

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

**COMPARAÇÃO ENTRE DILUENTES A BASE DE LEITE  
DESNATADO E CASEINATO DE SÓDIO NA REFRIGERAÇÃO  
DO SÊMEN EQUINO**

***GABRIELA AMORIM CAMPOS***

BOTUCATU – SP  
Janeiro 2018

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

**COMPARAÇÃO ENTRE DILUENTES A BASE DE LEITE  
DESNATADO E CASEINATO DE SÓDIO NA REFRIGERAÇÃO  
DO SÊMEN EQUINO**

*GABRIELA AMORIM CAMPOS*

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista - UNESP, Campus de Botucatu, como requisito para obtenção do título de Mestrado no programa de pós-graduação em Biotecnologia Animal.

**Orientador:** Prof. Dr. José Antônio Dell’Aqua Junior

BOTUCATU – SP  
Janeiro 2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Campos, Gabriela Amorim.

Comparação entre diluentes a base de leite desnatado e caseinato de sódio na refrigeração do sêmen de equino / Gabriela Amorim Campos. - Botucatu, 2018

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

Orientador: José Antonio Dell'Aqua Junior

Capes: 50504002

1. Equino. 2. Inseminação artificial. 3. Sêmen. 4. Animais - Melhoramento genético.

Palavras-chave: Extensores; equino; inseminação; sêmen.

Nome do Autor: Gabriela Amorim Campos

Título: **COMPARAÇÃO ENTRE DILUENTES A BASE DE LEITE DESNATADO E CASEINATO DE SÓDIO NA REFRIGERAÇÃO DO SÊMEN EQUINO.**

### **COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA**

**Prof. Dr. José Antonio Dell'Aqua Junior**

Presidente e orientador

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Unesp - Botucatu/SP

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eunice Oba**

Membro titular

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Unesp - Botucatu/SP

**Dr. Márcio Teoro do Carmo**

Membro titular

Médico Veterinário autônomo

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Unesp - Botucatu/SP

Data da defesa: 22 de janeiro de 2018

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a DEUS por ter me concedido saúde, disposição e paciência.

Aos meus pais, Dona Jane e Seu Maurício, por sempre acreditar em mim e pelo suporte emocional e financeiro que contribuiu para que eu chegasse onde estou.

Ao meu irmão Mauricinho, que sempre está ao meu lado.

A Victor Garcia, com o qual posso contar e que está comigo para o que der e vier, me mostrando que na vida há SÓ COISAS BOAS.

Aos meus filhos de quatro patas Lupi, Belinha, Deslô, Fiona, Barthô e Martinica.

A meu orientador José Antônio Dell'Aqua Junior e a Camila de Paula Freitas Dell'Aqua pela confiança depositada.

Ao professor Papa, por ceder o CERAN para que fosse realizado o experimento.

Aos funcionários da FMVZ, em especial a Dona Raquel que todas as manhãs nos recebe com um bom dia cheio de alegria, Edvaldo, Edilson, Lucas, Felipe, Paulinho e Seu Léo.

Aos professores do Departamento, em especial a professora Eunice, que esteve presente nas minhas conquistas desde minha chegada a Botucatu, a professora Fabiana e ao professor Nereu, pelo qual tenho um enorme carinho e admiração. Obrigada pelas oportunidades e pela amizade.

Aos amigos que conquistei durante essa caminhada. Juntos alcançamos grandes conquistas! Especialmente Guta e Ivan pelas oportunidades concedidas. Aimê, Juliana, Luciana, Nathália, Raissa, Renata, Viviane e Xande pela amizade sincera.

À Universidade Federal da Bahia, onde o sonho da Medicina Veterinária começou e que me deu a base para tudo. Em especial ao Prof. Alberto Lopes Gusmão que vibra a casa nova conquistada.

Agradeço a CAPES pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma tenham contribuído ao longo dessa jornada. Muito obrigada!

**“De modo suave, você pode sacudir o mundo”**

**Mahatma Gandhi**

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO I</b> .....	1
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	2
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	3
2.1- Inseminação artificial .....	3
2.2- Célula espermática sob refrigeração .....	4
2.2.1- Membrana plasmática do espermatozoide .....	5
2.2.2- Influência do plasma seminal na refrigeração.....	8
2.2.3- Processo de refrigeração.....	10
2.3- Ação de diferentes substâncias nos meios diluidores .....	13
2.4- Caseínas.....	15
2.4.1- Ação das caseínas .....	17
<b>3. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	20
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	21
<b>CAPÍTULO II</b> .....	28
<b>ARTIGO</b> .....	29
<b>RESUMO</b> .....	29
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	30
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	31
2.1.- Aspectos éticos.....	31
2.2.- Animais e Delineamento experimental .....	31
2.3- Coleta do ejaculado e processamento do sêmen .....	31
2.4- Análise espermática .....	32
2.4.1- Avaliação da cinética espermática.....	32
2.4.2- Citometria de fluxo.....	33
2.5- Teste de fertilidade .....	34
2.6- Análise estatística.....	34
<b>3. RESULTADOS</b> .....	34
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	37
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	39
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	39

CAMPOS, G. A. (2018). **Comparação entre diluentes a base de leite desnatado e caseinato de sódio na refrigeração do sêmen de equino.** Botucatu, 2018, 41 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária.

## **Resumo**

A refrigeração de sêmen é importante ferramenta para disseminação de material genético de garanhões. Essa técnica é possível pela correta diluição do sêmen em meios específicos e pelo uso de caixas próprias para refrigeração passiva a 5 ou 15°C. A maior parte dos diluentes para refrigeração de sêmen equino utilizados no mundo são a base de leite. Entretanto, um dos entraves da utilização deste produto biológico é o grande número de substâncias contidas, levando a não padronização entre partidas. Visando solucionar esta problemática, o desenvolvimento de meios diluentes quimicamente definidos que proporcionem proteção aos espermatozoides durante o arrefecimento, mantendo a fertilidade após a refrigeração deve ser considerado. O uso de frações do leite pode otimizar seu potencial benéfico, tendo em vista que é possível aumentar a concentração dos componentes que favorecem a proteção espermática. A caseína é a fração do leite descrita como a mais eficaz para manutenção da viabilidade espermática e com capacidade de proteger a membrana plasmática. Considerando essas informações, este estudo tem como objetivo avaliar os efeitos de meios diluentes para sêmen equino a base de caseína (CS), caseína com pentoxifilina (CSP), caseína com colesterol (CSC) e seus equivalentes a base de leite desnatado (LD), leite desnatado com pentoxifilina (LDP) e leite desnatado com colesterol (LDC) sobre os parâmetros espermáticos *in vitro* e fertilidade do sêmen submetido a refrigeração passiva a 5°C por 24 horas em caixa de isopor para transporte de sêmen. Os parâmetros de motilidade espermática foram mais elevados para os grupos LD e LDC na maioria das análises. Os grupos que continham colesterol proporcionaram melhor proteção para membrana. O grupo CSC se mostrou melhor em grande parte das análises, destacando-se também no teste de fertilidade, onde apresentou diferença estatística para os grupos LD, CS, LDP e CSP. Assim, a utilização de caseinato de sódio mostrou-se uma alternativa viável para a substituição do leite desnatado em diluentes de refrigeração de sêmen equino, contribuindo para alta taxa de fertilidade.

**Palavras-chave:** Extensores, sêmen, equino, inseminação.

CAMPOS, G. A. (2018). Comparison between extenders based on skimmed milk and sodium caseinate on equine semen refrigeration. Botucatu, 2018, 41 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária.

### **Abstract**

Cooling semen is an important tool for genetic material dissemination for superior stallions. This technique is possible with the dilution of the semen in specific extenders and by using specialized boxes for passive cooling at 5 or 15°C. Most of the extenders for equine semen refrigeration used in the world are milk based. However, one of the obstacles for the use of this biological product is the large number of substances contained, leading to non-standardization between lots. In order to solve this problem, developing a chemically defined extender for cooling equine semen should be considered, providing protection to the sperm during cooling and preserving fertility afterwards. The use of milk fractions can optimize their beneficial potential, since it is possible to increase the concentration of components that favor the spermatoc protection. Casein is the fraction of milk described as the most effective for maintaining sperm viability and capable of protecting the plasma membrane. Taking it into consideration, this study aims to evaluate the effects of equine semen diluent media based on casein (CS), casein with pentoxifylline (CSP) and casein associated with cholesterol (CSC) and their equivalents to of skim milk-based (LD), skim milk with pentoxifylline (LDP) and skim milk with cholesterol (LDC) regarding sperm parameters and in vitro fertility of semen submitted to passive refrigeration at 5°C for 24 hours in a Styrofoam box. The parameters of sperm motility were higher for LD and LDC in most analyzes. Groups that contained cholesterol provided better membrane protection. The CSC group proved to be better in most of the tests, especially in the fertility test, where it presented statistical difference for the CS, CSP, LD & LDP groups. The use of sodium caseinate has proved to be a viable alternative for replacing skim milk extenders in equine semen refrigerated, contributing to high fertility rate.

**Keywords:** Extenders, semen, equine, insemination.

---

# CAPÍTULO I

## 1. INTRODUÇÃO

A indústria equina nacional exerce importante papel gerador de serviço e renda, movimentando anualmente R\$ 16,15 bilhões de reais e empregando direta e indiretamente cerca de 3 milhões de pessoas (MAPA, 2016). Visto as dimensões social e econômica dos segmentos que compõe o agronegócio do cavalo, e visando as tendências atuais da indústria equina, houve nos últimos anos, um crescimento significativo de pesquisas científicas com foco na melhora da qualidade e expansão da produção (ALMEIDA; SILVA, 2010). O enfoque em reprodução animal é essencial para que esse avanço ocorra. Para isso é indispensável o investimento e conhecimento em biotecnologia da reprodução.

As biotécnicas da reprodução constituem uma valiosa ferramenta para o ganho genético da espécie. A inseminação artificial em equinos é praticada em todo mundo e sua forma mais comum de aplicação é com a refrigeração e transporte do sêmen ao local onde se encontra a fêmea (LOOMIS, 2006), que se torna ainda mais importante quando levado em conta as distâncias demográficas, possibilitando o uso do sêmen refrigerado em todo território nacional. Segundo Papa et al. (2005) esta é a biotécnica mais utilizada no Brasil, com maior potencial de disseminação do material genético de garanhões superiores, gerando um grande impacto sobre a indústria mundial do cavalo.

Devido a importância que esta técnica representa na evolução da indústria equina, deve-se aprimorar e desenvolver novos meios diluentes eficazes para refrigeração do sêmen equino, visando a conservação das células espermáticas, bem como a manutenção da fertilidade. A maioria dos meios utilizados para diluição de sêmen equino são a base de leite, um fluido biológico de complexa composição, que pode ter mais de 100.000 moléculas, contendo componentes benéficos e prejudiciais às células espermáticas (BATELLIER, 1997; BATELLIER et al., 2001). O desenvolvimento de meios com substâncias purificadas a partir de frações do leite, como o caseinato de sódio, contribuiria para a melhor padronização entre os lotes.

Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi revisar os efeitos de meios diluentes a base de caseína e leite desnatado acrescidos de colesterol ou pentoxifilina sobre o sêmen equino refrigerado a 5°C por pelo menos 24 horas.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Inseminação artificial**

A inseminação artificial (IA) é a ação de depósito mecânico do sêmen no trato reprodutivo da fêmea por intermédio de um técnico capacitado, sem haver necessidade de coito. Esta é provavelmente a técnica de maior impacto dentre as biotécnicas, já que um garanhão pode produzir centenas de produtos ao longo da vida reprodutiva (CANISSO et al., 2008).

A primeira inseminação artificial descrita foi realizada por Lazzaro Spallanzani, no ano de 1780 na espécie canina, havendo nascimento de três filhotes 62 dias após o procedimento (FOOTE, 1999; 2002). Entretanto, há registros de textos árabes do ano de 1322 onde um cacique teria ordenado aos seus guerreiros que coletassem o sêmen de um garanhão da tribo rival para realizar a inseminação de uma das suas éguas (DAVIS MOREL, 1999).

Os primeiros estudos científicos com IA em equinos foram realizados na Rússia no início do século XIX estimulado pelos militares que necessitavam de cavalos. Devido ao início da primeira guerra mundial o programa de IA parou, voltando a ser utilizado extensivamente após o fim do conflito como maneira de substituir os animais perdidos na guerra. Nesta mesma época buscou-se formas para preservar o sêmen dos garanhões visando aumentar o uso de animais superiores em grandes áreas geográficas (IVANOFF, 1922; FOOTE, 1999; FOOTE, 2002).

Por muito tempo um dos maiores empecilhos para que a IA ganhasse importância e atravessasse fronteiras foram as associações de raças e criadores, que, em sua maioria, foram contrárias ao uso da nova técnica. Atualmente, constitui uma das formas mais eficientes de disseminação do material genético de garanhões superiores, gerando um grande impacto sobre a indústria mundial do cavalo (PAPA et al., 2005, LOOMIS, 2006).

O uso de sêmen refrigerado seguido do transporte vem sendo empregado rotineiramente nas últimas décadas em todo o mundo (AURICH, 2008), tornando-se popular por muitos programas de melhoramento genético de equinos (SHORE et al., 1988) por possibilitar a utilização de garanhões que estejam alojados em centrais de reprodução equina, facilitando o direcionamento

dos acasalamentos e logística de coleta e transporte do sêmen (NUNES; ZÚCCARI; COSTA e SILVA, 2006).

O emprego das biotécnicas da reprodução oferecem inúmeras vantagens em relação ao acasalamento natural, destacando-se a possibilidade de coletar e processar o sêmen em uma propriedade e transportá-lo a diferentes localidades para IA, aumento da eficiência reprodutiva, redução do risco de lesão do garanhão durante a monta, redução da transmissão de doenças, eliminando custo e estresse associado ao transporte da égua até a propriedade onde o cavalo se encontra (VARNER et al., 1988; PAPA et al., 2005). Isto torna os garanhões disponíveis para criadores de diversas regiões, não só aos de onde estão alojados (PAGL et al., 2006).

