

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

**ADIÇÃO DE CASEINATO DE SÓDIO AO DILUENTE DE
REFRIGERAÇÃO DE SÊMEN EQUINO**

VICTOR FILGUEIRAS CRUZ GARCIA

BOTUCATU – SP
Setembro 2016

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

ADIÇÃO DE CASEINATO DE SÓDIO AO DILUENTE DE REFRIGERAÇÃO DE SÊMEN EQUINO

VICTOR FILGUEIRAS CRUZ GARCIA

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

Orientador: Prof. Dr. José Antonio Dell’Aqua Junior

BOTUCATU – SP
Setembro 2016

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

Garcia, Victor Filgueiras Cruz.

Adição de caseinato de sódio ao diluente de
refrigeração de sêmen equino / Victor Filgueiras Cruz
Garcia. - Botucatu, 2016

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. Caseína. 3. Preservação do sêmen.
4. Biotecnologia animal.

Palavras-chave: Caseína; Diluidor; Sêmen refrigerado.

Nome do Autor: Victor Filgueiras Cruz Garcia

Título: **ADIÇÃO DE CASEINATO DE SÓDIO AO DILUENTE DE REFRIGERAÇÃO DE SÊMEN EQUINO.**

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Antonio Dell'Aqua Junior

Orientador

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ- UNESP- Botucatu

Prof. Dr. Marco Antonio Alvarenga

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ- UNESP- Botucatu

Profa. Dr. Rubens Paes de Arruda

Membro

Departamento de Reprodução Animal

FMVZ- USP- Pirassununga

Data da defesa: 29 de Setembro de 2016

*Dedico essa dissertação aos meus pais, **Ramon e Cássia**, que com muito esforço e amor me possibilitaram estar aqui. Meus irmãos, **Felipe e Bia**, aos familiares e a **Gabi** por tanta paciência, compreensão e amor.*

*Ao meu orientador, **José Antonio Dell'Aqua Junior**, pela confiança depositada em mim e por todo conhecimento transmitido.*

Agradecimentos

Agradeço a Deus, pois é Ele que sempre regi o que acontece na minha vida, permitindo que eu estivesse aqui hoje.

Aos meus pais, Ramon e Cássia, por serem exemplo de amor e caráter. Sei o quanto se sacrificaram para que eu pudesse ter sempre o melhor possível. Amo vocês!

Aos meus irmãos Felipe e Bia, e a minha cunhada Manuela, pelo amor, carinho e apoio. Este período de distância serviu para nos unir ainda mais.

À minha família (avós, tios, tias, primos e primas) por toda compreensão ao longo desta jornada.

À Gabi, meu amor, por estar sempre ao meu lado, me apoiando, incentivando e vibrando a cada vitória. Te amo!

Aos amigos, desde aqueles que “trouxe” comigo da Bahia até os que foram cativados aqui em Botucatu. Não citarei nomes, vamos evitar esquecimentos!! Todos vocês tornaram meus dias melhores, obrigado!

Agradeço ao meu orientador José Antonio Dell’Aqua Junior e a Camila De Paula Freitas Dell’Aqua, por toda confiança, pelos ensinamentos e “puxões de orelha”, mas principalmente pela relação construída. Muito obrigado.

Agradeço aos professores do Departamento de Reprodução Animal, pelos conhecimentos a mim transferidos. Obrigado por tudo.

Aos funcionários do Departamento de Reprodução Animal da UNESP-Botucatu, pela amizade, vocês também foram essenciais nesta caminhada.

À Universidade Federal da Bahia, que me deu a base de tudo, em especial aos Profº. Dr. Alberto Lopes Gusmão e Profº. Dr. Max Vitoria Resende, muito obrigado!

Enfim, agradeço a todos que contribuíram para a elaboração e sucesso deste trabalho.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	1
1. INTRODUÇÃO	2
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1- Célula espermática	3
2.2- Membrana plasmática	4
2.3- Plasma Seminal	6
2.4- Diluentes	7
2.5- Estrutura, função e mecanismo de ação da caseína	11
2.6- Sêmen refrigerado: Leite <i>versus</i> Caseína	14
REFERÊNCIAS	16
CAPÍTULO II	17
SUBSTITUIÇÃO DO LEITE DESNATADO PELO CASEINATO DE SÓDIO PARA REFRIGERAÇÃO DE SÊMEN EQUINO	23
CAPÍTULO III	35
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	36

GARCIA, V.F.C (2016). **Adição de caseinato de sódio ao diluente de refrigeração de sêmen equino**. Botucatu, 2016, 35 p., Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, departamento de reprodução animal e radiologia veterinária.

Resumo

Dentre as biotecnologias aplicadas na espécie equina, a refrigeração de sêmen tem papel de destaque por ser acessível e permitir grande avanço genético. O emprego da refrigeração possibilita o uso de garanhões sem que necessite transporte dos reprodutores, diminuindo custos e riscos. Porém para manutenção das células espermáticas em baixas temperaturas com a adequada proteção às criosinúrias se faz necessário o uso de diluentes que não interajam com os espermatozoides conferindo estabilidade à membrana. O estudo destes diluentes esclarece questões quanto à sua ação e mecanismos de proteção, entretanto os diluentes de maior disponibilidade e consequentemente mais empregados são os compostos por leite em pó desnatado, lhe dando uma composição variável, de difícil repetibilidade entre os lotes. Neste sentido é indicado a busca por substâncias que promovam a devida proteção espermática e tornem os diluentes mais eficientes. O objetivo desta revisão foi estudar o emprego da caseína como substitutivo para o leite em pó desnatado.

Palavras-chave: caseína, diluidor, sêmen refrigerado.

GARCIA, V.F.C (2016). **Addition of sodium caseinate in the extender of equine semen refrigeration**. Botucatu, 2016, 35 p., Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, departamento de reprodução animal e radiologia veterinária

Abstract

Among biotechnology for equine, semen cooling has an important role to be accessible and allow large genetic advancement. The use of cooling permits the use of studs without the need to transport stallions, reducing the costs and risks. However, to maintain low temperatures and adequate protection to create injuries to the use of extenders is required that will interact with the stability of sperm membrane. The study of these extenders answers questions about its mechanisms of action and protection, however, the extenders of greater availability and therefore more used in routine is based on milk skimmed milk powder, giving it a variable composition, difficult repeatability between lots. In this sense it is given for the search for substances that promote adequate protection of spermatozoa and make them more efficient diluents. The objective of this review was to study the use of casein as a substitute for skimmed milk powder.

Palavras-chave: casein, diluent, cooled semen.

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

A indústria equina teve um grande avanço nos últimos anos, e atualmente tem importante participação no Produto Interno Bruto nacional, gerando montantes superiores a 7,3 bilhões de reais, sendo responsável por 3,2 milhões de empregos diretos e indiretos em cerca de 30 setores (LIMA; SHIROTA; BARROS, 2006). Como parte deste sucesso diretamente ligado aos progressos biotecnológicos na área da reprodução equina mundial. Podendo citar, dentre estas biotecnologias, a utilização do sêmen refrigerado equino. Técnica esta que se sobressai como a ferramenta mais utilizada nesse seguimento.

Em um cenário globalizado, onde as inter-relações entre os países estão mais estreitas, é preciso buscar soluções para o fomento do comércio exterior e valorização da biotecnologia nacional. Neste sentido se faz necessário a determinação de um diluidor sintético para refrigeração do sêmen equino que possa romper barreiras sanitárias e ser comercializado internacionalmente. Contudo, os meios diluentes devem apresentar a capacidade de manter a integridade e viabilidade dos espermatozoides durante o processo de refrigeração e transporte. O sucesso no uso do sêmen refrigerado envolve muitos fatores, dentre estes, a temperatura de armazenamento, composição do diluente, número de espermatozoides inseminados e número de inseminações (BATELLIER et al, 2001).

Entre as vantagens da refrigeração, destacam-se a otimização do uso de ganhanhões com comprovada superioridade genética através do prolongamento da viabilidade das células espermáticas e possibilidade de envio de doses inseminantes para uso em matrizes que estejam distantes do ganhão, além da diminuição de custos e risco de acidentes durante o transporte dos animais. Além do controle sanitário, redução das chances de transmissão de doenças carreadas pelo contato sexual ou qualquer outra enfermidade alheia ao ambiente onde se encontra a égua (BRINSKO; VARNER, 1992).

