade
427 curvilínea (VCL), o grupo BB-MT0 apresentou melhores resultados que o grupo
428 BC-MT0, sendo que essas velocidades estão ligadas positivamente com a

429 migração do espermatozoide entre o muco cervical durante o processo de
430 fecundação em caprinos e ovinos [21,30], enquanto que para velocidade em
431 linha reta (VCL) e linearidade (LIN), o grupo BC-MT0 foi superior, sendo que a
432 linearidade está diretamente ligada a qualidade do espermatozoide e sua
433 progressão e capacidade de penetração no muco cervical [31,21]. Já em
434 bovinos, utilizando os mesmos diluentes, as variáveis VAP, VSL e VCL foram
435 maiores no grupo contendo caseinato de sódio a 2% [32] diferindo de nossos
436 resultados.

437 As velocidades descritas são correlacionadas com a capacidade de
438 fecundação do espermatozoide [31,33], visto que amostras com valores de VAP,
439 VSL e VCL maiores produziram uma maior quantidade de oócitos fertilizados
440 [31] e apresentaram uma melhor penetração no muco cervical [34,31], e dessa
441 maneira esses parâmetros estão correlacionados à fertilidade [33] sendo as
442 velocidades do CASA utilizadas para prever o potencial de fertilização de sêmen
443 em touros [35], levando em consideração a dependência entre elas para tais
444 resultados [36].

445 No momento T90/TTR não houve diferenças também para velocidade em
446 linha reta, mas manteve uma tendência ($P < 0.06$) para o grupo BB sendo este
447 superior ao BC. Já para o parâmetro de linearidade, o BC foi superior ao BB, o
448 que pode demonstrar a proteção exercida pelo caseinato durante o estresse
449 térmico ocasionado na congelação ao sêmen.

450 O sucesso no processo de criopreservação do sêmen pode também ser
451 avaliado pela quantidade de espermatozoides mantidos íntegros após a
452 descongelação, demonstrando dessa maneira a proteção exercida pelo meio
453 diluente sobre a estrutura das membranas da célula espermática [37, 38]. Assim,
454 a integridade da membrana espermática é de fundamental importância para a
455 manutenção da qualidade seminal sem prejudicar o potencial fecundante do
456 espermatozoide [39]. Segundo a integridade de membrana plasmática e
457 acrossomal (MPAI), apesar de não demonstrarem diferenças estatísticas
458 significativas, estas foram favoráveis ao grupo BC nos momentos T0 e T90 ($p =$
459 $0,09$ e $0,06$) respectivamente, demonstrando que o meio diluente acrescido de
460 caseinato de sódio pode exercer uma função protetora à membrana
461 espermática, visto que a caseína manteve a integridade acrossomal em sêmen
462 de touros submetidos a congelação [40]. Em bovinos e suínos, também não

463 houve diferença entre a integridade das membranas acrossomal e plasmática de
464 sêmen criopreservado com caseína pós-descongelamento como em nosso
465 estudo, sugerindo a preservação das membranas [41,32] sendo isso possível
466 devido a análise ter sido realizada imediatamente após o descongelamento [32].

467 Entretanto no momento T90/TTR, verificou-se maiores valores na
468 porcentagem de células espermáticas com membranas íntegras no grupo
469 contendo caseinato de sódio quando comparado ao diluente contendo gema de
470 ovo sugerindo uma função protetora ao meio diluente sobre a integridade de
471 membrana [32], resultado tendencioso para o grupo caseinato no mesmo
472 momento em nosso estudo.

473 A relação do potencial mitocondrial com a fertilidade ainda é incerta [39],
474 contudo, em ovinos, o uso de sondas fluorescentes para avaliação do potencial
475 mitocondrial é muito utilizado [42] visto a alta afinidade deste potencial com a
476 capacidade energética e motilidade celular [43, 42]. Em relação ao alto potencial
477 mitocondrial em nosso estudo, este manteve uma tendência para o grupo
478 acrescido de caseinato de sódio nos momentos T0 e T90 ($p=0.08$ e $p=0.06$)
479 respectivamente, sendo já comprovado que diluentes contendo leite ou
480 caseinato de sódio ajudam a manter o potencial mitocondrial da célula
481 espermática, devido sua ligação aos íons Ca^{+2} , o que proporciona uma
482 estabilidade da membrana plasmática e equilíbrio da atividade metabólica
483 [26,40,32].

484 Em suínos, quando se utilizou caseínas para o transporte de sêmen, estas
485 melhoraram as propriedades espermáticas com relação à motilidade e a
486 normalidade mitocondrial pós-descongelamento do sêmen quando comparadas
487 ao grupo controle (sem caseína). Além disso, o conteúdo intracelular de ATP e
488 a atividade da enzima proteolítica derivada do acrossomo no grupo tratado com
489 caseína foram mantidos em um nível alto comparado ao grupo controle e,
490 inversamente, a porcentagem de espermatozoides com caspase ativada e DNA
491 fragmentado foi reduzida [41].