Os Estados Unidos e o Brasil ocupam posição de destaque na utilização de sêmen refrigerado, sendo, respectivamente, os países que mais utilizam esta biotécnica (NUNES; ZÚCCARI; COSTA e SILVA, 2006; PAPA et al., 2005), apesar de estudos demonstrarem que a taxa de fertilidade de sêmen equino refrigerado ainda é bastante variável, devido a interferência de diversos fatores como fertilidade intrínseca do garanhão e da égua, composição do meio diluente de sêmen, taxa de resfriamento, temperatura e tempo de armazenamento do sêmen, dose inseminante e proximidade da I.A. a ovulação da égua (SHORE et al., 1988; BATELLIER et al., 2001; CONTRI et al., 2010).

Para obtenção de boa fertilidade com uso de IA com sêmen refrigerado, os espermatozoides devem apresentar integridade funcional e estrutural desde a refrigeração até o momento da fertilização (NUNES; ZÚCCARI; COSTA e SILVA, 2006). Para isso deve-se usar meios diluentes capazes de proteger a membrana plasmática dos efeitos deletérios do arrefecimento, sem comprometer seu potencial de fertilização.

## **2.2 Célula espermática sob refrigeração**

O espermatozoide é uma célula haplóide altamente complexa e especializada que tem as habilidades de motilidade ativa e fertilização do oócito para formação do zigoto. Com limitada capacidade de reparo, o dano à sua membrana plasmática resulta na perda irreversível de suas funções (AMANN; GRAHAM, 2011; VARNER; JOHNSON, 2011; AURICH, 2005).

O metabolismo espermático à temperatura corporal é alto (SQUIRES et al., 1999). Contudo, o resfriamento diminui a atividade metabólica dos espermatozoides (PICKELL; AMANN, 1987; SQUIRES et al., 1999; AURICH, 2008), reduzindo também o crescimento e a atividade microbiana (AURICH, 2008). A queda do metabolismo é de cerca de 50% a cada 10°C de arrefecimento. Quando o sêmen é mantido a 5°C, apenas 10% de seu metabolismo é necessário para sua sobrevivência (SQUIRES et al., 1999). Desta forma, a temperatura reduzida tem sido o principal meio de retardar as reações químicas e prolongar a fertilidade dos espermatozoides por longos períodos (PICKELL; AMANN, 1987; SQUIRES et al., 1999).

### **2.2.1 Membrana plasmática do espermatozoide**

O espermatozoide pode ser dividido morfologicamente em cabeça, peça intermediária e flagelo. A membrana plasmática é o componente mais externo e engloba toda sua extensão, sendo contínua sobre toda sua superfície, de igual natureza e função regionalmente, havendo diferenciação somente quando há reação acrossomal, senilidade, lesão ou morte celular (AMANN; GRAHAM, 2011; VARNER; JOHNSON, 2011). A membrana plasmática é de fundamental interesse devido seu papel direto no processo de fertilização (LADHA, 1998). Sua análise tem sido descrita como melhor preditivo de fertilidade comparado a testes de concentração espermática, motilidade e morfologia (AMANN, 1989).

O modelo estrutural básico da membrana plasmática é o de mosaico fluido composto por uma bicamada dinâmica de fosfolipídios polares distribuídos assimetricamente e de característica anfipática. Os fosfolipídios nesta bicamada são orientados com os seus grupos de células hidrofílicas para fora da membrana (compartimento extracelular e citosólico) e suas cadeias de ácidos graxos hidrofóbicos para o interior da membrana (SINGER; NICOLSON, 1972).

Este arranjo forma uma barreira hidrofóbica pela qual a água e as moléculas nela dissolvidas passam com dificuldade. As moléculas geralmente atravessam ou são transportadas por canais ou poros formados pelas proteínas que estão intercaladas aos lipídios (HOOGEWIJS, 2010). A estrutura do mosaico fluido é, portanto, formalmente análoga a uma solução orientada bidimensional de

proteínas integrais (ou lipoproteínas) no solvente de bicamada lipídica viscosa (SINGER; NICOLSON, 1972).

A membrana plasmática do espermatozoide é rica em fosfolipídios, glicolipídios e colesterol (PARKS; LYNCH, 1992; AMANN; GRAHAM, 2011). A fosfatidilcolina e a esfingomiéline encontram-se dispostas no folheto externo da bicamada lipídica, enquanto a fosfatidilserina e a fosfatidiletanolamina situam-se no folheto interno (LADHA, 1998). O deslocamento da fosfatidilserina para o folheto externo ocorre apenas durante o dano da membrana, como choque frio ou dano de resfriamento severo, ou durante os estádios quando as alterações da membrana devem ocorrer, como a capacitação ou a reação acrossomal (QUIN, 1989).

As proteínas são misturadas com os lipídios e representam cerca de 50% do peso da membrana. Podem ser consideradas integrais (essenciais para a estrutura da membrana) ou periféricas (associadas à membrana, porém facilmente removidas). Algumas proteínas integrais servem como poros ou canais através da membrana ou são receptores de superfície para outras moléculas, enquanto outras são encontradas entre as duas bicamadas da membrana (AMANN; GRAHAM, 2011).

Os fosfolipídios têm capacidade para se mover lateralmente ao longo da membrana, proporcionando sua natureza dinâmica, o que é fundamental na função global da membrana. A medida que os lipídios e as proteínas se movem pela membrana, eles podem interagir com proteínas e outros lipídios e são essas interações que permitem que canais de íons, sinalizadores de receptores e transportadores de proteínas funcionem normalmente (GRAHAM, 2011).

O colesterol, esteroide predominante na membrana plasmática do espermatozoide, ajuda a estabilizar a membrana a temperatura corporal preenchendo os espaços devido aos fosfolipídeos adjacentes com cadeias de ácidos graxos de diferentes comprimentos de carbono ou diferentes graus de instauração (PARKS; GRAHAM, 1992; SQUIRES et al., 1999; GRAHAM, 2011). A proporção de colesterol para fosfolípidos com cadeias laterais de ácido polinsaturadas, assim como a natureza do fosfolípido, determina a fluidez da membrana (AMMAN; GRAHAM, 2011). Para a membrana plasmática de ganhões essa proporção de colesterol:fosfolípido é de 0,36 (PARKS; LYNCH, 1992).

As membranas são fluidas à temperatura corporal, com as moléculas lipídicas em estado líquido, em vez de gel ou cristalino. O colesterol ajuda a

manter os fosfolípidos em um arranjo aleatório e lamelar. Em geral, quanto mais colesterol presente, menos fluido ou flexível é a porção da membrana. A remoção do colesterol da membrana plasmática provoca sua desestabilização e, conseqüentemente, a reorganização dos componentes da bicamada, incluindo a redistribuição de proteínas integrais, aumentando sua capacidade de fusão (AMANN; GRAHAM, 2011). Já os glicolípídeos localizam-se na superfície da membrana e representam menos de 10% dos lipídeos polares (PARKS e LYNCH, 1992).

Independentemente da localização no espermatozoide, a membrana plasmática é composta por três zonas: bicamada lipídica, interface fosfolípídeo e água e glicocálice (AMANN; GRAHAM, 2011). Os lipídios são organizados em cinco regiões especializadas (acrossoma, segmento equatorial, segmento pos-acrosomal, parte intermediária e peça principal), conforme requerimento da função especializada associada a cada, possuindo distinta composição lipídica (LADHA, 1998).

Todas essas complexas interações são consideradas a base para ordenar os domínios na membrana plasmática essenciais à funcionalidade espermática, levando a sua compartimentalização. Cada um desses domínios desempenha um papel específico na fertilização. Dentro de um compartimento de membrana, os lipídios são geralmente miscíveis e apresentam liberdade para o movimento lateral, desde que a temperatura esteja superior a uma temperatura crítica. Quando uma membrana passa por resfriamento, no entanto, é possível uma reorganização da bicamada lipídica (PARKS; GRAHAM, 1992).

Quando a célula é arrefecida os lipídios sofrem uma transição de fase termotrópica de estado líquido-cristalino (fluido) para estado gel ou sólido e começam a se agregar. Isto ocorre tanto nos lipídios formadores da bicamada quanto para os não formadores, com ambos exibindo a configuração na fase de gel (QUINN, 1989; GRAHAM, 2011). Entretanto, cada cadeia de ácido graxo sofre essa transição a uma temperatura diferente. Enquanto cadeias mais longas passam ao estado sólido em temperaturas mais elevadas, cadeias mais curtas passam pela transição de fase a temperaturas mais baixas (GRAHAM, 2011).

Se a transição de fase for feita de forma abrupta, ou seja, com uma curva de refrigeração muito rápida, pode haver lesão celular conhecida como choque frio (KAYSER et al., 1992). A quantidade de ligações insaturadas na cadeia do

ácido graxo também influencia na temperatura da transição de fase. Quanto maior o número de ligações não saturadas, menor é a temperatura para alcançar a transição de fase. Fisicamente, quando há arrefecimento da membrana, os movimentos rotativos e vibratórios das cadeias de ácidos graxos dos lipídios da membrana diminuem e, à medida que ocorre a transição de fase, as forças de Van der Waals entre as cadeias de ácidos graxos puxam as cadeias de ácidos graxos dos lipídios circundantes (e moléculas lipídicas inteiras) mais próximas. Assim, no estado de gel, a membrana é menos fluida e também apresenta menor área superficial (GRAHAM, 2011).

A composição específica de ácidos graxos e plasmalógenos das membranas dos espermatozoides dos ganhões podem estar ligados a variabilidade da criopreservação entre os indivíduos (GARCIA et al., 2011).

Os danos causados aos espermatozoides pelo resfriamento podem ser classificados em lesão de arrefecimento direto e indireto ou latente. O dano direto é percebido rapidamente, pois as alterações ou ruptura das estruturas celulares são evidenciadas na alteração dos movimentos das células, enquanto o dano indireto altera a função celular, não sendo detectável até horas ou dias após as células terem atingido 0 a 5°C (VARNER et al., 1988; KAYSER et al., 1992). A lesão por dano direto é caracterizada por uma perda de lipídios da membrana para o meio extracelular e uma subsequente perda de íons intracelulares e moléculas. Já o dano indireto provavelmente resulta dos rearranjos lipídicos e proteicos que ocorrem na membrana após sofrer a transição de fase (GRAHAM, 2011).

### **2.2.2 Influência do plasma seminal na refrigeração**

O plasma seminal é constituído por uma mistura de secreções derivadas principalmente do epidídimo e glândulas acessórias (AURICH, 2008), com função de “portador” dos espermatozoides para o trato genital feminino (MANJUNATH; THÉRIEN 2002; BERGERON; MANJUNATH, 2006). Influenciando deste modo do metabolismo espermático até a fecundação, atua em funções como fertilidade, motilidade e viabilidade espermática, além da capacitação (TROEDSSON et al., 2005; MANJUNATH, 2012).

Os efeitos do plasma seminal sobre a longevidade do sêmen são contraditórios, pois proporcionam ações benéficas e prejudiciais aos espermatozoides do ejaculado (AURICH, 2008; MANJUNATH, 2012). Este fato pode ser dado devido a variabilidade individual da composição do plasma seminal e qualidade do sêmen dos ganhões (GARCIA et al., 2011; GUASTI; MONTEIRO; PAPA, 2012).

Seus efeitos prejudiciais sobre a motilidade espermática se tornam mais evidentes quando o sêmen passa por processo de refrigeração (RIGBY et al., 2001). Varner et al. (1987) correlacionam o plasma seminal negativamente por aumentar a susceptibilidade do espermatozoide ao choque frio, sendo prejudicial ao armazenamento do mesmo (MANJUNATH, 2012). Todavia, os fatores que reduzem a motilidade e viabilidade espermática ainda são mal caracterizados (MANJUNATH, 2012; BERGERON; MANJUNATH, 2006; JASKO et al., 1991).

Embora o plasma seminal contenha muitos componentes benéficos para os espermatozoides e possam completar seu processo de maturação, vale ressaltar que durante a ejaculação natural os espermatozoides têm um menor contato com o plasma seminal quando comparado com a coleta por vagina artificial (HOLT, 2000). As proteínas de ligação do plasma seminal bovino (BSPs) e sua análogas, oriundas das secreções das vesículas seminais e contidas no plasma seminal, são prejudiciais a refrigeração e armazenamento dos espermatozoides (MANJUNATH, 2012).

O contato prolongado entre espermatozoides e plasma seminal contendo proteínas BSPs pode danificar a membrana plasmática do espermatozoide induzindo o efluxo de colesterol e fosfolípidos, levando a capacitação precoce (MANJUNATH, 2002; MANJUNATH; THÉRIEN, 2002). Muitos pesquisadores afirmam que a qualidade espermática é maior na fração rica em espermatozoide, quando comparada a fração pobre ou ao ejaculado total. Essas diferenças são atribuídas aos componentes “tóxicos” do plasma seminal (VARNER et al., 1987; RIGBY et al., 2001).

Uma alternativa para limitar a exposição dos espermatozoides ao plasma seminal é a centrifugação do ejaculado total para retirada do plasma que ficará sobrenadante (VARNER et al., 1987; JASKO et al., 1991; RIGBY et al., 2001). A

centrifugação do ejaculado para remoção do plasma seminal resulta em uma redução imediata da motilidade espermática, no entanto, este efeito prejudicial

não é mantido durante o armazenamento. Apresentando uma melhora na manutenção da motilidade dos espermatozoides do sêmen refrigerado por 24 horas para a maioria dos garanhões (JASKO et al., 1991; JASKO et al., 1992). A diminuição dos parâmetros de cinética espermática quando há remoção total do plasma seminal sugere que uma baixa concentração de plasma seminal seria essencial (RIGBY et al., 2001).