Segundo Canisso et al. (2008) entre os diluentes mais utilizados em todo mundo estão aqueles à base de leite em pó desnatado, sendo derivações do descrito por Kenney et al. (1975). Pesquisas apontam que o armazenamento

nas temperaturas entre 4 e 6°C conferem resultados mais satisfatórios em relação ao armazenamento entre 15 ou 20°C quando comparados aos diluentes a base de leite (PALMER, 1984; SQUIRES et al., 1988; VARNER et al., 1988; VARNER et al., 1989; MORAN et al., 1992).

Contudo, algumas pesquisas vêm evidenciando a superioridade de novos diluentes cuja as bases são frações específicas do leite, tal como as caseínas. Além de poder prevenir interações indesejáveis com substâncias presentes no leite que podem agir diminuindo a capacidade de fertilização e sobrevivência dos espermatozoides devido a indução da reação acrossomal (PIERRE et al., 1992; POMMER et al., 2002; AURICH, 2008), o uso de diluentes tendo como base as caseínas podem interagir com proteínas plasmáticas específicas elevando o potencial gerador deste sêmen (MANJUNATH, 2012).

Neste sentido, diluentes compostos por caseinatos têm sido incluídos em experimentos com sêmen equino, contudo a literatura ainda é discreta e carece de resultados mais expressivos. Assim sendo, o objetivo do presente estudo é verificar se a substituição do leite pelo caseinato de sódio no diluente para sêmen refrigerado equino proporciona características espermáticas adequadas para manutenção da viabilidade espermática.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Célula espermática

A espermatogênese é o processo pelo qual são produzidos os espermatozoides no epitélio seminífero. Este epitélio é composto pelas células de Sertoli, e células germinativas, e envolve a espermatogênese, a qual é dividida em três fases, a espermatocitogênese (proliferação), a meiose (multiplicação) e a espermiogênese (GARNER; HAFEZ, 2004). Posteriormente, estas células são maturadas no epidídimo e armazenadas na cauda deste conduto, até o momento da ejaculação (SETCHELL, 1993).

As células espermáticas são estruturas altamente especializadas, morfológicamente divididas em cabeça, colo e cauda (SINGH, 2006). A região

da cabeça do espermatozoide equino apresenta uma forma elíptica, sendo composta pelo núcleo, o acrossomo, a região pós-acrossomal, quantidade diminuta de elementos no citoplasma e a fossa de implantação. No núcleo está concentrada a cromatina, DNA. O acrossoma é uma espécie de capuz derivado do complexo de Golgi que recobre dois terços da cabeça, que contém glicolípidios e enzimas hidrolíticas, como pró-acrosina, hialuronidase, esterases e hidrolases ácidas (PESCH; BERGMANN, 2006), que são essenciais para penetração do espermatozoide no oócito (FERNANDES; PIMENTEL, 1997; GUYTON; HALL, 1997). A lâmina pós-acrossomal também parece ter papel na ligação com o oócito, enquanto a fossa de implantação é o local de implantação da cauda (JUHÁSZ et al., 2000).

O colo é a área de transição entre a cabeça e a peça intermediária do espermatozoide e armazena os centríolos (MIES FILHO, 1987). A peça intermediária é composta pela bainha mitocondrial, matriz energética geradora de adenosina trifosfato (ATP), dando ao espermatozoide a capacidade de movimentação flagelar por meio do axonema (MIES FILHO, 1987; CARVALHO et al., 2002; GARNER; HAFEZ, 2004; SINGH, 2006). O axonema é composto por um par de microtúbulos centrais envoltos por outros 9 pares de microtúbulos externos, num arranjo “9 + 2”, que deslizam sobre si levando ao movimento da célula. A cauda, formada pelas peças intermediária, principal e terminal, é a parte mais longa da célula espermática (SINGH, 2006).

2.2 Membrana plasmática

A membrana plasmática é composta por uma bicamada lipídica, proteínas e carboidratos. O espermatozoide de mamíferos é completamente envolto pela membrana plasmática, sendo segmentado em: acrossoma, segmento equatorial e basal, peça intermediária e cauda; onde cada um desempenha uma função específica (LADHA et al., 1998 e ALMEIDA, 2006).

A análise da viabilidade da membrana espermática tem sido descrita como melhor preditivo de fertilidade em comparação aos testes convencionais de concentração, motilidade, morfologia, que parecem ter uma competência limitada a este quesito (AMANN, 1989). Segundo Lagares et al. (2000), a

integridade e composição da membrana é passível de mudanças durante variados processos aos quais o sêmen está sujeito, como a fertilização, a manipulação e a estocagem. Tendo o conhecimento dos seus efeitos metabólicos quando em interação com os meios diluentes, torna-se primordial o estudo dessas membranas (LAGARES et al., 2000).

No momento da refrigeração, os componentes da membrana são os mais afetados e, quando o sêmen atinge temperaturas de aproximadamente 5°C, há mudanças morfofuncionais que alteram a permeabilidade, motilidade e capacidade de fecundação dos espermatozoides (AMANN; GRAHAM, 2011).

Quando o sêmen equino é colhido, sua temperatura é de aproximadamente 35°C e, quando submetido à refrigeração, o espermatozoide passa por uma mudança na organização dos ácidos graxos, o que altera o estado físico da membrana, que passa de líquido cristalino para gel (AMANN; GRAHAM, 2011). O período de maior sensibilidade das células é o compreendido entre as temperaturas de 19° C e 8° C (MORAN et al., 1992), chamada fase de transição. Esta fase é determinante para a qualidade do espermatozoide refrigerado.

As taxas de refrigeração também podem influenciar negativamente na membrana espermática, especialmente em curvas acima de -1° C/min ou inferiores a 0,3°C/min, porém durante a fase de transição, período mais crítico da refrigeração, a curva deve obedecer a valores de 0,05°C/min encerrando o arrefecimento de 37°C a 4°C em um período de 4 horas (DOUGLAS-HAMILTON; BURNS; DRISCOLL, 1987; KAYSER et al., 1992; MORAN et al., 1992).

As espécies que apresentam maior concentração de colesterol na membrana dos espermatozoides tendem a ser mais resistentes ao choque frio, podendo fazer com que a fase gel não ocorra, se limitando a um estado fluído intermediário (HARTWIG; PAPA; DELL'AQUA JR, 2012). Contudo o equino não é uma dessas espécies, assim a adição de colesterol aos diluentes traz benefícios para aqueles animais que apresentam baixa resistência a refrigeração (HARTWIG et al., 2014).

A manutenção dos espermatozoides a uma temperatura de refrigeração de 5°C, leva a redução do metabolismo ativo a apenas 10%, resultando em

baixa da taxa catabólica das células e prolongando a vida útil espermática (AURICH, 2008; NUNES et al., 2006).

Contudo algumas estratégias podem ser tomadas para minimizar os danos causados pela refrigeração, entre elas as taxas de refrigeração e os meios diluidores, que podem conferir maior estabilidade as células, protegendo a membrana e consequentemente a função do espermatozoide.

2.3 Plasma seminal

O plasma seminal é uma secreção fundamental à fertilização, atuando como protetor e carreador dos espermatozoides (GARNER; HAFEZ, 2004). É oriundo da *rete testis*, epidídimo, ampola, próstata, vesícula seminal e glândula bulbouretral (SAMPER, 2000; KARESKOSKI; KATILA, 2008).

Segundo Guasti, Monteiro e Papa (2012) dentre variadas funções, desde o metabolismo espermático até a fecundação, o plasma é responsável pelo início da motilidade espermática, controle microbiológico e neutralização de metabólitos. Além de estar envolvido com a capacitação espermática e inflamação uterina pós cobertura.

O plasma seminal tem a capacidade de combater as espécies reativas de oxigênio geradas pelos espermatozoides, reduzindo os danos causados aos mesmos, desfragmentação de DNA e peroxidação lipídica (BALL et al., 2001; POTTS; NOTARIANNI; JEFFERIES, 2000).

Contudo, estudos tem demonstrado que espermatozoides colhidos diretamente dos epidídimos de garanhões, pós castração, não tendo contato com as demais substâncias presentes no ejaculado, advindas de estruturas posteriores a cauda do epidídimo, são capazes de fecundar oócitos (MONTEIRO, 2010; MONTEIRO et al., 2011).

Os efeitos do plasma seminal sobre os espermatozoides são conflitantes, Barreto (2007) relata que há diversos artigos referindo tanto os resultados favoráveis quanto os nocivos. Um dos motivos dessas divergências pode estar relacionado a não padronização aplicada as metodologias de pesquisa devido a variabilidade da composição do plasma dos garanhões (GUASTI; MONTEIRO; PAPA, 2012).