492 Segundo as células sem desestabilização de membrana e a porcentagem
493 de células íntegras com concentração de superóxido (O_2 células íntegras) no
494 momento T0, estas apresentaram diferenças estatísticas sendo maior no grupo
495 BC, corroborando com os dados de Diniz [32], onde na avaliação dos valores de
496 superóxido (O_2^-) observou diferença em ambos os momentos avaliados (T0 e

497 T90) entre os grupos demonstrando maiores valores para o grupo caseinato de
498 sódio, de modo que o caseinato teve maior controle da atividade metabólica
499 celular o que produziu menos O₂. Em vista disso, o caseinato de sódio pode ter
500 atuado protegendo a membrana espermática da desestabilização e impedindo a
501 reação acrossomal e capacitação espermática precoce ocasionada pelo
502 processo de congelação.

503 A produção de Eros de maneira intensificada, principalmente dos radicais
504 H₂O₂ e o O₂, faz com que o processo de capacitação espermática seja precoce,
505 mas a produção de EROs também é necessária para otimização de atividades
506 fisiológicas normais da célula como regulação da expressão de genes sensíveis
507 a alterações da homeostase [44].

508 A utilização da gema de ovo nos diluentes de sêmen pode ser a principal
509 formadora de radicais livres devido ser uma fonte importante de aminoácidos
510 aromáticos, preferencialmente maior formador de H₂O₂, mostrando que a
511 concentração de gema de ovo no meio está diretamente ligada à formação de
512 Eros. Após testarem diferentes concentrações de gema de ovo no meio de
513 congelação, constataram que não houve interferência na taxa de fertilidade
514 quando a porcentagem de gema de ovo passou de 20% para 5% no meio diluidor
515 [45].

516 No teste de fertilidade realizado no presente estudo, não foram
517 observadas diferenças estatísticas entre os grupos e também com relação a
518 interação macho *versus* diluente utilizado. Contudo, o diluente contendo
519 caseinato de sódio apresentou resultados favoráveis quando comparado ao
520 grupo contendo gema de ovo. Uma análise "*in vitro*" foi realizada sobre os efeitos
521 do caseinato de sódio, fosfocaseinato nativo e caseinoglicopeptídeo na ligação
522 espermática à zona pelúcida bovina (ZP), e comprovou que o caseinato de sódio
523 (CS) e o fosfocaseinato nativo (PN) foram mais eficazes no aumento da ligação
524 espermática do que o caseinoglicopeptídeo (CG) provando que as proteínas do
525 leite aumentam a ligação dos espermatozóides à ZP. Já quando se utilizou o
526 sêmen refrigerado com diluentes contendo Tris e leite para a inseminação
527 intravaginal em ovelhas, o diluente a base de leite apresentou melhores
528 resultados de fertilidade a campo [46]. Apesar dos testes serem realizados por
529 outros métodos, os resultados obtidos por Coutinho et al [47] e Paulenz et al.

530 [46] corroboram com o teste de fertilidade realizado em nosso estudo, que obteve
531 melhores resultados com a utilização do caseinato de sódio.

532 Concluiu-se que apesar de apresentarem algumas diferenças estatísticas,
533 os parâmetros de cinética espermática mostraram-se favoráveis ao grupo
534 contendo caseinato de sódio em sua composição, assim como no teste de
535 fertilidade, demonstrando que a adição do caseinato de sódio no meio diluente
536 pode ser uma alternativa favorável para a criopreservação do sêmen na espécie
537 ovina.

538538

539 **Agradecimentos**

540 Agradecimento a CAPES, pela bolsa concedida e a empresa Botupharma, pelo
541 fornecimento dos meios diluentes.

542542

543 **REFERÊNCIAS**

544 [1] Pacheco A, Quirino CR. Comportamento sexual em ovinos. Revista
545 Brasileira de Reprodução Animal 2010; 34: 87-97.

546 [2] Castelo TS, Frota TR, Silva AR. Considerações sobre a criopreservação do
547 sêmen de caprinos. Acta Vet. Brasilica 2008; 2,3: 67-75.

548 [3] Ortega AM, Izquierdo AC, Gómez JJH, Olivares-corichi IM, Torres VMM,
549 Méndez JJV. Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen.
550 Una revisión. Interciencia 2003; 18:699-704.

551 [4] Esteves SC et al. Improvement in motion characteristics and acrosome status
552 in cryopreserved human spermatozoa by swim-up processing before freezing.
553 Hum. Reprod. 2000; 2173-2179.

554 [5] Stornelli M et al.. Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad
555 seminal. Analecta Vet. 2005; 25, 2, 28-35.