A concentração de plasma seminal que favorece a motilidade espermática, sem produzir efeito prejudicial sobre a diminuição da temperatura de espermatozoides não foi determinada para o sêmen de garanhão. A retirada do plasma e ressuspensão dos espermatozoides em meio diluidor contendo de 5 a 20% de plasma seminal é benéfica para a manutenção das características de movimento por um período de até 72 horas de refrigeração (JASKO et al., 1992). Um dos problemas da centrifugação é a perda de 25 % dos espermatozoides no sobrenadante (LOOMIS, 2006). Contudo, Jasko et al. (1992) não limita a técnica ao uso de centrífuga, podendo alcançar essa porcentagem por diluição de sêmen na proporção de 1:4 a 1:19.

O aumento na razão de diluição para chegar a concentração final de  $50 \times 10^6$  espermatozoides/mL resulta em uma melhoria adicional na manutenção da motilidade dos espermatozoides refrigerados por 24 horas (JASKO et al., 1991), demonstrando que uma baixa proporção de plasma seminal para refrigeração pode ser benéfica. Para aqueles garanhões cujo sêmen não mantém motilidade adequada após o resfriamento na presença de plasma seminal (JASKO et al., 1991) ou para ejaculados com baixas concentração espermática, que não podem ser adequadamente diluídos (JASKO et al., 1992), a remoção do plasma seminal pela centrifugação do sêmen pode ser uma alternativa à diluição excessiva (JASKO et al., 1991). Já que esta reduz a viabilidade dos espermatozoides (VARNER et al., 1987).

### **2.2.3 Processo de refrigeração**

Para refrigeração do sêmen equino é preciso que o arrefecimento da amostra seja realizado de forma gradual, tendo em vista que uma taxa de resfriamento rápida pode induzir lesão por choque frio (MORAN et al., 1992;

KAYSER et al., 1992). Isto pode ser obtido com um sistema de resfriamento passivo ou ativo (KAYSER et al., 1992). No sistema passivo a taxa de

resfriamento pode sofrer variação de acordo com a temperatura ambiente, isolamento do dispositivo, volume e temperatura inicial do sêmen (MORAN et al., 1992; KAYSER et al., 1992), por isso os recipientes usados para envio de sêmen devem manter temperatura interna adequada para realização de curva lenta de resfriamento, mesmo com altas temperaturas externas (AVANZI et al., 2006). Quando comparado sistemas de refrigeração passiva variando a temperatura externa de 24 ou 40°C, se observou que a Equitainer® e a Botutainer® mantiveram a viabilidade espermática durante o armazenamento por 24 horas, não havendo variação da taxa de resfriamento de -0,03 e -0,05°C/minuto, respectivamente, enquanto a Botu-Box® e a MaxSemenExpress® demonstraram ser eficientes no armazenamento por 12 horas (AVANZI et al., 2006).

O choque frio nas células espermáticas ocorre durante as temperaturas de transição de fase líquida para gel, quando alguns lipídios da membrana plasmática sofrem alterações estruturais, devido à redução da temperatura, afetando sua estabilidade e função (ROBERTSON; WATSON, 1986; QUINN, 1989; MORAN et al., 1992; PARKS; GRAHAM, 1992; PARKS; LYNCH, 1992). São consideradas como principais determinantes da extensão da lesão celular a taxa de resfriamento e a temperatura de armazenamento final (VARNER et al., 1988). Todavia, um intervalo específico de sensibilidade ao choque frio, entre 20 e 5°C, não foi estabelecido para espécie equina (MORAN et al., 1992; KAYSER et al., 1992). Entretanto, se o resfriamento durante esta fase de temperatura de transição ocorrer lentamente, o dano à membrana plasmática seria minimizado (MORAN et al., 1992).

KAYSER et al. (1992) avaliando características de motilidade dos espermatozoides, observaram que para resfriamento abaixo de 20°C a curva de refrigeração a -0,05°C/minuto minimiza o choque frio, enquanto a curva de refrigeração a -0,7°C/minuto induz lesão ao choque frio. Baseado na transição de fase termotrópica dos fosfolipídios das membranas espermáticas de garanhão (20,7°C), o choque frio, devido a transição de fase, deve ocorrer por volta desta temperatura (PARKS; LYNCH, 1992). Moran et al. (1992) sugeriram que a temperatura de 19°C seria o ponto superior da sensibilidade ao choque frio, enquanto a temperatura de 8°C poderia representar o ponto inferior em que os

lipídios de membrana sofreram uma transição de fase e são novamente relativamente estáveis, assim os espermatozoides não seriam mais sensíveis ao

choque frio causado pelo arrefecimento rápido. Podendo assim haver arrefecimento rápido de 24°C a 19°C (MORAN et al., 1992), 37°C a 20°C (KAYSER et al., 1992), ou de 8°C até a temperatura de armazenamento de 4 a 6°C (MORAN et al., 1992), sem associação a lesão por choque frio.

A susceptibilidade variável ao choque frio entre as espécies poderia ser justificada pelas diferenças na composição da membrana plasmática (esteróis, proteínas e glicolipídeos), devendo ser responsáveis por modular a ocorrência e/ou consequências das transições de fase de forma que modificam a estabilidade e função da membrana durante o resfriamento (VARNER et al., 1988; PARKS; LYNCH, 1992). Além disso os componentes dos diluentes de sêmen a base de leite também proporcionam proteção adequada dos espermatozoides contra os efeitos do choque frio (VARNER et al., 1988; JASKO et al., 1991; JASKO et al., 1992). No entanto, Batellier et al. (2001) sugere que diluente a base de fração de leite seria mais eficiente contra o choque frio.

A temperatura de armazenamento recomendada, pela maioria dos autores, para o sêmen equino com diluente a base de leite em pó desnatado varia de 4 a 6°C (VARNER et al., 1988; MORAN et al., 1992; GRAHAM, 2011; AURICH, 2008), entretanto Province et al. (1985) relatam uma temperatura de armazenamento de sêmen de 15 a 20 ° C ser melhor quando armazenado por 36 horas. Batellier et al. (2001) compararam a fertilidade do sêmen com diluente a base de fração purificada do leite (INRA96<sup>®</sup>) armazenando a 4 ou 15°C por 24 horas e encontraram resultados idênticos para os dois grupos. Quando comparado diferentes diluentes e diferentes temperaturas de armazenamento, observou-se que os diluentes a base de leite ou fração de leite podem ser utilizados sem prejuízos para a motilidade e viabilidade espermática, tanto a 15°C quanto a 5°C por 24 horas (FARRÁS et al., 2008). Altas temperaturas de armazenamento, não reduzem suficientemente o metabolismo (GRAHAM, 2011), conservando as células espermáticas por menor tempo.

De acordo com Farrás et al. (2008) os sistemas de refrigeração passivo que conservam a temperatura a 5°C por períodos acima de 24 horas são mais seguros durante o transporte. De fato, é esperado uma redução nas características de movimento dos espermatozoides após 24 horas de

armazenamento resfriado (JASKO et al., 1991). Todavia, quanto maior o prolongamento do potencial de fertilidade do sêmen resfriado, mais fácil será

para que os criadores utilizem a IA com dose de sêmen refrigerado e transportado (BATELLIER et al., 2001).

### **2.3 Ação de diferentes substâncias nos meios diluidores**

Os diluentes para refrigeração de sêmen equino têm como principais funções promover a redução da concentração plasmática, estabilizar o pH e a osmolaridade, além de fornecer aporte nutricional e antimicrobiano (PAGL et al., 2006; PUGLIESE, 2009). Sendo fundamentados principalmente a base de leite e gema de ovo (AURICH; SEEBER; MÜLLER-SCHLÖSSER, 2007; AURICH, 2008). Kenney et al. no ano de 1975 propuseram um diluente composto por leite em pó desnatado, e desde então diluentes de leite ou a base de leite são utilizados rotineiramente para refrigeração (BATELLIER et al., 2001). Esses diluentes são baratos, fáceis de preparar e resultam em taxas aceitáveis de fertilidade (AURICH, 2008). Entretanto, a proteção oferecida tanto pela gema de ovo quanto pelo leite durante a refrigeração do ejaculado é complexa e mal compreendida (MANJUNATH, 2012; PLANTE et al., 2015).

É notável o desenvolvimento de tecnologia para arrefecimento do sêmen equino ao longo dos últimos anos, e uma grande variedade de diluidores vem sendo proposto para o resfriamento, armazenamento e transporte de sêmen de garanhão com a combinação de vários componentes como açúcares, eletrólitos, cushions, gema de ovo, leite e produtos lácteos (BATELLIER et al., 2001). Porém, a gema de ovo e o leite ou seus compostos continuam representando ingredientes básicos para fabricação de meios diluidores (MANJUNATH, 2012).

A adição de leite desnatado aos meios diluentes para resfriamento a 5°C do sêmen equino parece desempenhar um papel crucial na proteção das células espermáticas (FLORES-RODRIGUES et al., 2014). A proteção oferecida pela gema do ovo é incumbida às frações de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), especificamente os fosfolípídeos (PARKS; GRAHAM, 1992). Acredita-se que o mecanismo de proteção do leite seja similar, envolvendo proteínas na estabilização da membrana plasmática do espermatozoide (AMANN; GRAHAM, 2011).

A diferença da sensibilidade ao choque frio entre as espécies pode ser influenciada pela quantidade de colesterol existente na membrana plasmática

(PARKS; LYNCH, 1992). Embora o colesterol diminua a fluidez da membrana em temperaturas elevadas, ele a aumenta em baixas temperaturas, ajudando a estabilizar a membrana. Quando adicionado às membranas, a temperatura de transição de fase é reduzida, ou pode até ser eliminada (GRAHAM, 2011). Para aqueles garanhões com baixa resistência ao choque frio, a incorporação do colesterol à membrana plasmática pode ser uma alternativa eficiente para aumentar a viabilidade do sêmen criopreservado (HARTWIG; PAPA; DELL'AQUA JUNIOR, 2012; HARTWIG et al., 2014).

A pentoxifilina, uma metilxantina, que promove o aumento do AMPc, responsável pela motilidade, vem sendo utilizada em casos de infertilidade masculina. A adição deste fármaco aos meios diluentes de equinos é considerada promissora devido sua capacidade de aumentar a viabilidade do sêmen resfriado e transportado (GOULART et al., 2004). O uso de diluidor a base de leite desnatado acrescido com pentoxifilina demonstrou ser benéfico para parâmetros de cinética espermática de espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo imediatamente após o "flushing" (GUASTI et al., 2017) e após incubação a 37 °C por 15 minutos (GUASTI et al., 2013). Já para o sêmen diluído e resfriado a 5°C por 12, 24 ou 48 horas, a adição de pentoxifilina (3,6mM) mostrou melhorar a viabilidade espermática, sugerindo que este indutor de funcionalidade também atua como antioxidante, com importante redução dos radicais livres de oxigênio (GOULART et al., 2004).

É sabido que a composição do meio diluente tem grande influência na viabilidade espermática e fertilidade após 24 horas de refrigeração a 5°C, principalmente para os garanhões que apresentam baixa resistência a refrigeração (PAPA et al., 2014). A gema de ovo e o leite representam um risco potencial de contaminação do sêmen por serem produtos de origem animal. Além de sua composição não ser uniforme (BERGERON; MANJUTAH, 2006; AURICH; SEEBER; MÜLLER-SCHLÖSSER, 2007; PLANTE et al., 2015). O desenvolvimento de diluidores mais definidos contendo apenas os ingredientes benéficos do leite leva a um melhor padrão de qualidade dos diluidores, tornando-os mais confiáveis e seguros (AURICH, 2008).

No intuito de desenvolver diluentes que não apresentassem variabilidade entre partidas, Batellier (1997) e Batellier et al. (1997) pesquisaram o efeito das frações do leite na sobrevivência dos espermatozoides equinos, resultando no

diluyente comercial quimicamente definido INRA 96® (suplementado com 27g de fosfocaseinato nativo).

## 2.4 Caseínas

As caseínas são um grupo de fosfoproteínas que representam cerca de 80% das proteínas totais do leite bovino (FOX; BRODKORB, 2008; DALGLEISH, 2011; MANJUNATH, 2012), sendo encontradas na forma de quatro diferentes frações ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  e  $\kappa$ ) (BATELLIER, 1997; MENEZES et al., 2016). As outras proteínas do leite são coletivamente denominadas de proteínas do soro, sendo as principais  $\alpha$ -lactalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina (MANJUNATH, 2012). As caseínas se apresentam em sua maioria, na forma de micelas nativas e apenas 5 a 10% na forma solúvel (BATELLIER, 1997; FOX; BRODKORB, 2008). As micelas de caseínas são constituídas por diversas moléculas (mais de 20 mil moléculas de proteínas individuais formam uma partícula típica), que estão dispostas num agregado das frações de caseínas  $\alpha$  e  $\beta$ -caseínas com fosfato de cálcio e estabilizadas superficialmente pela  $\kappa$ -caseína (DALGLEISH, 2011) (Figura 1).

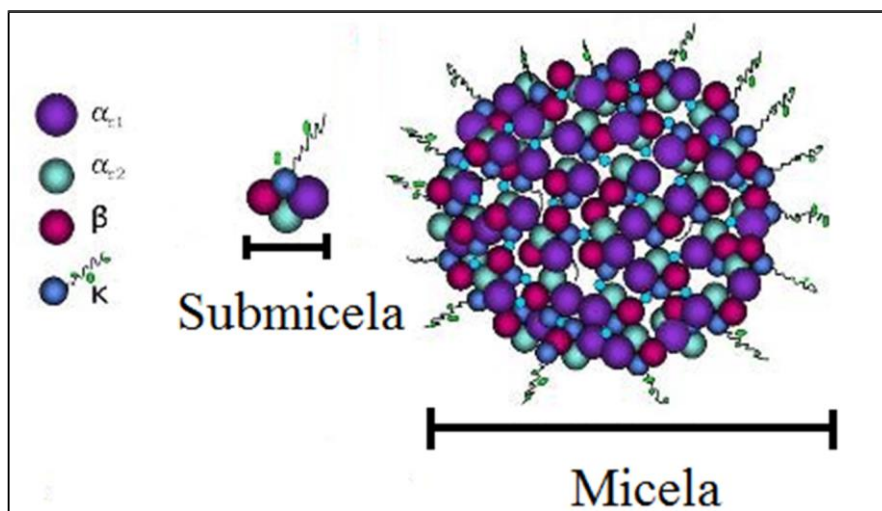


Figura 1 – Micela de caseína.