Vidament et al. (2001) realizando testes de congelamento de sêmen equino não notaram diferenças entre as amostras congeladas com a fração total do ejaculado ou com a remoção do plasma. Entretanto, autores como Aurich et al. (1998) e Rigby et al. (2001) demonstraram que a remoção do plasma, a depender do garanhão, da qualidade do plasma e do diluidor utilizado, pode ou não ser benéfica ao espermatozoide.

Resultados tão variáveis podem ainda ser devido a efeitos individuais, genéticos ou ambientais envolvidos. Assim é necessário ampliar o conhecimento a respeito do plasma seminal, sobre sua real interação e adesão à célula espermática, além das informações já existentes sobre as substâncias envolvidas no processo, tais como: proteínas, enzimas, hormônios e íons.

2.4 Diluentes

Os primeiros estudos envolvendo diluentes foram realizados na década de 40, quando Phillips e Lardy (1940) testaram um meio a base de gema ovo para a criopreservação do sêmen bovino. Já na década de 50 surgiram os primeiros estudos com diluentes a base leite (THACKER; ALMQUIST, 1953), entretanto até hoje as substâncias empregadas para refrigeração do sêmen equino quase sempre são compostas por gema de ovo ou leite (HEITLAND et al., 1996).

As principais funções dos meios diluentes é promover a redução da concentração de plasma seminal, dar aporte nutricional, ter ação antimicrobiana, além de estabilizar o pH e a osmolaridade. Contudo, a alteração destes indicadores pode levar a mudanças nas características de motilidade celular (PUGLIESI, 2009; GRIGGERS et al., 2001). Tais diluentes devem ter capacidade de manter características desejáveis aos espermatozoides, apresentando pressão osmótica entre 300 e 350 mOsm e pH entre 7,0 e 7,2 (DARENIUS, 1998).

A ação protetora da gema de ovo é relacionada à presença de lipoproteínas que atuam na estabilização das membranas, por meio da ligação à algumas lipoproteínas presentes nos espermatozoides e neutralização de agentes com potencial danoso existentes no plasma seminal (AURICH, 2005;

AMANN; GRAHAM, 2011). Tais lipoproteínas ocupam locais específicos das membranas conferindo resistência e protegendo-as durante a criopreservação. Além disso, a presença de fosfolipídios também protegem os espermatozoides durante a queda da temperatura até 5° C (MOUSSA et al., 2002; FÜRST, 2006).

Aparentemente, o mecanismo de proteção do leite é similar ao da gema de ovo, envolvendo proteínas na estabilização da membrana (AMANN; GRAHAM, 2011). O arranjo proteico do leite ainda atua como tampão e quelante para metais pesados, o que diminui os efeitos negativos da refrigeração (SALAMON; MAXWELL, 2000). Contudo a presença do leite nos diluentes pode interferir negativamente na eficiência de algumas tecnologias aplicadas ao sêmen, como a sexagem espermática (FLOREZ-RODRIGUEZ et al., 2014). Esta baixa eficiência no processo de sexagem está diretamente ligada a opacidade do meio, que interfere na marcação das células com o corante Hoechst 33342, devendo-se buscar diluentes com menor opacidade (GIBB et al., 2011; FLOREZ-RODRIGUEZ et al., 2014).

A variabilidade na composição do leite é outro fator que desabona seu uso, ou indica a necessidade de padronização. Na busca por diluentes que não apresentam esta variabilidade Batellier et al. (1997) pesquisaram a adição de frações do leite em diluentes do sêmen equino, em vista de evidências que indicam que os lipídeos do leite não seriam os responsáveis pela proteção das células espermáticas, e sim a caseína (BERGERON; MANJUNATH, 2006).

Dentre as possíveis substâncias a serem estudadas o fosfocaseinato, foi descrita como sendo a mais eficaz na manutenção da viabilidade espermática e com a capacidade de proteger a membrana plasmática devido a sua forte ligação com os íons de Ca^{++} (HOCHACHKA, 1986; PAGL et al., 2006). O qual não induz a capacitação espermática precoce (BATELLIER, 1997).

Batellier (1997) descreveu o processo para obtenção das frações do leite, a partir do leite cru, utilizando uma série de processos de fervuras a 90° C por 30 minutos, microfiltrações e ultra-filtrações. Sendo o resultado de todos esses procedimentos o fosfocaseinato nativo, subdividido em quatro frações (caseína α ; caseína β ; caseína κ ; fração rica em fosfolipídeos), e as proteínas solúveis (α lactoalbumina; β lactoglobulina) (Figura 1).

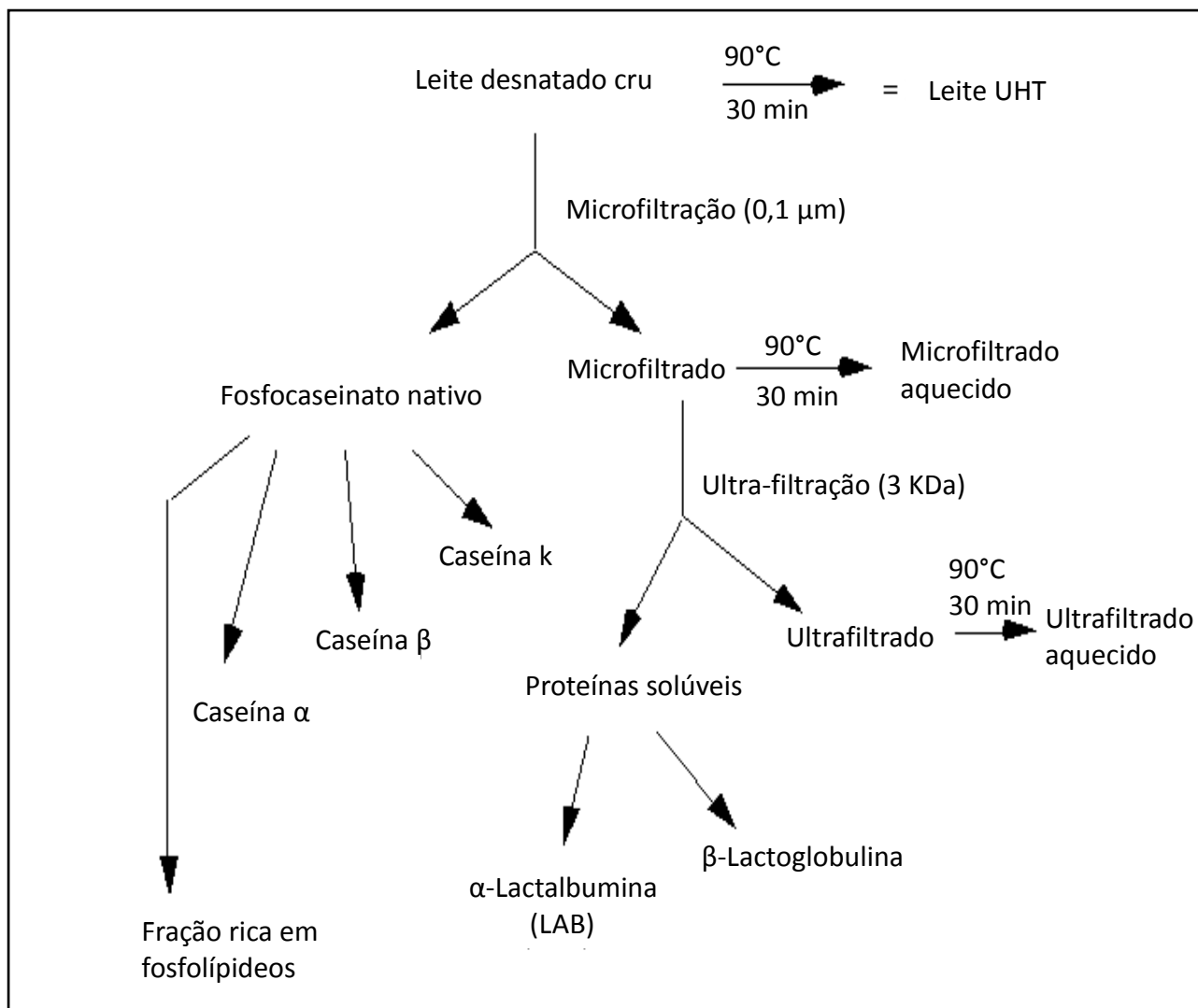


FIGURA 1 - Processo para obtenção das frações do leite a partir do leite cru
 Fonte: Adaptado de Batellier (1997).