556 [6] Salamon S, Maxwell, WMC. Frozen storage of ram semen. Procesing,
557 freezing, thawing and fertility after cervical insemination. Anim Reprod Sci

558 1995; 37:85-249.

559 [7] Maxwell WM, Salamon S. Storage of ram semen. *Animal Reproduction*
560 *Science* 2000;62:77-111.

561 [8] Gil, J, Rodriguez-Irazoqui M, Lundeheim N, Soderquist L, Rodriguez-
562 Martinez H. Fertility of ram semen frozen in Bioexcell and used for cervical
563 artificial insemination. *Theriogenology* 2003;59:1157-1170.

564 [9] Davis IS, Bratton RW, Foote RH. Livability of bovine spermatozoa at 5, -25,
565 and -85°C in TRIS-buffered and citrate-buffered yolk-glycerol extenders.
566 *Journal of Dairy Science* 1963;46:333-336.

567 [10] SALAMON S, MAXWELL WMC. Storage of ram semen. *Animal*
568 *Reproduction Science*, 2000; 62 :77-111.

569 [11] Cunha ICN. Criopreservação do sêmen de cães. Tese Doutorado,
570 Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 149p; 2002.

571 [12] Bergeron A, Manjunath P. New Insights towards understanding the
572 mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Molecular Reproduction*
573 *and Development* 2006;73:1338-1344.

574 [13] Rodello L. Validação de sistema automatizado de refrigeração e congelação
575 de sêmen ovino. Botucatu. Dissertação [Mestrado em Medicina Veterinária e
576 Reprodução Animal]-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
577 Universidade Estadual Paulista – UNESP; 2006.

578 [14] Parrish JJ, Susko-Parrish J, Winer MA, First N.L. Capacitation of bovine
579 sperm by heparin. *Biology of Reproduction* 1988; 38:1171-1180.

580 [15] Freitas-Dell'aqua CP, Guasti PN, Monteiro GA, Maziero RRD, Dell'aqua Jr
581 JA, PAPA FO. Flow cytometric analysis of fertile and subfertile frozen stallion
582 spermatozoa. *Animal Reproduction* 2012; 9:941.

- 583 [16] Camargo LS, Freitas-Dell'acqua CP, Shimit R, Guasti PM, Volpato MSA,
584 Souza FF. New multicolor protocol to assess dog spermatozoa by flow
585 cytometer. [Apresentação na VI international Symposium on Animal Biology of
586 Reproduction; 2016 November 6-9; Campos do Jordão, SP, Brazil].
- 587 [17] Singh M, Ghosha SK, Prasada JK, Kumara A, Tripathia RP, Bhureb SK, et
588 al. Seminal PDC-109 protein vis-à-vis cholesterol content and freezability of
589 buffalo Spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 2014;144:22-9.
- 590 [18] Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen.
591 *Anim Reprod Sci* 2000;60:481-492.
- 592 [19] Mortimer STA critical review of the physiological importance and analysis
593 of sperm movement in mammals. *Hum. Reprod. Update* 1997; 3:403-439.
- 594 [20] Cox JF, Alfaro V, Montenegro V, Rodriguez-Martinez H. Computer-
595 assisted analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm
596 migration in cervical mucus. *Theriogenology* 2006;66:860-867.
- 597 [21] Nikolovski M, Mickov L, Dovenska M, Petkov V, Atanasov B, Dovenski T.
598 Influence of glutathione on kinetic parameters of frozen-thawed spermatozoa
599 from ovchepolian pramenka rams. *mac vet rev* 2014; 37 (2): 121-128.
- 600 [22] Kulaksiz1 R, Çebi Ç, Akçay E. The effect of different extenders on the
601 motility and morphology of ram sperm frozen or stored at 4 °C. *Turk. J. Vet.*
602 *Anim. Sci.* 2012; 36(2): 177-182.
- 603 [23] Gündoğan, M.: Short term preservation of ram semen with different
604 extenders. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.*, 2009; 15:429- 435.
- 605 [24] Jerez, R., González, N., Olaciregui, M., Luño, V., Blas, I. de, & Gil, L.
606 (2016). Use of soy milk combined with different cryoprotectants for the ram semen
607 cryopreservation. *Small Ruminant Research*, 2015;134: 34–38.