Fonte: Adaptado de [https://www.researchgate.net/figure/309415260\\_fig4\\_Figura-10-Submicela-e-micela-de-caseina](https://www.researchgate.net/figure/309415260_fig4_Figura-10-Submicela-e-micela-de-caseina)

As frações purificadas do leite usadas por Batellier (1997) e Batellier et al. (1997) para confecção de meios diluente para testes de sobrevivência de

espermatozoides foram obtidas pelo fracionamento do leite cru pelas técnicas de microfiltração, ultrafiltração, diafiltração (PIERRE et al., 1992) e técnicas de liofilização. Após o processamento, foi identificada uma fração altamente protetora, o fosfocaseinato nativo, o qual é subdividido em quatro frações (caseína  $\alpha$ , caseína  $\beta$ , caseína k e fração rica em fosfolipídios) e as proteínas solúveis  $\alpha$  lactalbumina e  $\beta$  lactoglobulina (Figura 2). Fazendo modificações no processo praticado no leite cru também é possível sintetizar o caseinato de sódio, forma não micelar da caseína (Figura 3) (BATELLIER,1997). Esta forma igualmente pode ser produzida pela utilização de caseína ácida seca como matéria prima (BARRAQUIO; VAN DE VOORT, 1991).

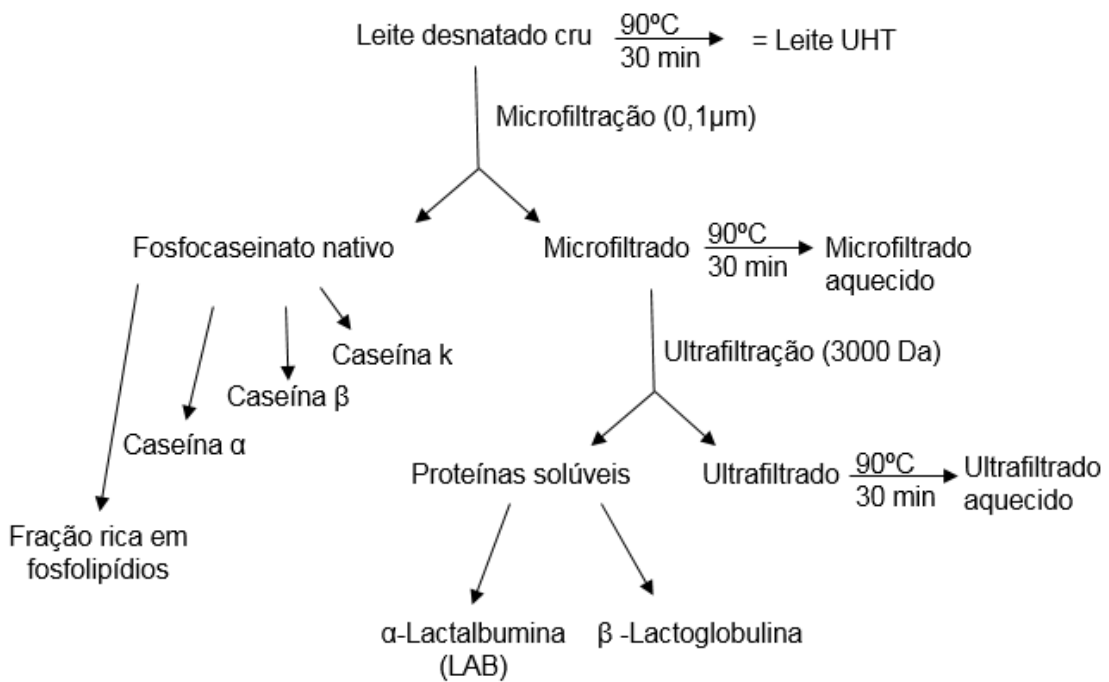


Figura 2. Obtenção das diferentes frações do leite por microfiltração  
Fonte: Adaptado de Batellier (1997).

Esta descoberta originou um diluidor composto por sais de Hanks modificados, complementado com fosfocaseinato nativo, para sêmen resfriado. Entre as frações testadas, o fosfocaseinato nativo, composto de caseínas micelares totais, e  $\beta$ -lactoglobulina, foram considerados protetores (AURICH;

SEEBER; MÜLLER-SCHOLÖSSER, 2007) enquanto que a  $\alpha$ -lactalbumina foi considerada como deletéria (BATELLIER et al., 2001).

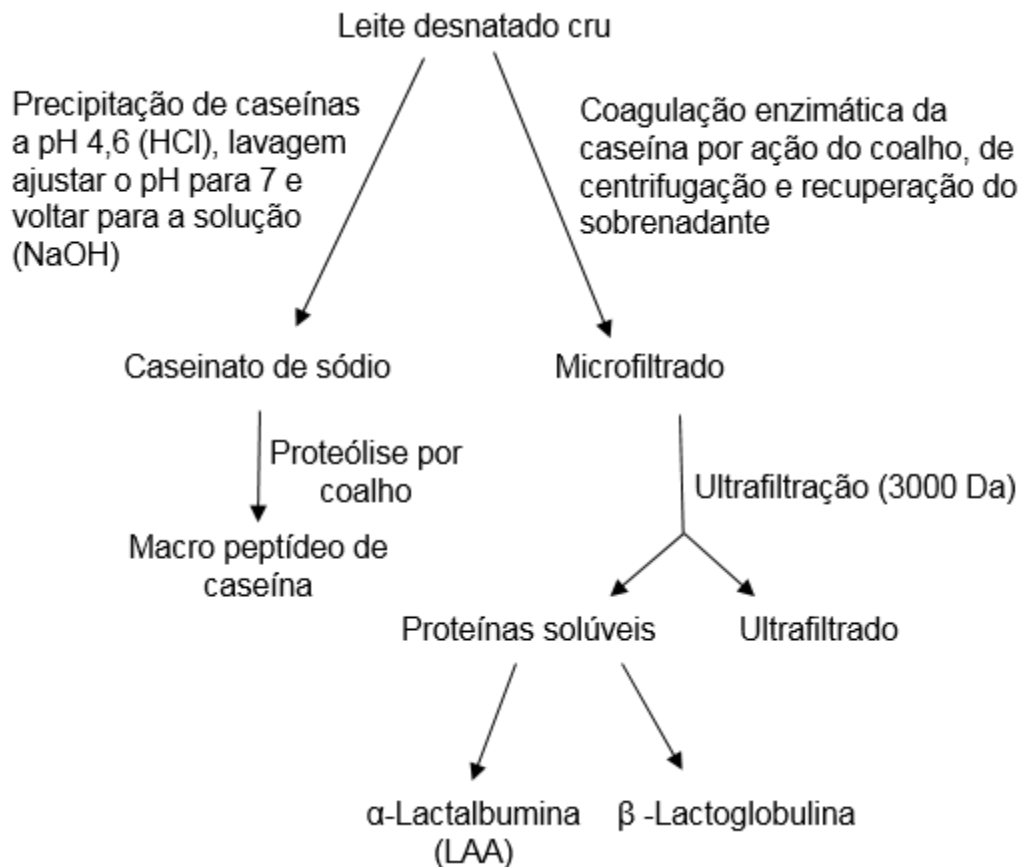


Figura 3. Obtenção de caseinato de sódio a partir do leite desnatado cru.  
 Fonte: Adaptado de Batellier (1997).

#### 2.4.1 Ação das caseínas

O constituinte do leite que fornece maior proteção ao sêmen criopreservado parece ser as micelas de caseínas, as principais proteínas do leite (BERGERON; MANJUNATH, 2006). Apesar de não ter sido definida a forma como protege o sêmen, há fortes indícios de que a base do mecanismo de proteção das células espermáticas pela caseína seja oriunda da sua interação com proteínas de ligação do plasma seminal bovino (BSPs) (interação proteína: proteína), semelhante a como ocorre com as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) presentes nos diluentes a base de gema de ovo (interação proteína: lipoproteína) (MANJUNATH, 2012). Homólogos de proteínas BSPs foram caracterizadas em diversas espécies e parecem ser onipresentes nos mamíferos, com variação de concentração no plasma seminal. As HSPs, proteínas homólogas das BSPs (CALVETE et al., 1995) representam 20 a 30%

das proteínas totais no plasma dos garanhões, enquanto nos touros as BSPs representam 65% (BERGERON; MANJUNATH, 2006; MANJUNATH, 2012).

As proteínas BSPs se ligam aos fosfolipídios de colina da membrana

espermática após a ejaculação e estimulam o efluxo de colesterol e fosfolipídios da membrana espermática. Quando no trato reprodutivo feminino, as proteínas BSPs associadas ao espermatozoide interagem com componentes do fluido da tuba uterina e do folículo (como lipoproteínas de alta densidade) e estimulam um segundo efluxo de colesterol, culminando na capacitação (MANJUNATH; THERIÉN, 2002).

Após a coleta, quando o sêmen é diluído rapidamente com diluente composto por caseína, as micelas e as proteínas do soro sequestram a maioria das BSPs presentes, evitando o estímulo continuado da remoção de lipídios da membrana do espermatozoide, evitando a desestabilização da membrana e protegendo-o da capacitação precoce (MANJUNATH, 2012) (Figura 4).

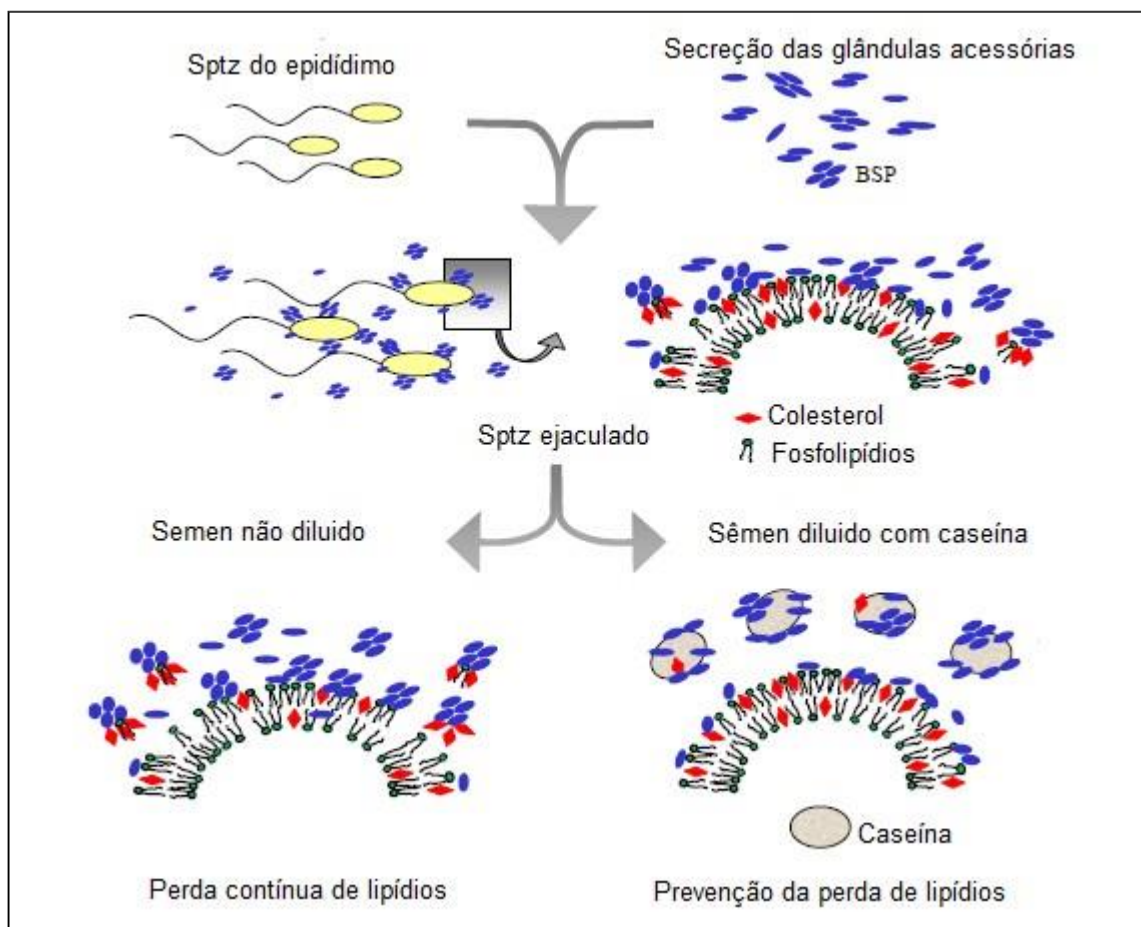


Figura 4. Atuação da caseína no mecanismo de proteção dos espermatozoides.  
Fonte: Adaptado de Manjunath (2012).

Quanto maior a relação entre tempo e concentração de BSPs em contato com os espermatozoides, mais prejudicial é para o armazenamento do sêmen, tendo em vista que este contato prolongado pode danificar a membrana plasmática do espermatozoide, induzindo o efluxo do colesterol e fosfolipídios, levando a capacitação precoce (MANJUNATH, 2002; MANJUNATH; THÉRIEN, 2002). Estudos realizados com sêmen de bode indicam que as proteínas BSP nesta espécie se ligam às caseínas e à  $\beta$ -lactoglobulina de forma dependente da concentração (MENEZES et al., 2016).

A ligação do espermatozoide à zona pelúcida (ZP) desempenha um papel crucial, tendo em vista que esta constitui a última barreira física antes da fertilização. Os diluentes a base de proteína do leite ou a base de leite total favorecem a ligação das células espermáticas de garanhões à ZP da espécie equina e bovina (COUTINHO DA SILVA et al., 2012), que poderia ser devido ao estímulo à capacitação pelas próprias proteínas do leite (COUTINHO DA SILVA et al., 2014). Este mesmo grupo de pesquisadores em 2012 relataram que o caseinato de sódio e o fosfocaseinato nativo, foram mais efetivos no aumento de ligações do espermatozoide à ZP, sugerindo que o mecanismo de ação das caseínas na ligação à ZP pode não estar vinculado somente à estrutura micelar. Desta forma o caseinato de sódio poderia ser um substituto do fosfocaseinato nativo, principal componente do meio comercial INRA96®, em diluidores de refrigeração para sêmen equino.