Alterando o processo imposto ao leite cru, Batellier (1997) também demonstrou como sintetizar o caseinato de sódio (Figura 2). Para obtenção do caseinato de sódio, além da lavagem da coalhada também é possível fazer o uso direto da caseína ácida (BARRAQUIO; VAN DE VOORT, 1991).

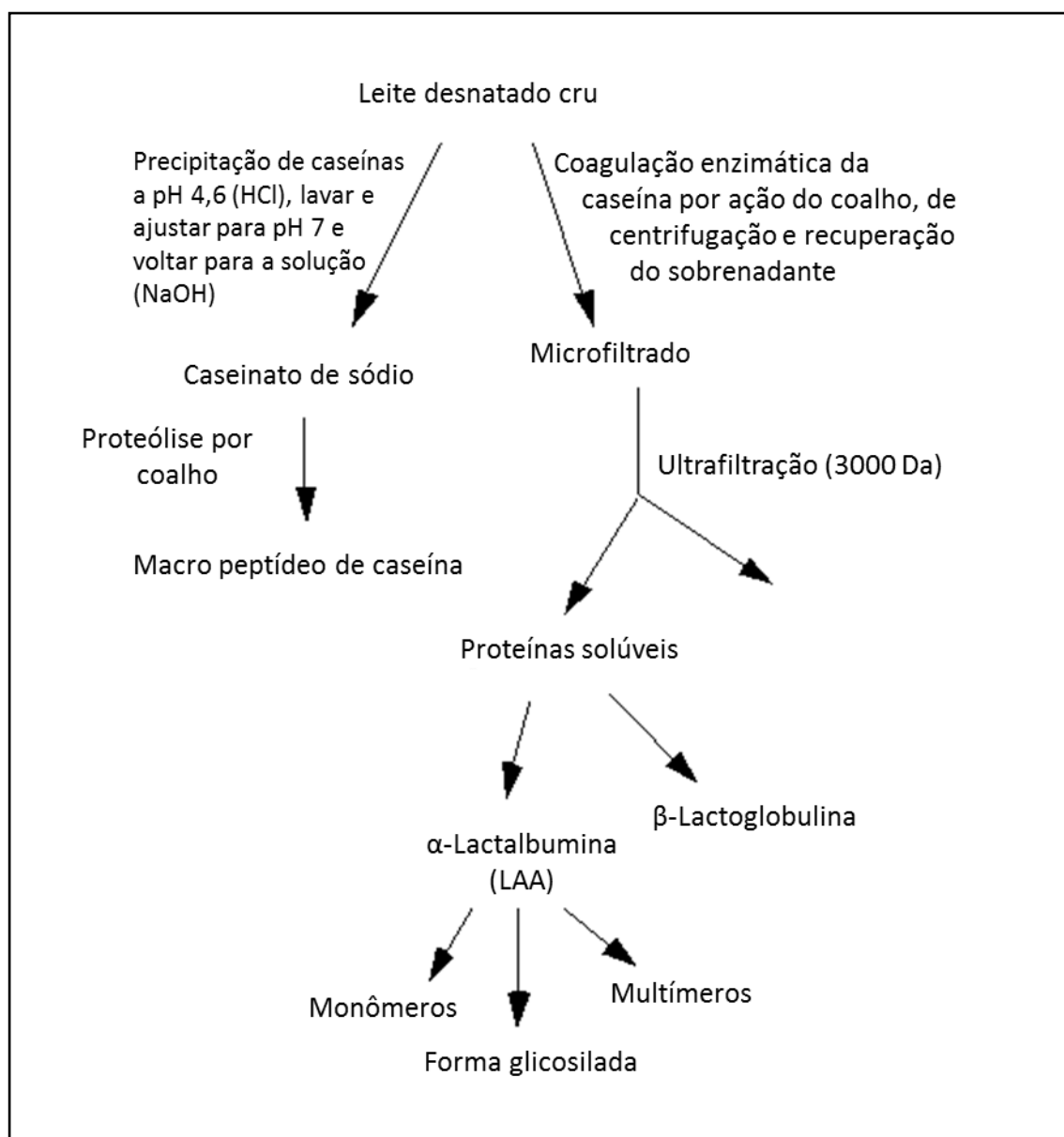


FIGURA 2 - Processo para síntese de caseinato de sódio

Fonte: Adaptado de Batellier (1997).

Batellier (1997) adicionou as frações líquidas, frações de proteínas solúveis, frações α lactalbumina, frações β lactoglobulina, fosfocaseinato nativo e caseína β a um meio base, contendo solução de sais de Hank's, glicose e lactose para testar a eficiência sobre a proteção das células espermáticas e seus efeitos danosos. A melhor capacidade protetora foi relacionada ao fosfocaseinato nativo, numa concentração de 27g/L. O caseinato de sódio e

uma caseína comercial, também foram testadas, sendo que onde apenas o caseinato de sódio se mostrou semelhante ao fosfocaseinato nativo para refrigeração do sêmen até as 96 horas (BATELLIER, 1997).

2.5 Estrutura, função e mecanismo de ação da caseína

O leite apresenta entre 3,3 a 3,5% de proteínas totais, das quais cerca de 20% são provenientes do soro e são representadas pelas β -lactoglobulinas, α -lactalbuminas, albumina sérica, imunoglobulinas e lactoferrina. As caseínas representam os demais 80% de proteínas presentes no leite bovino, sendo as α_{s1} -, α_{s2} -, β - e a k-caseína as quatro principais proteínas. A caseína tem como função primária transportar cálcio, fosfato e proteína ao lactante (DE KRUIF & HOLT, 2003), contudo também é responsável por evitar a calcificação do tecido mamário (SMYTH et al., 2004).

Segundo Fox e Brodtkorb (2008) quase a totalidade da caseína do leite está agrupada na forma de micelas (Figura 3), sendo esta a estrutura responsável por fornecer a estabilidade térmica do leite. As proteínas α_{s1} -, α_{s2} - e β -caseína geralmente estão dispostas no centro destas micelas, juntamente com fosfato de cálcio coloidal, enquanto a k-caseína está na superfície externa (DALGLEISH, 2011).

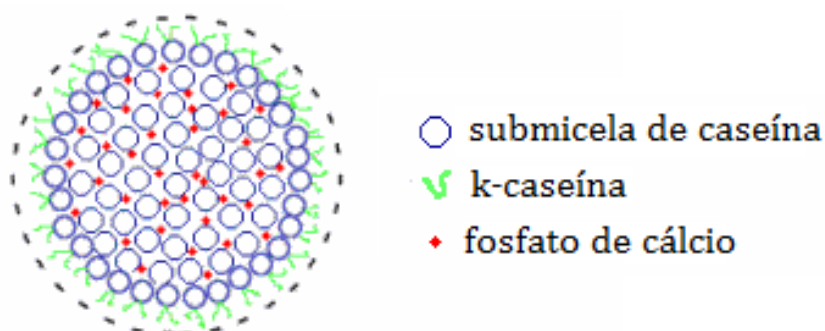


FIGURA 3 – Micela de caseína.

Fonte: Adaptado de <http://mauxikqc.blogspot.com.br/2015/09/proteinas-de-la-leche.html>.

Contudo para proteção da célula espermática a manutenção da estrutura de micelas não é determinante, Batellier et al. (1997) demonstraram que mesmo após tratamento para destruição desta estrutura houve manutenção da viabilidade espermática.

Apesar de não ter sido esclarecido o mecanismo de proteção às células espermáticas pela caseína, já foi demonstrado por diversos autores que provavelmente esta ação ocorra pela interação da própria caseína com as proteínas de ligação do plasma seminal bovino (BSPs), numa ligação proteína – proteína (Figura 4), diferentemente do que acontece com diluentes a base de gema de ovo, por quais a ligação das BSPs se dá com as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (PLANTE et al., 2015). Já foi demonstrado que em diversas espécies de mamíferos, entre elas a equina, podem existir iso-formas das BSPs encontradas nos bovinos (BERGERON; MANJUNATH, 2006) (Quadro 1).

Numa situação de estocagem do sêmen as BSPs se tornam prejudiciais à medida que na relação tempo/concentração estimulam o efluxo de colesterol e fosfolípidios da membrana espermática (MANJUNATH, 2012). Contudo, tais proteínas representam mais de 70% daquelas expressas no plasma seminal equino e também estão envolvidas em processos fundamentais a fertilidade do sêmen, como a capacitação espermática e formação do reservatório espermático (EKHALASI-HUNDRIESER et al., 2005; MANJUNATH, 2012).