- 608 [25] Pagl R, Aurich JE, Muller-Schlosser F, Kankofer M, Aurich C. Comparison of
609 an extender containing defined milk protein fractions with a skim milk-base
610 extender for storage equine semen at 5°C. *Theriogenology* 2006;66:1115-22.
- 611 [26] LeFrappier MS, Walston BS, Whisnant CS. Comparison of various extenders
612 for storage of cooled stallion spermatozoa for 72 hours. *Journal of Equine
613 Veterinary Science* 2010; 30: 200-204.
- 614 [27] Crespilho AM, Sá Filho MF, Dell'aqua Jr JA, Nichi M, Monteiro GA, Avanziz
615 BR, et al. Comparison of in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen
616 frozen in egg yolk or new lecithin based extenders. *Livest Sci* 2012;149:1-6.
- 617 [28] Aurich C, Seeber P, Müller-Schlösser F. Comparison of Different Extenders
618 with Defined Protein Composition for Storage of Stallion Spermatozoa at 5°C.
619 *Reproduction Domestic Animal* 2007;42:445–448.
- 620 [29] I Robayo, V Montenegro, C Valde´s and JF Cox. CASA Assessment of
621 Kinematic Parameters of Ram Spermatozoa and their Relationship to Migration
622 Efficiency in Ruminant Cervical Mucus. *Reprod Dom Anim* 2008;43:393–399.
- 623 [30] Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K. Computer assisted semen analyzers
624 in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, 2002;57:149-179.
- 625 [31] Diniz JVA. Utilização do caseinato de sódio na congelação de sêmen bovino.
626 Tese [Doutorado em Medicina Veterinária e Reprodução Animal] – Faculdade de
627 Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista –
628 UNESP;2017.
- 629 [32] Del Olmo E, Bisbal A, Maroto-Morales A, García-Alvarez O, Ramon M,
630 Jimenez-Rabadan P, Fernandez-Santos MR. Fertility of cryopreserved ovine
631 semen is determined by sperm velocity. *Animal Reproduction Science*
632 2013;138(1-2):102–109.

- 633 [33] Mortimer ST. Casa- Practical aspects. *J Androl* 2000;515-524.
- 634 [34] Nagy A, Polichronopoulos T , Gáspárdy A , Solti L, Cseh S. Correlation
635 between bull fertility and sperm cell velocity parameters generated by computer-
636 assisted semen analysis. *Acta Veterinaria Hungarica* 2015; 63 3):370–381.
- 637 [35] Amann RP, Waberski D. Computer-assisted sperm analysis (CASA):
638 capabilities and potential developments. *Theriogenology* 2014; 8: 15–17.
- 639 [36] Graham JK, Mocé E. Fertility evaluation of frozen/thawed semen.
640 *Theriogenology*
641 2005;64:492-502
- 642 [37] Maziero RRD, Crespilho AM, Freitas Dell’Aqua CP, Dell’Aqua Jr. JA, Papa
643 FO. Análise de sêmen bovino e sua relação com a fertilidade. *Rev Bras Reprod*
644 *Anim Supl* 2009;6:5-10
- 645 Bergstein TG, Weiss1 RR, Bicudo SD. Techniques in semen analysis. *Rev.*
646 *Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, 2014;38(4):189-194.
- 647 [38] Bergeron A, Brindle Y, Blondin P, Manjunath P. Milk caseins decrease the
648 binding of the major bovine seminal plasma proteins to sperm and prevent lipid
649 loss from the sperm membrane during sperm storage. *Biol Reprod* 2007; 77:120-
650 6.
- 651 [39] Tatemoto H, Oshiro R, Shimada H, Konno T, Yamanaka K, Ashizawa K.
652 Addition of casein to the diluents during sêmen transportation improves the
653 post-thaw qualities of okinawan native Agu pig spermatozoa. *Nishihara*: 2015, p.
654 75-86.
- 655 [40] Tsakmakidis IA. Ram semen evaluation: Development and efficiency of
656 modern techniques. *Small Rumin Res* 2010;92:126-130.

- 657 [41] Martinez-Pastor F, Johannisson A, Gil J, Kaabi M, Anel L, Paz P, Rodriguez-
658 Martinez H. Use of chromatin stability assay, mitochondrial stain JC-1, and
659 fluorometric assessment of plasma membrane to evaluate frozen-thawed ram
660 sêmen. *Anim Reprod Sci* 2004;84:121-133.
- 661 [42] Roy SC, Atreja SK. Effect of reactive oxygen species on capacitation and
662 associated protein tyrosine phosphorylation in buffalo (*Bubalus bubalis*)
663 spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 2008;107:68-84.
- 664 [43] Vishwanath R, Shannon P. Storage of bovine semen in liquid and frozen
665 state. *Animal Reproduction Science* 2000;62:23-53.
- 666 [44] Paulenz, H.L., Söderquist, L., Adnoyi, T., Fossen, O.H., Andersen, B.K.: Eff
667 ect of milk and TRIS-based extenders on the fertility of sheep inseminated
668 vaginally once or twice with liquid ram semen. *Theriogenology*, 2003; 60:759-
669 766. 16.
- 670 [45] Coutinho Da Silva MA, Seidel GE, Squires EL, Granham JK. Effects of
671 components of semen extenders on the binding of stallion spermatozoa to bovine
672 or equine zona pellucida. *Reproduction* 2012;143:577-85.