A adição de caseína ao diluente na espécie suína também se mostrou benéfico, elevando as taxas de penetração de espermatozoides nos oócitos em testes *in vitro* (TATEMOTO et al., 2015).

Ainda não está claro o mecanismo pelo qual as proteínas do leite aumentam as ligações da célula espermática com a zona pelúcida, entretanto é evidenciando que as caseínas seriam as moléculas responsáveis pelo aumento substancial destas ligações (COUTINHO DA SILVA et al., 2012; 2014).

O influxo de cálcio é uma das fases iniciais da capacitação do espermatozoide, e pelo fato das caseínas serem ricas em cálcio, poderiam estar envolvidas nesse mecanismo (BATELLIER, 1997). A presença de fosfocaseinato nativo ou caseinato de sódio no meio diluente poderia aumentar a absorção de

Ca<sup>++</sup> pelo espermatozoide, iniciando a capacitação e aumentando a ligação à ZP (COUTINHO DA SILVA et al., 2014). Pommer, Linfor e Meyers (2012), sugerem

que diluentes a base de leite em pó desnatado facilitaria a capacitação, observado pelo aumento intracelular de cálcio. Entretanto Batellier (1997), observou que diluidores contendo caseínas, não limitada às estruturas micelares nativas, podem preservar a motilidade dos espermatozoides e não induzir a entrada de cálcio que culminaria na capacitação precoce. Este fato pode ser devido a sua forte ligação com os íons de  $Ca^{++}$  (QUINN; WHITE, 1968; COUTINHO DA SILVA et al., 2012).

Em estudos mais recentes, Coutinho da Silva et al. (2014) afirmam que o mecanismo pelo qual as proteínas do leite, fosfocaseinato nativo e caseinato de sódio, levam ao aumento das ligações do espermatozoide à ZP não está relacionado ao aumento de cálcio intracelular. A elevada concentração extracelular de  $Ca^{++}$  no meio diluente não alterou a concentração basal intracelular de cálcio no espermatozoide de garanhão.

Trabalhos comparando o uso de diluente se sêmen equino com fração proteica definida relatam resultados semelhantes ou superiores aos encontrados com diluentes a base de leite utilizados habitualmente para refrigeração (BATELLIER et al., 1997; BATELLIER et al., 1998; BATELLIER et al., 2001; PAGL et al., 2006; FARRÁS et al., 2008; GARCIA, 2016) ou a base de lecitina de soja (AURICH; SEEBER; MÜLLER-SCHLÖSSER, 2007). Utilizando diluente a base de caseinato de sódio, Garcia (2016) encontrou taxa de fertilidade de 84% para garanhão *bad cooler*. O uso de diluente quimicamente definido (INRA96<sup>®</sup>) durante a estação de monta em jumentos se mostra mais eficaz que diluente a base de leite (E-Z Mixin<sup>®</sup>) (CONTRI et al., 2010). Assim como na espécie caprina, onde os diluentes a base de caseinato de sódio e fosfocaseinato nativo apresentaram boa proteção às células (LEBOEUF et al., 2003).

### **3. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A refrigeração do sêmen para transporte é uma biotécnica de destaque na reprodução equina, devido a possibilidade de alcançar longas distâncias a relativo baixo custo. A necessidade de meios diluentes definidos é uma realidade na reprodução equina em todo mundo. Meios contendo apenas as frações benéficas do leite é uma vantagem, principalmente pela possibilidade de

padronização dos lotes. Neste sentido, os caseinatos se mostram efetivos para adequada proteção às células espermáticas, mantendo boa fertilidade.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, F.Q.; SILVA, V. P. Progresso científico em equideocultura na 1ª década do século XXI. **Revista brasileira de zootecnia**, v. 39, p. 119-129, 2010.

AMANN R.P. Can the fertility potencial of a seminal sample be predicted accurately? **Journal of Andrology**, v. 1, p. 89-98, 1989.

AMANN, R. P.; GRAHAM, J. K. Spermatozoal function. In: MCKINNON, A. O; SQUIRES, E. L.; VAALA, W. E.; VARNER, D. D. **Equine reproduction**. 2 ed, Wiley-Blackwell, New Delhi, 2011. Cap. 102, p. 1053-1084, 2011. ISBN 978-0-8138-1971-6

AURICH, C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 89, p. 65–75, 2005.

AURICH, C.; SEEBER, P.; MUELLER-SCHLOESSER, F. Comparison of four extenders with defined protein composition for storage of stallion spermatozoa at 5 °C. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 42, p. 445–448, 2007.

AURICH C. Recent advances in cooled-semen technology. **Animal Reproduction Science**, v. 107, p. 268–275, 2008.

AVANZI, B.R.; FARRÁS, M.C.; MELO, C.M.; ALVARENGA, M.A.; DELL’AQUA JR., J.A.; MEDEIROS, A.S.L.; ARAÚJO, G.H.M., PAPA, F.O. Efficiency of different cooling and storage systems for maintaining equine semen viability in a hot environment. **Animal Reproduction Science**, v. 94, p. 152–154, 2006.

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

BATELLIER, F. **Identification, purification et mécanisme d`éléments contenus dans le lait, agissant sur les spermatozoïdes équins**.1997. Tese (doutorado). Sciences et Techniques, Université François Rabelais de Tours, Tours. Disponível em: <<http://wcentre.tours.inra.fr/prc/internet/resultats/theses/batellier/table.htm>>. Acesso em: 10 julho. 2017.

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

BATELLIER, F.; DUCHAMP, G.; VIDAMENT, M.; ARNAUD, G.; PALMER, E.; MAGISTRINI, M. Delayed insemination is successful with a new extender for storing fresh equine semen at 15 °C under aerobic conditions. **Theriogenology**. v. 50, p. 229–236. 1998

---

\*Referências organizadas de acordo com as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), 2014.

BATELLIER, F.; VIDAMENT, M.; FAUQUANT, J.; DUCHAMP, G.; ARNAUD, G.; YVON, J.M.; MAGISTRINI, M. Advances in cooled semen technology. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 181-190, 2001.

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.

CALVETE, J.J.; MANN, K.; SCHAFFER, W.; SANZ, L.; REINERT, M.; NESSAU, S.; RAIDA, M.; TOPFER-PETERSEN, E. Amino acid sequence of HSP-1, a major protein of stallion seminal plasma: effect of glycosylation on its heparin- and gelatin-binding capabilities. **Biochemical Journal**. v. 310, p. 615–622, 1995.

CANISSO, I. F.; SOUZA, F. A.; SILVA, E. C.; CARVALHO, G. R.; GUIMARÃES, J. D.; LIMA, A. L. Inseminação artificial em equinos: sêmen fresco, diluído, resfriado e transportado. **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais**, São José dos Pinhais, v. 6, n. 3, p. 389-398, 2008.

CONTRI, A.; AMICIS, I.; VERONESI, M. C.; FAUSTINI, M.; ROBBE, D.; CARLUCCIO, A. Efficiency of different extenders on cooled semen collected during long and short day length seasons in Martina Franca donkey. **Animal Reproduction Science**. v. 120, p. 136–141, 2010.

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

COUTINHO DA SILVA, M. A.; SEIDEL JR., G. E.; SQUIRES, E.L.; GRAHAM, J.K.; CARNEVALE, E. M. Effects of milk proteins on sperm binding to the zonapellucida and intracellular  $Ca^{2+}$  concentration in stallion sperm. **Animal Reproduction Science**. v. 150, p. 24-29, 2014.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.08.010>

DALGLEISH, D. G. On the structural models of bovine casein micelles – Review and possible improvements. **Soft Matter**. v. 7, p. 2265–2272, 2011.

DAVIES MOREL, M. C. G. **Equine artificial insemination**. Wallingford, Oxon: CAB International, 1999. ISBN 0 85199 315 X

FARRÁS, M. C.; AVANZI, B. R.; MELO, C. M.; DELL'AQUA, J. A.; PAPA, F. O. Efeito de diferentes diluentes na manutenção das características do sêmen equino em dois sistemas de refrigeração passiva. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, p. 693-699, 2008.

FLOREZ-RODRIGUEZ, S. A.; ARRUDA, R. P.; ALVES, M. B. R.; AFFONSO, F. J.; CARVALHO, H. F.; LEMES, K. M.; LANÇONI, R.; ANDRADE, A. F. C.; CELEGHINI, E. C. C. Morphofunctional characterization of cooled sperm with

different extender to use in equine-assisted reproduction. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 34, p. 911-917, 2014.

FOOTE, R. H. Artificial insemination from the origins up to day. Department of Animal Science, Cornell University, Ithaca, New York, USA, p. 23-67. 1999.

FOOTE, R. H. The history of artificial insemination: Selected notes and notables1  
R. H. Foote2 Department of Animal Science, Cornell University, Ithaca, NY  
14853-4801. 2002

FOX, P. F.; BRODKORB, A. The casein micelle: Historical aspects, current concepts and significance. **Internacional Dairy Journal**, v.18, p. 677–684, 2008.

GARCIA, V. F. C. **Efeitos da adição de caseinato de sódio no diluente de refrigeração de sêmen equino**. 2016. 44f. Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu. 2016.

GARCIA, B.M.; FERNANDEZ, L.G.; FERRUSOLA, C.O.; BOLANOS, J.M.G.; MARTINEZ, H.R.; TAPIA, J.A.; MORCUENDE, D.; PENA, F.J. Fatty acids and plasmalogens of the phospholipids of the sperm membranes and their relation with the post- thaw quality of stallion spermatozoa. **Theriogenology**. v. 75, p. 811-818, 2011.

GRAHAM, J. K. Principles of cooled semen. In: MCKINNON, A. O; SQUIRES, E. L.; VAALA, W. E.; VARNER, D. D. **Equine reproduction**. 2 ed, Wiley-Blackwell, New Delhi, 2011. Cap. 127, p. 1308-1315, 2011. ISBN 978-0-8138-1971-6

GOULART, H. M.; SILVA, A. E. D. F.; MCMANUS, C.; PAPA, F.O. Efeitos da pentoxifilina sobre a viabilidade *in vitro* dos espermatozoides de eqüinos, após o resfriamento a 5°C. **R. Bras. Zootec**. v. 33, n. 1, p. 112-122, 2004.

GUASTI, P. N.; MONTEIRO, G. A.; PAPA, F. O. Componentes do plasma seminal e sua influência sobre a criopreservação e fertilidade de espermatozoides equinos. **Veterinária e Zootecnia**, v. 19, p. 169-180, 2012.

GUASTI, P.N.; MONTEIRO, G.A.; MAZIERO, R.R.D.; MARTIN, I.; AVANZI, B.R.; DELLAQUA JR., J.A.; PAPA, F.O. Effects of pentoxifylline on equine epididymal sperm. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 33, p. 1153-1156, 2013.

GUASTI, P.N.; MONTEIRO, G.A.; MAZIERO, R.R.D.; CARMO, M.T.; DELLAQUA JR., J.A.; CRESPILO, A.M.; RIFAI, E.A.; PAPA, F.O. Pentoxifylline effects on capacitation and fertility of stallion epididymal sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 179, p. 27–34, 2017.

HARTWIG, F. P.; PAPA, F. O.; DELLAQUA JR, J. A. Utilização do colesterol na criopreservação de espermatozoides na espécie equina: uma revisão. **Veterinária e Zootecnia**, v. 19, p. 157-168, 2012.

HARTWIG, F. P.; LISBOA, F. P.; HARTWIG, F. P.; MONTEIRO, G. A.; MAZIERO, R. R. D.; FREITAS-DELLÀQUA, C. P.; ALVARENGA, M. A.; PAPA, F. O.; DELLÀQUA JR., J. A. Use of cholesterol-loaded cyclodextrin: An alternative for bad cooler stallions. **Theriogenology**, v. 81, p. 340-346, 2014.

HOOGEWIJS, M. **Automated and Standardized analysis of equine semen and influences of centrifugation on equine semen preservation**. 2010. 232f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Ghent, Merelbeke.

HOLT, V. W. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. **Theriogenology**, v. 53, p. 47-58, 2000.

IVANOFF, E. I. On the use of artificial insemination for zootechnical purposes in Russia. **The Journal of Agricultural Science**, vol. 12 / Issue 3 p. 244-256, Julho. 1922. DOI: <https://doi.org/10.1017/S002185960000530X>

JASKO, D.J.; MORAN, D. M.; FARLIN, M. E.; SQUIRES, E. L. Effect of seminal plasma dilution or removal on spermatozoal motion characteristics of cooled stallion semen. **Theriogenology**, v. 35, p. 1059–1067, 1991.

JASKO, D.J.; HATHAWAY, J.A.; SCHALTENBRAND, V.L.; SIMPER, W.D.; SQUIRES, E.L. Effect of seminal plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 37, p. 1241–1252, 1992.

KAYSER, J.R.; AMANN, R.P.; SHIDELER, R.K.; SQUIRES, E.L.; JASKO, D.J.; PICKETT, B.W. Effects of linear cooling rates on motion characteristics of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 38, p. 601-614, 1992.

KENNEY, R. M.; BERMAN, R. V.; COOPER, W. L.; MORSE, G. W. **Minimal contamination techniques for breeding mares: techniques and preliminary findings**. In: Proceedings of the 21st Annual Convention, American Association Equine Practitioners. Boston, v. 21, p. 327-335, 1975.

LADHA S. Lipid heterogeneity and membrane fluidity in highly polarized cell, the mammalian spermatozoon. **Journal of Membrane Biology**, v. 165, p. 1-10, 1998.

LEBOEUF, B.; GUILLOUET, PH.; BATELLIER, F.; BERNELAS, D.; BONNÉ, 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.

LOOMIS, P. R. Advanced Methods for Handling and Preparation of Stallion Semen. **Vet Clin Equine**, v. 22, p. 663–676, 2006.