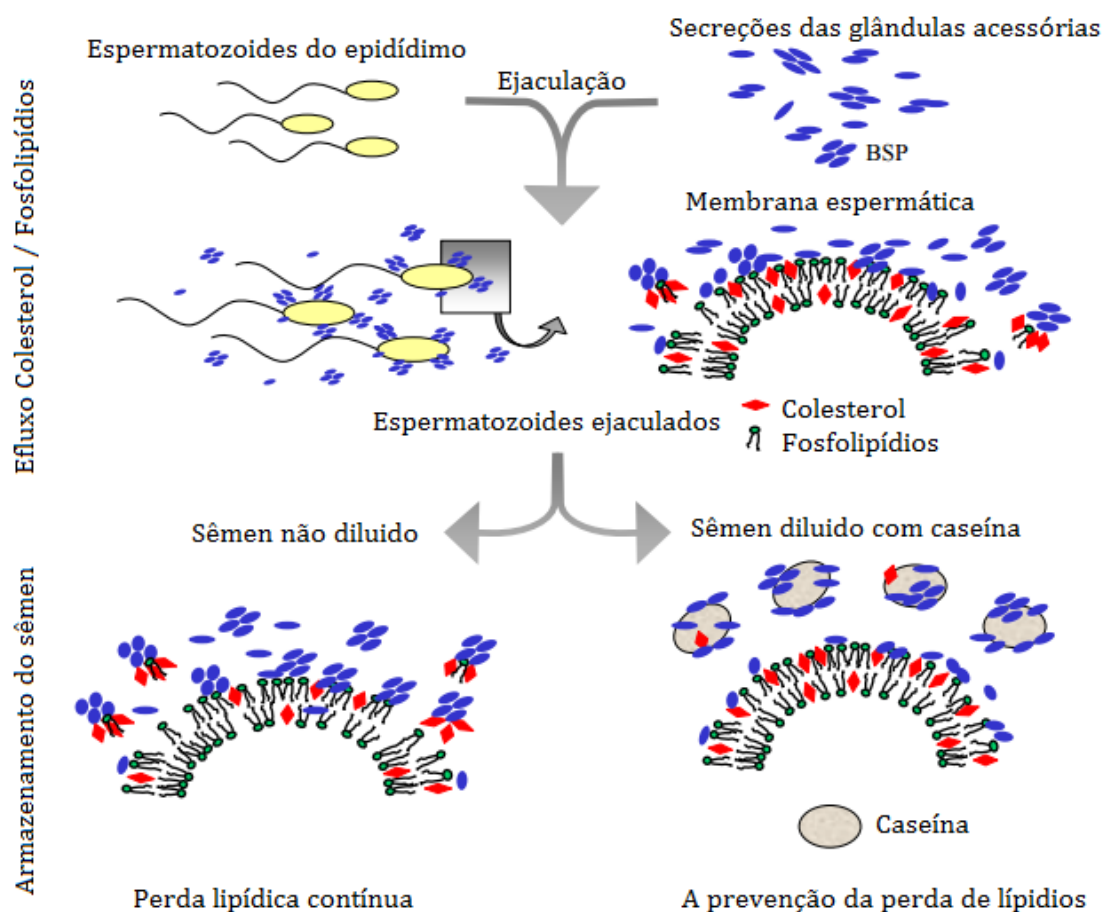


Figura 4. Ação protetora da caseína.

Fonte: Adaptado de MANJUNATH, 2012.

QUADRO 1 - Proteínas homólogas a BSP isoladas a partir do plasma seminal de várias espécies

Espécies	Proteínas homólogas	Referências
Touro	BSP-A1, BSP-A2, BSP-A3, BSP-30 kDa	Manjunath and Thérien (2002)
Javali	pB1	Calvete et al. (1997)
Garanhão	HSP-1, HSP-2, HSP-12 kDa	Calvete et al. (1995,1997); Ménard et al. (2003)
Bode	GSP-14, GSP-15, GSP-20, GSP-22 kDa	Villemure et al. (2003)
Carneiro	RSP-15, RSP-16, RSP-22, RSP-24 kDa	Bergeron et al. (2005)
Bisã ^a	BiSV-16, BiSV-17, BiSV-18, BiSV-28 kDa	Boisvert et al. (2004)

^aIsolado a partir de secreções das vesículas seminais

Fonte: Adaptado de BERGERON; MANJUNATH, 2006.

O uso do caseinato de sódio na diluição de espermatozoide equino apresenta também efeito sobre a capacidade de ligação das células espermáticas com a zona pelúcida (ZP), onde diluentes contendo proteínas do leite apresentam maior ligação dos espermatozoides a ZP, o que é essencial para o processo de fertilização (COUTINHO DA SILVA, et al., 2012).

A adição de caseína ao sêmen de suínos também tem se mostrado eficiente, reduzindo danos gerados pela criopreservação, retendo colesterol, reduzindo a atividade das caspases e mantendo a integridade do DNA. A suplementação com caseína também elevou as taxas in vitro de penetração de espermatozoides nos oócitos (TATEMOTO et al., 2015).

2.6 Sêmen refrigerado: Leite *versus* Caseína

A partir dos estudos de Kenney et al. (1975), a refrigeração do sêmen de equinos com diluentes a base de leite desnatado, onde descreveram o diluente a base de leite desnatado, este vem sendo empregado com maior frequência na rotina de médicos veterinários que trabalham na reprodução de equinos.

A refrigeração e a inseminação artificial com sêmen refrigerado são duas técnicas frequentemente empregadas na espécie equina, que além de prolongar a viabilidade dos espermatozoides, apresentam elevados índices de gestação quando comparados a monta natural e o uso de sêmen fresco (ALMEIDA, 2006).

Fleury et al. (2001), estudando animais da raça Mangalarga e utilizando diluente a base de leite desnatado, no período de uma estação reprodutiva, não notaram diferença estatística para as taxas de gestação e recuperação embrionária, comparando monta natural (87,5% e 50%), sêmen fresco (73,7% e 60,6%) e refrigerado (80,3% e 63,8).

Farrás et al. (2008), utilizando três diluentes comerciais, sendo dois a base de leite desnatado (Botu-Sêmen® e Botu-Turbo®) e um de frações específicas do leite (INRA 96®), não notaram diferenças estatísticas nos tempos avaliados (sêmen fresco; 6 horas; 12 horas; 24 horas) ou parâmetros estudados (motilidade total; motilidade progressiva; integridade de membrana) a 5° C ou 15° C.

Em 2006 Pagl et al., compararam ejaculados de garanhões em dois experimentos, comparando um diluente com frações definidas, um a base de leite desnatado e PBS, e encontraram diferenças significativas para motilidade total as 48 e 72 horas, motilidade progressiva no sêmen fresco, as 24 e 48 horas, os parâmetros de velocidade, a partir das 48 horas, também foram superiores e significativamente diferentes para os espermatozoides diluídos com as frações definidas do leite.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA J. L. **Efeito de diferentes concentrações de plasma seminal na criopreservação do sêmen equino**. 2006. 90 f. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília. 2006.

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

ALBERTS B, BRAY D, JOHNSON A, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WALTER P. Estrutura da membrana. In: Alberts et al. Fundamentos da biologia celular: uma introdução à biologia molecular da célula. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 1999.

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

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

AURICH, J.E.; KÜHNE, A.; HOPPE, H.; AURICH, C. Effect of seminal plasma on stallion semen quality after cryopreservation. **Journal of Reproduction and Fertility**, p. 15- 34, 1998.

BALL, B.A.; MEDINA, V.; GRAVANCE, C.G.; BAUMBER, J. Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5°C. **Theriogenology**, v. 56, n.4, p. 577-589, 2001.

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.

BARRETO, M. A. P. **Efeitos das proteínas do plasma seminal equino com massa superior a 10 kda sobre a congelabilidade do sêmen, reação inflamatória uterina e fertilidade**. 2007. 78 f. Tese de Doutorado - Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, 2007.

BATELLIER F. Identification, purification et mécanisme d'éléments contenus dans le lait, agissant sur les spermatozoïdes équins. Tese de Doutorado. Sciences et Techniques, Université François Rabelais de Tours, Tours. 1997. Disponível em:

<<http://wcentre.tours.inra.fr/prc/internet/resultats/theses/batellier/table.htm>>.
Acesso em: 20 mar. 2015.

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.; 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.

BRINSKO, S. P.; VARNER, D. D. Artificial insemination and preservation of semen. **Veterinary Clinics of North America**, v.8, p. 205-218, 1992.

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.

CARVALHO, O. F.; FERREIRA, J. D. J.; SILVEIRA, N. A.; FRENEAU, G. E. Efeito oxidativo do óxido nítrico e infertilidade no macho. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v.38, p.33-38, 2002.

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

DARENIUS A. Experiences with chilled, transported equine sêmen. In: Stallion Reproduction Symposium. **Society for Theriogenology – American Association of Equine Practitioners**. p. 60-70, 1998.

DE KRUIF, C. G. HOLT, C. Casein Micelle Structure, Functions and Interactions Advanced Dairy Chemistry, Volume 1, Proteins, Third Edition A, Chapter 5 Ed. P. F. Fox and P. L. H. McSweeney Kluwer Academic, New York, 2003.

EKHALASI-HUNDRIESER M, SCHAFER B, KIRCHHOF C, HESS O, BELLAIR S, MÜLLER P, et al. Structural and molecular characterization of equine sperm-binding fibronectin-II module proteins. **Molecular Reproduction and Development**, v. 70, p. 45-57, 2005.

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.

FERNANDES, C. E.; PIMENTEL, C. A. Anormalidades de acrossomo e fertilidade em um garanhão: relato de um caso. **Ciência Rural**, v.27, n.2, p.345-349, 1997.

FLEURY, J. J.; PINTO, A. J.; CELEGHINI, E. C. C.; LIMA, C. G.; ARRUDA, R. P. Influência do garanhão e da técnica de inseminação sobre os índices de recuperação embrionária e de gestação em um programa de transferência de embriões em equinos da raça Mangalarga. [Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science](#), v.38, p. 34-37, 2001.

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.

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

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

GIBB, Z.; MORRIS, L. H. A.; MAXWELL, W. M. C.; GRUPEN, C. G. Use of a defined diluent increases the sex-sorting efficiency of stallion sperm. **Theriogenology**, v. 75, p. 610–619, 2011.

GRIGGERS, S.; PACCAMONTI, D. L.; THOMPSON, R. A.; EILTS, B. E. The effects of pH, osmolarity and urine contamination on equine spermatozoa motility. **Theriogenology**, v. 56, p. 613-622, 2001.

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.

GUYTON, A.C., HALL, J.E Tratado De Fisiologia Médica 9. Ed. Rj. Guanabara Koogan, 1997.

HARTWIG, F. P.; PAPA, F. O.; DELL'AQUA 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-DELL'AQUA, C. P.; ALVARENGA, M. A.; PAPA, F. O.; DELL'AQUA JR., J. A. Use of cholesterol-loaded cyclodextrin: An alternative for bad cooler stallions. **Theriogenology**, v.81, p.340-346, 2014.

HEITLAND, A. V.; JASKO, D. J.; SQUIRES, E. L.; GRAHAM, J. K.; PICKETT, B. W.; HAMILTON, C. Factors affecting motion characteristics of frozen-thawed stallion spermatozoa. **Equine Veterinary Journal**, v. 28, p. 47-53, 1996.

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

JUHÁSZ, J.; NAGY, P.; KULCSÁR, M.; HUSZENICZA, G. Y. Methods for semen and endocrinological evaluation of the stallion: a review. **Acta Veterinaria Brasileira**, v. 69, p. 247-259, 2000.

KARESKOSKI, M.; KATILA, T. Components of stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity. **Animal Reproduction Science**, v. 107, p. 249-256, 2008.

KENNEY, R. M.; BERMAN, R. V.; COOPER, W. L.; MORSE, G. W. **Minimal contamination techniques for breeding mares: techniques and preliminary findings**. In: ANNUAL CONVENTION, AMERICAN ASSOCIATION EQUINE PRACTITIONERS, 1975. 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.

LAGARES, M. A.; MEIRELLES, L. S.; WALD, V. B.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. Efeito de diferentes diluidores sobre a membrana plasmática do espermatozóide eqüino e fertilidade do sêmen resfriado. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, v. 7, n. 3, p. 153-156, 2000.

LIMA, R. A. S.; SHIROTA, R.; BARROS, G. S. C. **Estudo do complexo do agronegócio cavalo**. Piracicaba: ESALQ/USP, 2006. 250p.

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.

MIES FILHO A. **Reprodução dos animais e inseminação artificial**. 5.ed. Porto Alegre: Sulina, 1987. 783p.

MONTEIRO G. A. **Criopreservação e fertilidade de espermatozóides recuperados da cauda do epidídimo**. 2010. 81 f. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 2010.

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.

PALMER E. **Factors affecting stallion semen survival and fertility**. In: PROC. 10TH INT CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 1984, Urbana-Champaign, IL USA, 1984.

PESCH, S.; BERGMANN, M. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability and cryopreservation. **Micron**, v.37, p.597-612, 2006.

PHILLIPS, P. H.; LARDY, H. A. A yolk-buffer pabulum for the preservation of bull semen. **Journal of Dairy Science**. v. 23, p. 399–404, 1940.

PIERRE, A.; FAUQUANT, J.; LE GRAET, Y.; PIOT, M.; MAUBOIS, J. L. Preparation de phosphocaseinate natif par microfiltration sur membrane. **Lait**, v. 72, p. 461-474, 1992.

PLANTE, G.; LUSIGNAN, M. F.; 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.

POTTS, R. J.; NOTARIANNI, L. J.; JEFFERIES, T. M. Seminal plasma reduces exogeneous oxidative damage to human sperm, determined by the measurement of DNA strand breaks and lipid peroxidation. **Mutation Research**, v.447, p. 249-256, 2000.

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.

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.

SAMPER, J. C. Equine breeding management and artificial insemination. **W.B.Saunders company** capítulos 2, 8 e 9. (2000)

SETCHELL, B. P. Spermatogenesis and spermatozoa. In: Austin CR, Short RV. Reproduction in mammals: Germ cells and fertilization. 2.ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1993. v.1, p.63-101.

SINGH, B. K. **Compêndio de andrologia e inseminação artificial em animais de fazenda**. São Paulo: Andrei Editora, 2006. 331p.

SMYTH, E.; CLEGG, R. A.; HOLT, C. A biological perspective on the structure and function of caseins and casein micelles. **International Journal of Dairy Technology**, v. 57, p. 121-126, 2004.

SQUIRES, E. L.; AMANN, R.P.; MCKINNON, A.O; PICKETT, B. W. **Fertility of equine spermatozoa cooled to 5 or 20°C**. In: PROC 11 TH INTERNACIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSIMINATION, Dublin, Ireland, 1988.

THACKER, D. L.; ALMQUIST, J. O. Diluters for bovine semen. I. Fertility and motility of bovine spermatozoa in boiled milk. **Journal of Dairy Science**, v. 36, p. 173-180, 1953.

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.; BLANCHARD, T. L.; MEYERS, P. J.; MEYERS, S. A. Fertilizing capacity of equine spermatozoa stored for 24 hours at 5 or 20° C. **Theriogenology**, v. 32, p. 515-525, 1989.

VIDAMENT, M.; YVON, J. M.; COUTY, I.; ARNAUD, G.; NGUEKAM-FEUGANG, J.; NOUE, P.; COTTRO, S.; LE TELLIER, A.; NOEL, F.; PALMER, E.; MAGISTRINI, M. Advances in cryopreservation of stallion semen in modified INRA 82. **Animal Reproduction Science**, v.68, p.201-218, 2001.