MANJUNATH, P. New insights into the understanding of the mechanism of sperm protection by extender componentes. **Animal Reproduction**, v. 9, n. 4, p. 809-815, 2012.

- MANJUNATH, P.; THERIÉN, 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.
- 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. DOI 10.1007/s00441-016-2438-2
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA. **Revisão do estudo do complexo do agronegócio do cavalo.** Acessoria de comunicação e eventos. 54p, 2016.
- MORAN, D. M.; JASKO, D. J.; SQUIRES, E. L.; AMANN, R. P. Determination of temperature and cooling rate which induce cold shock in stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 38, p. 999-1012, 1992.
- NUNES, D. B.; ZÚCCARI, C. E. S. N.; SILVA, E. V. C. Fatores relacionados ao sucesso da inseminação artificial de éguas com sêmen refrigerado. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 30, p. 42-56, 2006.
- PAGL, R.; AURICH, J. E.; MÜLLER-SCHLÖSSER, F.; KANKOFER, M.; AURICH, C. Comparison of an extender containing defined milk protein fractions with a skim milk-based extender for storage of equine semen at 5°C. **Theriogenology**, v. 66, p. 1115–1122, 2006.
- PAPA, F.O.; MELO, C.M.; DELL'AQUA, J.A.; MACEDO, L.P.; CARVALHO, A.G.; ALVARENGA, M.A.; MEDEIROS, A. S. L. Inovações metodológicas na biotecnologia de refrigeração e congelamento de sêmen eqüino. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, supl.1, p. 19-27, 2005.
- PARKS, J.E.; GRAHAM, J. K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v. 38, p. 209–222, 1992.
- PARKS, J.E.; LYNCH, D.V. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. **Cryobiology**. v. 3, p. 255-266, 1992.
- PAPA, P. M.; RAMIRES-NETO, C.; MONTEIRO, G. A.; SANCLER-SILVA, Y. F. R.; RESENDE, H. L.; FREITAS-DELL'AQUA, C. P.; DELL'AQUA JR, J. A.; ALVARENGA, M. A.; PAPA, F. O. Sperm parameters and fertility of stallion semen cooled with different extenders. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 34, p. 79, 2014.
- PICKETT, B. W.; AMANN, R.P. Extension and storage of stallion spermatozoa: a review. **Equine Veterinary Science**, v. 7, n. 5, p. 289-302, 1987.

- PIERRE, A.; FAUQUANT, J.; LE GREAT, Y.; PIOT, M.; MAUBOIS, J.L. Préparation de phosphocaséinate natif par microfiltration sur membrane. **Lait**, v. 72, p. 461-474, 1992.
- PLANTE, G.; LUSIGNAN, M.; LAFLEUR, M.; MANJUNATH, P. Interaction of milk proteins and Binder of Sperm (BSP) proteins from boar, stallion and ram semen. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 92, p. 1-13, 2015.
- POMMER, A. C.; LINFOR, J. J.; MEYERS S. A. Capacitation and acrosomal exocytosis are enhanced by incubation of stallion spermatozoa in a commercial semen extender. **Theriogenology**, v. 57, p. 1493-1501, 2002.
- PUGLIESI, G. **Viabilidade e fertilidade do sêmen equino resfriado a 5°C por 24 horas com dois diluidores**. 2009. 123f. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2009.
- PROVINCE, C. A.; SQUIRES, E. L.; PICKETT, B. W.; AMANN, R. P. Cooling rates, storage temperatures and fertility of extended equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 23, n. 6, p. 925-934, 1985.
- QUINN, P.J. Principles of membrane stability and phase behavior under extreme conditions. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 21, n. 1, p. 3-19, 1989.
- QUINN, P.J.; WHITE, I. G. The transport of cations by ram and bull spermatozoa. **Australian Journal of Biological Sciences**, v. 21, p. 781-787, 1968.
- ROBERTSON, L.; WATSON, P.F. Calcium transport in diluted or cooled ram semen. **Journals of Reproduction & Fertility**. v. 77, p. 177-185, 1986.
- RIGBY, S. L.; BRINSKO, S. P.; COCHRAN, M.; BLANCHARD, T. L.; LOVE, C. C.; VARNER, D. D. Advances in cooled semen technologies: seminal plasma and semen extender. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 171–180, 2001.
- SINGER, S. J.; NICOLSON, G. L. The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. **Science**, v. 175, n. 4023, p. 720-731, 1972.
- SHORE, M.D.; MACPHERSON, M.L.; COMBES, G.B.; VAMER, D.D.; BLANCHARD, T.L. Fertility comparison between breeding at 24 hours or at 24 and 48 hours after collection with cooled equine semen. **Theriogenology**, v. 50, p. 693-698, 1998.
- TATEMOTO, H.; OSHIRO, R.; SHIMADA, H.; KONNO, T.; YAMANAKA, K.; ASHIZAWA, K. Addition of casein to the diluents during semen transportation improves the post-thaw qualities of Okinawan native agui pig spermatozoa. **日本暖地畜産学会報**. v. 1, p. 75-86, 2015.
- TROEDSSON, M.H.T.; DESVOUSGES, A.S.; ALGHAMDI, A.S.; DAHMS, B.; DOW, C.A.; HAYNA, J.; VALESCO, R.; COLLAHAN, P.T.; MACPHERSON,

M.L.; POZOR, M.; BUHI, W.C. Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. **Animal Reproduction Science**, v. 89, p. 171-186, 2005.

VARNER, D. D.; BLANCHARD, T. L.; LOVE, C. L.; GARCIA, M. C.; KENNEY, R. M. Effects of semen fractionation and dilution ratio on equine spermatozoal motility parameters. **Theriogenology**, v. 28, n. 5, p. 709–723, 1987.

VARNER, D. D.; BLANCHARD, T. L.; LOVE, C. L.; GARCIA, M. C.; KENNEY, R. M. Effects of cooling rate and storage temperature on equine spermatozoal motility parameters. **Theriogenology**, v. 29, p. 1043–1054, 1988.

VARNER, D. D.; JOHNSON, L. From a sperm's eye view: Revisiting our perception of this intriguing cell. In: MCKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L.; VAALA, W. E.; VARNER, D. D. **Equine reproduction**, 2 ed, Wiley-Blackwell, New Delhi, 2011. Cap. 97, p. 909-990, 2011. ISBN 978-0-8138-1971-6

---

## CAPÍTULO II

## CASEINATO DE SÓDIO ASSOCIADO A COLESTEROL ELEVA FERTILIDADE EM CAVALOS BAD COOLER

(Artigo redigido segundo as normas da Theriogenology, ISSN 0093-691X, disponível em: <https://www.elsevier.com/journals/theriogenology/0093-691X/guide-for-authors>)

### Resumo

A maioria dos meios utilizados para diluição e refrigeração de sêmen em equinos é a base de leite, entretanto este é composto por diversas moléculas, impossibilitando a padronização entre as partidas dos diluentes. No intuito de padronizar os meios para refrigeração, o presente trabalho objetivou comparar o efeito de diluentes quimicamente definidos baseados em caseinato de sódio (CS), caseinato de sódio com pentoxifilina (CSP), caseinato de sódio com colesterol (CSC) e seus equivalentes a base de leite desnatado (LD), leite desnatado com pentoxifilina (LDP) e leite desnatado com colesterol (LDC) sobre os parâmetros espermáticos *in vitro* e fertilidade do sêmen equino refrigerado a 5°C por 24 horas. Foram utilizados ejaculados de 19 garanhões para os testes de cinética espermática, integridade de membrana, potencial mitocondrial e instabilidade da membrana a fresco e refrigerado por 24 horas. Para o teste de fertilidade usou-se sêmen de garanhão "*bad cooler*" refrigerado a 5°C por 24 horas. Os parâmetros de motilidade espermática foram mais elevados para grupos LD e LDC. Para integridade de membrana e potencial mitocondrial os grupos que continham colesterol foram superiores para maioria das análises. O grupo CSC mostrou-se melhor em grande parte das análises, destacando-se também no teste de fertilidade, onde apresentou diferença estatística para os grupos LD, CS, LDP e CSP. Assim, a utilização de caseinato de sódio mostrou-se uma alternativa viável para a substituição do leite desnatado em diluentes de refrigeração de sêmen equino, contribuindo para alta taxa de fertilidade em cavalos "*bad cooler*".

*Palavras-chave:* Caseína, espermatozoide, criopreservação, garanhão.

## 1.Introdução

Um dos principais entraves das biotécnicas do sêmen nos equinos é a grande variabilidade individual na qualidade e resistência a processos de criopreservação do espermatozoide [1-3], a qual pode ser atribuída ao fato de que direta ou indiretamente a maioria dos garanhões são selecionados pelo desempenho ou pelo fenótipo, e não por aspectos reprodutivos [3].

O elevado número de garanhões que não respondem positivamente a congelação do sêmen fez com que aumentasse o uso da refrigeração [4], e atualmente, a inseminação artificial com sêmen refrigerado é utilizada rotineiramente em todo o mundo por apresentar taxas de fertilidade elevadas a um baixo custo [5,6]. Para garanhões que não apresentam adequada qualidade seminal pós-refrigeração é indicada a realização de teste com diferentes meios diluentes para encontrar o meio que melhor se adequa às necessidades deste espécime [7,8].

A maioria dos meios diluentes utilizados para o sêmen equino são a base de leite, oriundos do meio proposto com Kenney et al. [9]. Pelo leite ser um fluido biológico complexo, apresenta mais de 100.000 moléculas em sua composição, impossibilitando a padronização entre as partidas [10,11]. O uso de meios baseados em substâncias purificadas a partir de frações do leite, contendo apenas seus ingredientes benéficos leva a melhor padrão de qualidade dos diluidores, tornando-os mais confiáveis e seguros [8].

Os meios diluentes a base de caseínas atribuem proteção a célula espermática durante o processo de refrigeração pela interação com as proteínas de ligação do plasma seminal equino (HSPs) [12], proteínas homólogas às proteínas de ligação do plasma seminal bovino (BSPs) estudadas por Manjunath et al. [13,14]. Esta interação evita o efluxo de colesterol e fosfolípidios da membrana plasmática do espermatozoide, evitando sua desestabilização e protegendo o espermatozoide da capacitação precoce [13,14]. Além desta proteção, os meios contendo caseínas aumentam substancialmente a taxa de ligação à zona pelúcida do oócito de equino e bovino [15,16].

Assim, o objetivo do presente estudo foi verificar o efeito dos diluentes contendo caseinato de sódio, caseinato de sódio acrescido de pentoxifilina e caseinato de sódio com colesterol em comparação aos seus equivalentes a base de leite desnatado sobre os parâmetros espermáticos *in vitro* e a fertilidade do sêmen equino refrigerado a 5°C por 24 horas.

## 2. Material e métodos

### 2.1 Aspectos éticos

O projeto foi realizado de acordo com preceitos éticos recomendados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e mediante aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais protocolo 110/2017 e termo assinado pelo proprietário autorizando a participação do animal no estudo.

### 2.2 Animais e delineamento experimental

Foram utilizados 19 garanhões (1 ejaculado de cada garanhão), da raça Quarto de Milha com idade variando entre 5 e 28 anos, alojados na região centro-oeste do estado de São Paulo. Os animais encontravam-se clinicamente sadios, em rotina de coleta e previamente ao estudo foram submetidos a exame andrológico completo. Para o teste de fertilidade foram usadas 60 éguas com idade entre 8 e 20 anos.

O estudo foi dividido em duas etapas. A primeira consistiu na avaliação laboratorial da viabilidade espermática *in vitro*, nos momentos após a diluição (T0) e 24 horas após a refrigeração a 5°C (T24) realizada em caixa de isopor comercial de refrigeração passiva (BotuFlex<sup>®</sup>, Botupharma, Botucatu, SP, Brasil).

A segunda etapa caracterizou-se pelo teste de fertilidade *in vivo*, no qual se utilizou um garanhão classificado como "*bad cooler*", que são animais que apresentam queda acentuada maior que 30% na motilidade e diminuição da fertilidade após processo de refrigeração e transporte do sêmen [7,11,17].

### 2.3 Coleta do ejaculado e processamento do sêmen

Os ejaculados foram colhidos com vagina artificial modelo Botucatu (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil). Após a obtenção do ejaculado, o sêmen foi filtrado com filtro de náilon (Minitube, Alemanha), avaliado e fracionado para posterior diluição na proporção que variou de 2:1 a 7:1 até alcançar a concentração de  $50 \times 10^6$  de espermatozoides/mL nos diluentes comerciais a base de leite desnatado BotuSêmen<sup>®</sup> (LD), BotuTurbo<sup>®</sup> (LDP) e BotuSêmen Special<sup>®</sup> (LDC) (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil), e diluentes contendo caseinato de sódio (CS), caseinato de sódio acrescido de pentoxifilina (CSP), e caseinato de sódio acrescido de colesterol (CSC). Os meios testes a base de caseinato de sódio foram obtidos pela substituição de 20 g de leite desnatado

do Botu-Sêmen<sup>®</sup>, Botu-Turbo<sup>®</sup> e Botu-Sêmen Special<sup>®</sup> por 20 g de caseinato de sódio (Sigma Audrich – C8654, St. Louis, MO, USA).

## 2.4 Análise espermática

As amostras seminais de ambos os grupos experimentais foram avaliadas 15 minutos após a incubação em banho maria a 37°C, nos momentos T0 e T24.

### 2.4.1 Avaliação da cinética espermática

As amostras foram avaliadas quanto a cinética espermática utilizando o aparelho de análise computadorizada (Hamilton Thorne Research – IVOS 12, Beverly, MA, USA), para mensuração da motilidade espermática total (MT) (%), motilidade espermática progressiva (MP) (%), velocidade de trajeto (VAP) (%), velocidade linear (VSL) ( $\mu\text{m/s}$ ), velocidade curvilínea (VCL) ( $\mu\text{m/s}$ ) e porcentagem de espermatozoides com movimento rápido (RAP) (%). Para cada amostra seminal foi considerada a média de 5 campos avaliados aleatoriamente quando depositado 10 $\mu\text{L}$  de sêmen na câmara de Makler<sup>®</sup> (Sefi-Medical Instruments, Haifa, Israel) pré-aquecidas a 37°C, avaliando-se no mínimo 200 células por campo (*Setup* utilizado descrito na Tabela 1).