CAPÍTULO II

Substituição do leite desnatado pelo caseinato de sódio para refrigeração de sêmen equino

V. F.C. Garcia ^a, G. A. Campos ^a, J. A. M. Carneiro ^a, C.P. Freitas-Dell'Aqua ^a,
M.A. Alvarenga ^a, F. O. Papa ^a, J. A. Dell'Aqua Jr ^{a*}

^aDepartamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho" - UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil

* Autor de correspondência: dellaquajunior@uol.com.br

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

Resumo

O uso de diluentes para refrigeração do sêmen equino é comum em todo mundo, contudo a busca por diluentes mais eficientes tem feito as pesquisas na área avançarem. Nesse sentido, o objetivo desse estudo foi avaliar o caseinato de sódio como substitutivo para o leite desnatado no diluente para transporte refrigerado equino. Foram utilizados 21 ejaculados de diferentes garanhões em idade reprodutiva. Após a coleta dos ejaculados o sêmen foi dividido em duas alíquotas, LD (Botu-Sêmen®, Botupharma, Botucatu, SP, Brasil com leite desnatado) e CS (Botu-Sêmen®, Botupharma, Botucatu, SP, Brasil com caseinato de sódio), na concentração de 50×10^6 espermatozoides/mL e colocadas em caixa de refrigeração passiva a 5°C/24 horas. As amostras foram avaliadas quanto a cinética espermática (HAMILTON THORNE RESEARCH – IVOS 12), integridade das membranas plasmática e acrossomal, peroxidação lipídica, concentração de H₂O₂ intracelular por de citometria de fluxo. As amostras foram testadas quanto a fertilidade utilizando dois ciclos de 25 éguas, em sistema "crossover". A inseminação com sêmen refrigerado ocorreu 24 horas após indução da ovulação e a gestação foi identificada por ultrassonografia 14 dias após a ovulação. Todos os resultados

34 obtidos, tanto para as análises de cinética espermática, bem como as
35 avaliações realizadas pela citometria de fluxo não identificaram diferenças
36 estatísticas entre os grupos. A gestação foi observada em 84% (CS) versus
37 56% (LD) das éguas inseminadas, sendo $P=0,0622$. Pode-se concluir que o
38 caseinato de sódio é uma substância sintética capaz de substituir o leite
39 desnatado no diluente de refrigeração do sêmen equino apresentando
40 características similares tanto nas avaliações laboratoriais, e com elevada
41 fertilidade.

42 *Palavras-chave:* Caseína, Espermatozoide, Garanhão, Diluente.

43

44 **1.Introdução**

45 O avanço biotecnológico e a visão empresarial do agronegócio equino,
46 que em sua essência deve gerar lucros e reduzir custos, tem proposto a
47 pesquisadores verdadeiras revoluções em suas pesquisas. Com o uso
48 frequente do sêmen refrigerado nas inseminações em éguas, tem se
49 conseguido impor uma barreira sanitária e também gerar economia e renda aos
50 haras e diminuir o risco aos animais [1]. Contudo ainda há uma evidente falta
51 de padronização no emprego desta técnica.

52 O sucesso no uso de sêmen refrigerado abrange diversos fatores, entre
53 eles o número de espermatozoides inseminados, o número de inseminações e
54 a composição do diluente utilizado [2]. Os componentes do meio diluente
55 devem conferir ao sêmen o prolongamento da sua viabilidade sem afetar sua
56 capacidade fertilizante [3]. Dentre os diluentes de refrigeração de sêmen
57 equino estudados e aplicados rotineiramente estão aqueles a base de leite
58 desnatado, derivados do descrito por Kenney et al. [4,5].

59 O leite, apesar de fornecer condições apropriadas à manutenção da
60 viabilidade das células espermáticas, apresenta cerca de 100 mil diferentes
61 moléculas, o que também impede uma padronização dos diluentes e indica a
62 necessidade de buscar diluentes mais eficazes, tal como as caseínas [2].

63 Caseínas são as proteínas presentes no leite que conferem resistência
64 aos espermatozóides devido a interação que ocorre com o plasma seminal e a
65 membrana plasmática das células [6,7]. A caseína interage com as proteínas
66 de ligação do plasma seminal (HSPs), que poderiam levar a um efluxo de

67 colesterol, e consequentemente a uma capacitação precoce dos
68 espermatozoides [8,9].

69 Neste sentido, o objetivo deste estudo foi verificar se a substituição do
70 leite desnatado pelo caseinato de sódio no diluente, para refrigeração do
71 sêmen equino proporciona características espermáticas adequadas para
72 manutenção da viabilidade espermática e fertilidade.

73

74 **2. Material e métodos**

75 *2.1 Animais*

76 Foram utilizados 21 garanhões, das raças Quarto de Milha e Mangalarga
77 Marchador com idade variando entre 5 e 15 anos, alojados em propriedades
78 rurais do estado de São Paulo. Os animais encontravam-se clinicamente
79 sadios e previamente ao estudo foram submetidos ao exame andrológico.
80 Todos os procedimentos com os animais foram aprovados pela Comissão de
81 Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia –
82 Unesp – Botucatu, protocolo número 120/2015.

83

84 *2.2 Colheita do ejaculado e diluição do sêmen*

85 Os ejaculados foram colhidos com uso de uma vagina artificial modelo
86 Botucatu (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil). Após a obtenção do ejaculado, o
87 sêmen foi avaliado e fracionado em duas alíquotas. Posteriormente foi diluído
88 na concentração de 50×10^6 de espermatozoides/mL nos diluentes, comercial
89 Botu-Semen® (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil), com leite desnatado (LD) ou
90 caseinato de sódio (CS). Este último foi obtido através da substituição de 20 g
91 do leite desnatado do Botu-Semen®, por 20 g de caseinato de sódio (Sigma
92 Audrich – C8654).

93

94 *2.3 Delineamento experimental*

95 O experimento foi dividido em duas etapas. A primeira consistiu na
96 avaliação laboratorial da viabilidade *in vitro*, nos momentos após a diluição (T0)
97 e 24 horas após a refrigeração a 5°C (T24) que foi realizada de forma passiva
98 em caixa de isopor comercial (Botu-Flex®, Botupharma, Botucatu, SP, Brasil).

99 A segunda etapa caracterizou-se pelo teste de fertilidade *in vivo*, onde
 100 se utilizou um garanhão, *Bad Cooler*, que são aqueles que apresentam
 101 diminuição na fertilidade após refrigeração e transporte, além de queda na
 102 motilidade total igual ou superior a 30%, segundo classificação de Hartiwig et
 103 al. [10] e Brinsko et al. [11].

104

105 *2.4 Análises espermáticas*

106 As amostras seminais de ambos os grupos foram avaliadas 15 minutos
 107 após a incubação em banho Maria a 37°C por 15 minutos, nos momentos T0 e
 108 T24.

109

110 *2.4.1 Avaliação da cinética espermática*

111 As amostras foram avaliadas quanto a cinética espermática utilizando o
 112 aparelho de análise computadorizada (Hamilton Thorne Research – IVOS 12,
 113 Beverly, MA, USA), para mensuração da motilidade espermática total (MT),
 114 motilidade espermática progressiva (MP), velocidade de trajeto (VAP),
 115 velocidade linear (VSL), velocidade curvilínea (VCL), movimento lateral de
 116 cabeça (ALH), frequência de batimento de cauda (BCF), retilinearidade (STR),
 117 linearidade (LIN) e porcentagem de espermatozoides com movimento rápido
 118 (RAP). Para cada amostra seminal foram avaliados 5 campos aleatórios em
 119 câmara de Mackler, avaliando-se um número mínimo de 200 células por campo
 120 e utilizando-se o *setup* descrito na Tabela 1.

121

122 **TABELA 1** – Ajuste do equipamento de análise computadorizada dos
 123 espermatozoides equinos.

124

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
Motilidade progressiva	

Retilinearidade	>80%
Velocidade média de percurso	>70µm/s
Static	
Velocidade média de percurso Cutoff	<30m/s
Velocidade em linha reta Cutoff	<20m/s
Espermatozoides Rápidos	
Velocidade média de percurso	>80µm/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

125

126

127 *2.4.2 Citômetro de fluxo*

128 Para as análises de citometria de fluxo, foi utilizado o equipamento BD
 129 LSR Fortessa (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) equipado com
 130 lasers: violeta 405-nm, 100 mW; azul 488-nm, 100 mW e vermelho 640-nm, 40
 131 mW. As mensurações de fluorescência foram realizadas nos filtros 450/ 50 nm
 132 (H342), 530/30 nm (FITC); 660/20 nm (APC); e 694/50 nm (PI).

133 Auto-fluorescência e controles de cada fluorocromo foram adquiridos
 134 para ajuste de sobreposição de onda e compensação utilizando-se a matriz de
 135 compensação do próprio software. Os dados foram gerados utilizando-se
 136 gráficos dotplot incluindo eixo<0t (bi-exponencial) tornando todas os eventos
 137 visíveis e propriamente compensados.

138 No mínimo 10.000 células foram avaliadas por amostra e os dados
 139 foram avaliados por programa do mesmo fabricante BD FACSDiva™ software
 140 v6.1.