Tabela 1. Ajuste do equipamento de análise computadorizada.

Parâmetros	Ajustes
Número de pontos examinados	30
Contraste das células em relação ao campo	60 pixels
Tamanho mínimo das células	3 pixels
Contraste para células móveis	30
<b>Motilidade progressiva</b>	
Retilinearidade	>80%
Velocidade média de percurso	>70 $\mu\text{m/s}$
<b>Static</b>	
Velocidade média de percurso	<30m/s
Cutoff	<20m/s
Velocidade em linha reta Cutoff	<20m/s
<b>Espermatozoides Rápidos</b>	
Velocidade média de percurso	>80 $\mu\text{m/s}$
Limite inferior de tamanho	0,62 pixel
Limite superior de tamanho	2,98 pixel
Limite inferior de intensidade	0,24
Limite superior de intensidade	1,19
Limite inferior de alongamento	0%
Limite superior de alongamento	100%
Lentos contados como móveis	Não
Magnificação	1,95

#### 2.4.2 Citometria de fluxo

O equipamento utilizado para análise em citometria de fluxo foi o BD LSR Fortessa (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) equipado com lasers azul 488nm, 100mW; vermelho 640nm, 40mW e violeta 405nm. Para este estudo, foi utilizada a excitação 488nm e os filtros de emissão utilizados foram 695/40nm (MitoSOXTM Red e iodeto de propídio), 530/30nm (SYTOX Green FITC-PSA). Para excitação em 640nm, o filtro de emissão foi 660/20nm (MitoSOXTM Red) e para excitação em 405 nm, o filtro de emissão foi 450/50nm (Hoechst 33342). No mínimo 10.000 células por amostra foram analisadas e os dados foram avaliados por um programa do mesmo fabricante BD FACSDiva™ software v 6.1.

Para avaliação do potencial mitocondrial, integridade de membrana plasmática e do acrossomo foi utilizado o protocolo proposto por Camargo [18]. Foram utilizados 5 µL de Hoescht (H 33342, cod 14533, Sigma-Audrich Co., St Louis, MO, EUA) (7,0 µM em água destilada), 2,5 µL de IP (1,5 µM em TALP-PVA), 0,2 µL de FITC-PSA (1,0 ng em solução de 0,01% de azida de sódio) e 2 µL da sonda MitoStatus Red (dimetilsulfóxido-DMSO), na concentração de 20 nM e 2 µL mantidas em banho maria a 37°C durante 15 minutos. Uma alíquota do ejaculado foi diluída em TALP-PVA (modificado de Parrish et al., 1988; 100 mM NaCl, 3,1 mM KCl, 25,0 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0,3 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 21,6 mM DL-lactato de sódio 60%, 2,0 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,4 mM MgCl<sub>2</sub>, 10,0 mM HEPES-livre de ácido, 1,0 mM piruvato de sódio, 1,0 mg/mL álcool polivinil - PVA e 25 µg/mL gentamicina) na concentração de 2x10<sup>6</sup> espermatozoides/mL. Em seguida, as sondas fluorescentes foram incubadas com 200 µL da mistura do ejaculado e TALP-PVA.

Para análise de mudanças na fluidez da membrana e viabilidade das células foi utilizado a combinação de Yo-Pro 1 (YP). A probe H 33342 foi utilizada para distinção da célula espermática de artefatos. Foram formadas 2 subpopulações de espermatozoides de acordo com a coloração. A primeira subpopulação de espermatozoides não corados foi considerada viva e sem alteração de membrana (YP negativo). A segunda subpopulação foi considerada espermatozoides inviáveis, que sofreram crioinjúrias, com aumento da fluidez da membrana (YP positivo). Para cada 191µL de sêmen diluído (5x10<sup>6</sup> espermatozoide/mL), H 33342 (7µL em água destilada) e YP (25nM em DMSO) foram adicionados e incubados a 37°C no escuro por 30 minutos para análise.

### *2.5 Teste de Fertilidade*

Para o teste de fertilidade foram utilizados 120 ciclos de 60 éguas durante as estações de monta de 2015/16 e 2016/17. A inseminação artificial foi realizada após 24 horas de refrigeração a 5° C utilizando caixa de isopor comercial para refrigeração passiva (BotuFlex®). A dose inseminante de  $1 \times 10^9$  espermatozoides móveis antes da refrigeração de acordo com Loomis [19].

As éguas foram monitoradas diariamente por ultrassonografia transretal utilizando o aparelho AV5 Sonoscape (Domed, Valinhos, SP, Brasil). A ovulação foi induzida com 250µg de Strelin® (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil) via intramuscular ao se detectar um folículo de diâmetro médio de 35 mm e presença de edema uterino. A inseminação artificial no corpo do útero foi realizada 24 horas após a indução da ovulação. Para o diagnóstico de gestação das éguas realizou-se exame ultrassonográfico por via transretal 15 dias após constatada a ovulação.

### *2.6 Análise Estatística*

As variáveis foram descritas pela média e erro padrão. A distribuição das variáveis foi avaliada pelo teste da normalidade pelo teste Kolmogorov-Smirnov (K-S) e quando apresentavam distribuição normal foi utilizado ANOVA de medidas repetidas seguido pelo teste de Tukey para determinar diferenças entre os grupos, e quando não apresentaram distribuição normal (dados não paramétricos) utilizou-se o teste de Friedman seguido de teste de Dunns. Para todos foi considerado valor de  $P < 0,05$ . As análises foram realizadas pelo Programa GraphPad Prism versão 6.0 para Windows (GraphPad software, San Diego, Califórnia, USA).

A taxa de fertilidade foi analisada por regressão logística usando Biostat 3.0 (Mamirauá Institute, Brasil), sendo consideradas as variáveis binárias.

## **3. Resultados**

No momento T0 não houve diferença estatística entre os grupos para a motilidade total ( $P=0,47$ ), entretanto para motilidade progressiva foi observado resultado superior para o LDC, LD e CSC. Para os demais parâmetros de cinética espermática foram observados resultados superiores para os grupos contendo leite desnatado em ambos os momentos (T0 e T24) (Tabela 2).

Tabela 2. Valores médios e erro padrão da cinética espermática nos grupos leite desnatado (LD), caseinato de sódio (CS), leite desnatado com pentoxifilina (LDP), caseinato de sódio com pentoxifilina (CSP), leite desnatado com colesterol (LDC) e caseinato de sódio com colesterol (CSC) nos momentos T0 e T24.

	Variáveis	LD	CS	LDP	CSP	LDC	CSC
0 horas	MT (%)	78,8±2,9	76,5±3,2	76,8±3,1	75,7±3,7	79,1±2,9	77,0±2,6
	MP (%)	37,8±2,4 <sup>ab</sup>	32,2±3,3 <sup>b</sup>	36,2±2,6 <sup>b</sup>	30,8±2,2 <sup>b</sup>	40,2±2,2 <sup>a</sup>	33,1±3,2 <sup>ab</sup>
	VSL (µm/s)	98,5±3,0 <sup>a</sup>	78,1±3,6 <sup>b</sup>	91,2±3,0 <sup>a</sup>	76,1±3,7 <sup>b</sup>	96,3±2,6 <sup>a</sup>	80,3±3,7 <sup>b</sup>
	VAP (µm/s)	130,5±4,7 <sup>a</sup>	100,2±5,3 <sup>b</sup>	118,3±3,5 <sup>a</sup>	97,5±5,6 <sup>b</sup>	121,8±3,7 <sup>a</sup>	99,0±4,9 <sup>b</sup>
	VCL (µm/s)	232,4±7,5 <sup>a</sup>	186,8±7,7 <sup>b</sup>	209,2±7,6 <sup>ab</sup>	189,3±8,1 <sup>bc</sup>	219,4±5,6 <sup>a</sup>	183,7±6,9 <sup>c</sup>
	RAP (%)	72,2±3,4 <sup>a</sup>	59,1±5,4 <sup>ab</sup>	68,5±3,6 <sup>ab</sup>	59,9±5,3 <sup>ab</sup>	70,9±3,5 <sup>a</sup>	58,5±4,6 <sup>b</sup>
		Variáveis	LD	CS	LDP	CSP	LDC
24 horas	MT (%)	74,3±3,5 <sup>ab</sup>	68,6±4,3 <sup>ab</sup>	67,9±5,0 <sup>b</sup>	71,9±3,6 <sup>ab</sup>	77,5±3,2 <sup>a</sup>	69,4±4,2 <sup>b</sup>
	MP (%)	37,5±3,5 <sup>ab</sup>	26,5±3,1 <sup>c</sup>	31,9±3,3 <sup>bc</sup>	31,0±2,7 <sup>bc</sup>	42,4±2,8 <sup>a</sup>	30,4±3,4 <sup>bc</sup>
	VSL (µm/s)	90,4±3,8 <sup>a</sup>	71,3±4,1 <sup>b</sup>	78,0±3,3 <sup>b</sup>	72,8±2,7 <sup>b</sup>	93,4±2,7 <sup>a</sup>	76,9±3,2 <sup>b</sup>
	VAP (µm/s)	115,3±4,7 <sup>a</sup>	93,7±5,5 <sup>b</sup>	101,5±4,0 <sup>b</sup>	94,1±3,2 <sup>b</sup>	117,3±3,3 <sup>a</sup>	99,6±3,9 <sup>b</sup>
	VCL (µm/s)	201,8±9,7 <sup>ab</sup>	180,1±8,2 <sup>c</sup>	192±6,1 <sup>abc</sup>	180,2±4,8 <sup>c</sup>	212,7±5,2 <sup>a</sup>	186,8±5,8 <sup>bc</sup>
	RAP (%)	64,1±4,2 <sup>ab</sup>	49±5,5 <sup>c</sup>	56,9±5,2 <sup>bc</sup>	55,4±4,3 <sup>c</sup>	68,8±3,6 <sup>a</sup>	54±5,1 <sup>bc</sup>

MT = Motilidade Total, MP = Motilidade Progressiva, VAP = velocidade de trajeto, VSL = velocidade linear, VCL = velocidade curvilínea e RAP = porcentagem de espermatozoides com movimento rápido. T0 = 15 minutos após a diluição. T24 = 15 minutos após refrigeração a 5°C por 24 horas. Letras diferentes na mesma linha significa diferença estatística (P<0,05).

Na avaliação da integridade de membrana plasmática e acrossomal (MPAI) para o momento T0, os grupos CS, CSC e LDC apresentaram diferença estatística (P < 0,05) quando comparado ao CSP, apresentando maior integridade das membranas. Os grupos LD e LDP não apresentaram diferença estatística dentre os grupos testados. Para avaliação no momento T24, a maior integridade de membrana se manteve para os grupos CS, CSC, LD e LDC (Tabela 3). Já na avaliação com o corante Yo-Pro, que analisa a desestabilização da membrana, marcando mais precocemente a falta de integridade da mesma, os grupos CSC e LDC demonstraram fornecer maior proteção para a membrana no momento T0 comparado aos demais grupos, enquanto para avaliação no momento T24, os grupos CS, CSC e LDC apresentaram melhor proteção para membrana plasmática da célula espermática (Tabela 3).

Tabela 3. Valores médios e erro padrão para integridade e desestabilização de membrana avaliadas por citometria de fluxo nos grupos leite desnatado (LD), caseinato de sódio (CS), leite desnatado com pentoxifilina (LDP), caseinato de sódio com pentoxifilina (CSP), leite desnatado com colesterol (LDC) e caseinato de sódio com colesterol (CSC) nos momentos T0 e T24.

0 horas	Variáveis	LD	CS	LDP	CSP	LDC	CSC
	MPAI	68,4±2,8 <sup>ab</sup>	68,8±2,7 <sup>a</sup>	65,3±3,4 <sup>ab</sup>	64,9±3,2 <sup>b</sup>	70,4±2,9 <sup>a</sup>	69,3±2,8 <sup>a</sup>
Yopro -	58,3±3,6 <sup>bc</sup>	59,3±3,5 <sup>bc</sup>	56,6±3,9 <sup>c</sup>	54,6±3,6 <sup>c</sup>	61,3±3,5 <sup>ab</sup>	64,1±3,7 <sup>a</sup>	

24 horas	Variáveis	LD	CS	LDP	CSP	LDC	CSC
	MPAI	61,1±4,4 <sup>abc</sup>	62,4±3,9 <sup>ab</sup>	55,1±4,7 <sup>c</sup>	55,9±4,2 <sup>b</sup>	64,9±3,7 <sup>a</sup>	64,5±3,5 <sup>a</sup>
Yopro -	52,5±4,6 <sup>bcd</sup>	53,2±4,6 <sup>ab</sup>	47,3±4,6 <sup>d</sup>	47,9±4,7 <sup>cd</sup>	54,7±4,0 <sup>ab</sup>	59,3±3,7 <sup>a</sup>	

MPAI= Membrana plasmática e acrossomal íntegra, Yopro - = porcentagem de membrana plasmática íntegra. T0 = 15 minutos após diluição. T24 = 15 minutos após refrigeração a 5°C por 24 horas. Letras diferentes na mesma linha significa diferença estatística (P<0,05).

Para avaliação do potencial mitocondrial foi utilizado método qualitativo (intensidade de fluorescência) e método quantitativo (porcentagem de alto potencial mitocondrial), no qual o grupo LDC se destacou em ambos os momentos, apresentando maior potencial mitocondrial, com maior intensidade de fluorescência. Já o grupo CSC apresentou alto potencial mitocondrial, entretanto se diferenciou estatisticamente do grupo LDC quando comparado a intensidade de fluorescência (Tabela 4).

Tabela 4. Valores médios e erro padrão de intensidade de fluorescência e potencial mitocondrial avaliados por citometria de fluxo nos grupos leite desnatado (LD), caseinato de sódio (CS), leite desnatado com pentoxifilina (LDP), caseinato de sódio com pentoxifilina (CSP), leite desnatado com colesterol (LDC) e caseinato de sódio com colesterol (CSC) em T0 e T24.

0 horas	Variáveis	LD	CS	LDP	CSP	LDC	CSC
	Intensidade de fluorescência	8,4±1,5 <sup>ab</sup>	5,6±1,1 <sup>bc</sup>	9,2±2,0 <sup>ab</sup>	5,6±0,9 <sup>abc</sup>	9,2±1,5 <sup>a</sup>	4,8±1,1 <sup>c</sup>
APM (%)	60,0±3,3 <sup>b</sup>	57,0±3,5 <sup>b</sup>	62,7±3,6 <sup>b</sup>	56,9±3,9 <sup>b</sup>	69,6±3,2 <sup>a</sup>	58,0±4,8 <sup>ab</sup>	

24 horas	Variáveis	LD	CS	LDP	CSP	LDC	CSC
	Intensidade de fluorescência	4,9±5,9 <sup>ab</sup>	4,0±0,5 <sup>bc</sup>	4,6±0,6 <sup>bc</sup>	3,7±0,4 <sup>c</sup>	5,8±0,7 <sup>a</sup>	3,9±0,4 <sup>bc</sup>
APM (%)	51,5±5,4 <sup>ab</sup>	50,7±5,7 <sup>ab</sup>	47,6±5,7 <sup>b</sup>	47,8±5,4 <sup>b</sup>	56,5±5,6 <sup>a</sup>	53,6±5,8 <sup>ab</sup>	

Intensidade de fluorescência x  $10^3$  (U.A.) = Intensidade de fluorescência para potencial mitocondrial. APM (%) = alto potencial mitocondrial. T0 = 15 minutos após diluição. T24 = 15 minutos após refrigeração a 5°C por 24 horas. Letras diferentes na mesma linha significa diferença estatística ( $P < 0,05$ ).

Os resultados de fertilidade revelaram diferença estatística para o grupo CSC dentre todos os grupos estudados, com exceção do grupo LDC, que se mostrou semelhante (Tabela 5).

Tabela 5. Taxa de fertilidade por ciclo (%) para os grupos leite desnatado (LD), caseinato de sódio (CS), leite desnatado com pentoxifilina (LDP), caseinato de sódio com pentoxifilina (CSP), leite desnatado com colesterol (LDC) e caseinato de sódio com colesterol (CSC) utilizando sêmen de garanhão *bad cooler* refrigerado por 24 horas a 5°C.

Grupo	LD	CS	LDP	CSP	LDC	CSC
<i>Bad cooler</i>	40 (8/20) <sup>b</sup>	45 (9/20) <sup>b</sup>	50 (10/20) <sup>b</sup>	50 (10/20) <sup>b</sup>	55 (11/20) <sup>ab</sup>	85 (17/20) <sup>a</sup>

Letras diferentes significam diferença estatística (P<0,05).

#### 4. Discussão

O uso de diluentes de sêmen quimicamente definidos possibilita a padronização dos lotes, mas para isso é preciso que a qualidade do sêmen durante o armazenamento se mantenha semelhante ou superior aos meios comerciais a base de leite disponíveis.

Não houve diferença estatística para os resultados encontrados no momento T0 para motilidade total (MT), corroborando com os achados de diversos autores quando comparado meios de leite desnatado a meios a base de caseína [5,20-23]. Isto pode ter ocorrido devido ao pouco tempo que o sêmen ficou em contato com o meio diluente até a avaliação (incubação por 15 minutos), não permitindo que houvesse diferença perceptível na ação de proteção dos diferentes meios estudados.

Diferentemente do relatado por Garcia [21] com o sêmen fresco, no qual não houve diferença entre os grupos, observou-se valores superiores para motilidade progressiva (MP) nos grupos CSC, LD e LDC. Já Pagl et al. [5] encontraram valores mais elevados para os grupos com caseína tanto para o sêmen a fresco, como para refrigeração com 24h. Para os parâmetros de velocidade (VSL, VAP, VCL e RAP) às 0 horas e 24 horas pós-refrigeração foram observados resultados superiores na maior parte das avaliações para os grupos a base de leite desnatado. Pagl et al. [5] observaram valores mais elevados para os grupos com diluentes com fração proteica do leite definido.

O sêmen fresco diluído com leite desnatado e pentoxifilina apresentou valores elevados para parâmetros de velocidade espermática, assim como descritos por Goulart et al. [24] e Guasti et al. [25,26]. A pentoxifilina acrescida ao diluente de sêmen é

responsável por aumentar a concentração de AMPc no interior da célula, mantendo a

energia que atua diretamente no controle do flagelo do espermatozoide [27], provavelmente elevando o valor do potencial mitocondrial (APM). Esta relação não pode ser observada nos momentos estudados (T0 e T24) já que os grupos contendo pentoxifilina obtiveram resultados semelhantes aos grupos CS, CSC e LD. Possivelmente, os garanhões utilizados no presente estudo não se beneficiaram com a utilização deste fármaco, assim como no estudo de Farrás et al. [22], devido os animais utilizados apresentarem alto padrão de motilidade espermática.

Os grupos com adição de colesterol (CSC e LDC) demonstrou proteger eficientemente a membrana espermática nos testes que avaliaram a porcentagem de integridade da membrana plasmática e acrossomal em ambos os momentos estudados, ressaltando a ação que o colesterol exerce na estabilização das membranas durante o processo de refrigeração, reduzindo os danos em sua estrutura [17,28].

Apesar dos grupos CS e CSC não proporcionarem melhores padrões de cinética espermática, de maneira geral apresentaram melhor estabilização da membrana e parâmetros para potencial mitocondrial adequados para manter um cadenciamento do movimento flagelar, o que parece ser mais positivo que a elevada porcentagem de potencial mitocondrial e intensidade de fluorescência quando relacionado com o resultado do teste de fertilidade de garanhões "*bad cooler*".

A adição de colesterol ao meio diluente pode incrementar as taxas de fertilidade para garanhões "*bad cooler*" quando refrigerado por 24 horas [17]. Os resultados para fertilidade demonstraram diferença estatística entre o grupo CSC e os demais grupos que não continham colesterol. Entre os grupos contendo colesterol (LDC e CSC), foi observado semelhança estatística com valor de P entre os grupos de 0,07, tendenciando a diferença estatística entre os grupos. Comparando meio a base de caseína com colesterol e leite com colesterol observou-se tendência de melhor fertilidade para o meio contendo caseína [21]. É possível que o aumento do número de éguas testadas para cada tratamento resulte em diferença estatística.

A taxa de fertilidade do grupo CSC pode ser embasada na soma de benefícios propiciados pelo colesterol e caseína. Como a ação estabilizadora do colesterol na membrana plasmática [17,28], a ação protetora das caseínas em relação às HSPs [12-14], bem como a maior taxa de ligação do espermatozoide à zona pelúcida do oócito que é observado quando utilizado meios diluentes contendo caseínas na espécie equina e bovina

[15,16]. Após a diluição do sêmen, as caseínas sequestram as proteínas de ligação do plasma seminal, impedindo sua ligação com a membrana plasmática, evitando assim a

desestabilização e consequente capacitação [13,14]. Esta relação pode ser evidenciada nos resultados do YoPro, pois o grupo CSC apresentou menor porcentagem de membrana plasmática desestabilizada que a maioria dos grupos testados (Tabela 3) com consequente retardo da capacitação ao decorrer do tempo, resultando numa tendência de melhor fertilidade para o grupo.

## 5. Conclusão

A utilização de caseinato de sódio mostrou-se uma alternativa viável para a substituição do leite desnatado em diluentes de refrigeração de sêmen equino. Apesar de observar-se um leve decréscimo nas características de cinética espermática, os diluentes a base de caseinato de sódio contribuíram significativamente para alta taxa de fertilidade em garanhões "*bad cooler*".

## Referências

- [1] Jasko DJ, Moran DM, Farlin ME, Squires EL. Effect of seminal plasma dilution or removal on spermatozoal motion characteristics of cooled stallion semen. *Theriogenology* 1991;35:1059–67.
- [2] Jasko DJ, Hathaway JA, Schaltenbrand VL, Simper WD, Squires EL. Effect of seminal plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. *Theriogenology* 1992;37:1241–52.
- [3] Garcia BM, Fernandez LG, Ferrusola CO, Bolanos JMG, Martinez HR, Tapia JA, Morcuende D, Pena FJ. Fatty acids and plasmalogens of the phospholipids of the sperm membranes and their relation with the post- thaw quality of stallion spermatozoa. *Theriogenology* 2011;75:811-18.
- [4] Vidament M, Dupere AM, Julienne P, Evain A, Noue P, Palmer E. Equine frozen semen: freezability and fertility field results. *Theriogenology* 1997;48:907–17.
- [5] Pagl R, Aurich JE, Müller-schlösser F, Kankofer M, Aurich C. Comparison of an extender containing defined milk protein fractions with a skim milk-based extender for storage of equine semen at 5°C. *Theriogenology* 2006;66:1115-22.
- [6] Contri A., Amicis I., Veronesi M.C., Faustini M., Robbe D., Carlucci O A. Efficiency of different extenders on cooled semen collected during long and short day length seasons in Martina Franca donkey. *Anim Reprod Sci* 2012;120:136–41.
- [7] Brinsko SP, Crockett EC, Squires EL. Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. *Theriogenology* 2000; 54:129–36.
- [8] Aurich C. Recent advances in cooled-semen technology. *Anim Reprod Sci*

2008;107:268-75

- [9] Kenney RM, Berman RV, Cooper WL, Morse GW. Minimal contamination techniques for breeding mares: techniques and preliminary findings. In: Annual Convention, American Association Equine Practitioners, Boston: AAEP 1975;21: 327-335.
- [10] Batellier F. Identification, purification et mécanisme d'éléments contenus dans le lait, agissant sur les spermatozoïdes équin. [Doutorado]. Tours: Sciences et Techniques, Université François Rabelais de Tours; 1997. Disponível em: <<http://wcentre.tours.inra.fr/prc/internet/resultats/theses/batellier/table.htm>>. Acesso em: 10 julho. 2017.
- [11] Batellier F, Vidament M, Fauquant J, Duchamp G, Arnaud G, Yvon JM, Magistrini M. Advances in cooled semen technology. *Anim Reprod Sci* 2001;68:181-190.
- [12] Calvete JJ, Mann K, Schafer W, Sanz L, Reinert M, Nessau S, Raida M, Topfer-petersen E. Amino acid sequence of HSP-1, a major protein of stallion seminal plasma: effect of glycosylation on its heparin- and gelatin-binding capabilities. *Biochem. J.* 1995;310:615-22.
- [13] Manjunath P. New insights into the understanding of the mechanism of sperm protection by extender components. *Anim Reprod* 2012; 9:809-15.
- [14] Manjunath P, Theriën I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *J Reprod Immunol* 2002;53:109-19.
- [15] Coutinho da Silva MA, Seidel GE, Jr., Squires EL, Graham JK, Carnevale EM. Effects of components of semen extenders on the binding of stallion spermatozoa to bovine or equine zonae pellucidae. *Reprod* 2012;143:577-85.
- [16] Coutinho da Silva MA, Seidel GE, Jr., Squires EL, Graham JK, Carnevale EM. Effects of milk proteins on sperm binding to the zonapellucida and intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration in stallionsperm. *Anim Reprod Sci* 2014;150:24-9.
- [17] Hartwig FP, Lisboa FP, Hartwig FP, Monteiro GA, Maziero RRD, Freitas-Dell`aqua CP, Alvarenga MA, Papa FO, Dell`aqua Jr JA. Use of cholesterol-loaded cyclodextrin: An alternative for bad cooler stallions. *Theriogenology* 2014;81:340-46.
- [18] Camargo LS. Correlação das proteínas do plasma seminal com a congelabilidade do sêmen de cães [Dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"; 2017.
- [19] Loomis PR. Advanced Methods for Handling and Preparation of Stallion Semen. *Vet Clin Equine* 2006;22:663-76.
- [20] Papa PM, Ramires-neto C, Monteiro GA, Sancler-silva YFR, Resende HL, Freitas-Dell`aqua CP, Dell`aqua Jr JA, Alvarenga MA, Papa FO. Sperm parameters and fertility of stallion semen cooled with different extenders. *J Equine Vet Sci* 2014;34:79.

[21] Garcia VFC. Efeitos da adição de caseinato de sódio no diluente de refrigeração de sêmen equino. [Dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"; 2016.

- [22] Farrás MC, Avanzi BR, Melo CM, Dell'aqua JA, Papa FO. Efeito de diferentes diluentes na manutenção das características do sêmen eqüino em dois sistemas de refrigeração passiva. Ci. Anim. Bras. 2008;9:693-9.
- [23] LeFrappier MS, Walston BS, Whisnant CS. Comparison of various extenders for storage of cooled stallion spermatozoa for 72 hours. J Equine Vet Sci 2010;30:200-4.
- [24] Goulart HM, Silva AEDF, McManus C, Papa FO. Efeitos da pentoxifilina sobre a viabilidade *in vitro* dos espermatozóides de eqüinos, após o resfriamento a 5°C. R. Bras. Zootec. 2004;33:112-22.
- [25] Guasti PN, Monteiro GA, Maziero RRD, Martin I, Avanzi BR, Dell'Aqua Jr JA, Papa FO. Effects of pentoxifylline on equine epididymal sperm. J Equine Vet Sci 2013;33:1153-6.
- [26] Guasti PN, Monteiro GA, Maziero RRD, Carmo MT, Dell'Aqua Jr JA, Crespilho AM, Rifai EA, Papa FO. Pentoxifylline effects on capacitation and fertility of stallion epididymal sperm. Anim Reprod Sci 2017;179: 27–34.
- [27] Ponce AA, FiolDeCuneo M, Ruiz RD, Vincenti LM, Santillá ME, Stutz G, Jacuara JL. Influence of pentoxifylline on sperm membrane functional integrity. Arch Androl 1999;43: 77-84.
- [28] Graham JK. Principles of cooled semen. In: McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD. Equi Reprod. 2 ed. New Delhi: Wiley-Blackwell; 2011. p.1308-1315.