141 Para as análises de integridade de membrana plasmática e acrossomal,
 142 peroxidação lipídica e concentração de H₂O₂ intracelular, as amostras de

sêmen foram diluídas em TALP-PVA (100mM NaCl, 3,1mM KCl, 25,0mM NaHCO₃, 0,3mM NaH₂PO₄, 21,6mM DL-lactato de sódio 60%, 2,0mM CaCl₂, 0,4mM MgCl₂, 10,0mM Hepes-livre de ácido, 1,0mM piruvato de sódio, 1,0mg/mL álcool polivinil-PVA e 25µg/mL gentamicina) na concentração de 5 x10⁶espermatozoides/mL acrescido de Hoechst 3342 (7µM; 14533, Sigma) para eliminação dos debris celulares e então incubadas de acordo com cada protocolo.

Para a integridade de membrana plasmática e acrossomal foram utilizadas a associação de iodeto de propídio (1,5µM; PI) e FITC-PSA (2ng; aglutinina de *Pisum sativum* conjugada ao isotiocianato de fluoresceína) de acordo Freitas-Dell'Aqua [12]. Para a peroxidação lipídica utilizou-se C11-BODYPY (1µM; D-3861; Molecular Probes) de acordo com Guasti et al. [13].

Para a avaliação da produção de H₂O₂ intracelular utilizou-se a sonda 5-(-6)-carboxi-2,7-diclorodihidrofluoresceindiacetato (20µM; carboxi-H₂DCFDA; Molecular Probes) de acordo com Guthrie e Welch [14] associada ao PI (1,5µM).

2.5 Teste de Fertilidade

Para o teste de fertilidade foram utilizados 50 ciclos de 25 éguas em sistema "crossover". A inseminação artificial foi efetuada com a dose de 500 x 10⁶ espermatozoides, após 24 horas de refrigeração a 5°C.

As éguas foram monitoradas diariamente por ultrassonografia transretal, e ao se detectar um folículo de diâmetro médio de 35 mm e presença de edema uterino foi efetuada a indução da ovulação com 1 mg de acetado de deslorelina.

Vinte e quatro horas após a indução da ovulação a inseminação artificial foi realizada. Quatorze dias após a ovulação foi efetuado o diagnóstico de gestação através de exame ultrassonográfico.

2.5 Análise Estatística

As análises foram realizadas pelo Programa GraphPad Prism versão 6.0 para Windows (GraphPad software, LA Jolla, Califórnia, USA; www.graphpad.com). Para todas as análises foram calculadas as medias e erro padrão e então realizado o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. Quando

os dados apresentavam distribuição normal foi utilizado teste t e, quando não apresentavam distribuição normal (dados não paramétricos) utilizou-se Mann-Whitney. Para a fertilidade foi utilizado o teste exato de Fisher, todas as estatísticas foram consideradas significativas quando $P < 0,05$ e tendência quando $P > 0,05$ e $< 0,1$.

181

182 3. Resultados

Todas as características da cinética espermática, assim como as avaliações morfofuncionais efetuadas pela citometria de fluxo, não apresentaram diferenças estatísticas em ambos os momentos e grupos avaliados, conforme dados demonstrados nas tabelas 2 e 3 ($P > 0,05$).

187

TABELA 2: Valores médios e erro padrão da cinética espermática nos grupos leite desnatado (LD) e caseinato de sódio (CS) nos diferentes momentos T0 e T24.

190

Variáveis	T0		T24	
	LD	CS	LD	CS
MT (%)	75,8±4,0	76,0±3,1	66,0±6,3	66,5±4,8
MP (%)	34,9±2,7	33,4±2,8	30,3±4,2	27,8±3,7
VSL (µm/s)	90,8±4,0	90,7±3,6	83,8±6,3	87,8±4,0
VAP (µm/s)	119,8±5,6	120,1±4,7	111,2±8,4	117,0±5,1
VCL (µm/s)	211,0±9,6	215,7±7,7	202,9±14,1	214,3±8,5
ALH (µm)	7,4±0,2	7,5±0,2	7,2±0,4	7,3±0,2
BCF (Hz)	32,4±0,9	32,5±1,1	31,7±1,7	33,0±1,0
STR (%)	75,4±1,1	75,7±1,1	71,7±3,8	74,8±1,4
LIN (%)	43,5±0,9	43,7±1,2	40,5±2,4	42,6±1,3
RAP (%)	65,4±4,9	65,5±4,1	57,0±6,8	56,7±5,3

MT = Motilidade Total, MP = Motilidade Progressiva, VAP = velocidade de trajeto, VSL = velocidade linear, VCL = velocidade curvilínea, ALH = movimento lateral de cabeça, BCF = frequência de batimento de cauda, STR = retilinearidade, LIN = linearidade 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 ($P > 0,05$).

196

TABELA 3: Valores médios e erro padrão das características morfofuncionais avaliadas por citometria de fluxo nos grupos leite desnatado (LD) e caseinato de sódio (CS) nos diferentes momentos T0 e T24.

Variável	T0		T24	
	LD	CS	LD	CS
IMPA (%)	69,6±2,7	70,7±2,6	64,6±3,6	65,4±2,2
PERO (%)	34,7±7,9	33,8±7,9	29,4±7,5	29,7±7,5
EROS (%)	23,2±5,3	29,2±6,7	31,1±8,4	33,8±7,5

IMPA = Membrana plasmática e acrossomal íntegras, PERO = Peroxidação lipídica, EROS = Concentração de espécies reativas ao oxigênio. T0 = 15 minutos após a diluição, T24 = 15 minutos após refrigeração a 5°C por 24 horas (P>0,05).

Os parâmetros de cinética espermática das células avaliadas após 15 minutos de estabilização, neste estudo, não apresentaram diferença.

Em relação ao teste de fertilidade foi observada tendência em relação a taxa de gestação entre os grupos estudados (P=0,0622), leite desnatado (56%, 14/25) e caseinato de sódio (84%, 21/25).

4. Discussão

Os resultados para MT no momento T0 se assemelharam aos encontrados por Pagl et al. [15], Farrás et al. [16] e LeFrappier et al. [17] no mesmo momento, que também compararam os efeitos de diluentes comerciais a base de leite desnatado e caseína e não obtiveram diferenças estatísticas. Em relação a MP e os parâmetros de velocidade, Pagl et al. [15] encontraram valores mais elevados, com diferença significativa nos grupos com diluentes com proteínas do leite.

As avaliações da cinética espermática após 24 horas de refrigeração não apresentaram diferença estatística, divergindo do que foi relatado por LeFrappier et al. [17] no mesmo momento de análise. Os referidos autores obtiveram melhores resultados para MP a partir das 24 horas de refrigeração utilizando diluentes a base de caseína quando comparado ao leite desnatado. Entretanto, melhores resultados de MT, MP e VAP foram descritos por Papa et al. [18], após 24 horas, utilizando o leite desnatado.

225 Florez-Rodriguez et al. [19] comparando diluentes a base de leite
226 desnatado com outro livre de leite, contendo albumina sérica bovina (BSA),
227 afim de reduzir a variabilidade química, resolver a questão da biossegurança e
228 tornar o meio menos opaco, obtiveram resultados para as análises de cinética
229 inferiores, quando comparados os meios entre si, e em relação aos resultados
230 do presente estudo quando comparado os diluidores testados.

231 Aurich et al. [20], também atestaram a qualidade em manter condições
232 ótimas para inseminação em até 24 horas de três diluentes (Kenney modificado
233 contendo caseinato e proteína do soro, EquiPro e Andromed-E) e indicaram o
234 uso de um diluente composto por caseinatos e proteínas do soro para períodos
235 de refrigeração superiores a 24 horas.

236 Farrás et al. [16] encontraram resultados para integridade de membrana
237 semelhantes ao do presente estudo, não apresentando diferença estatística
238 entre os grupos em nenhum dos tempos testados. Florez-Rodriguez et al. [19]
239 notaram haver diferença entre os diluentes a base de leite desnatado e BSA,
240 sendo o último inferior para proteção da membrana plasmática.

241 Pagl et al. [15] também não notaram diferença entre diluentes a base de
242 leite e os quimicamente definidos, entretanto os resultados aqui apresentados
243 as 24 horas são cerca de 20% superiores aos deste estudo.

244 Papa et al. [18] testando dois diluentes comerciais, um a base de leite
245 desnatado e outro a base de caseínas notou diferença em favor do diluente a
246 base de leite apenas no tempo de 24 horas.

247 Os resultados do teste de fertilidade deste experimento se mostraram
248 animadores, uma vez que, as taxas de gestação das éguas inseminadas com
249 sêmen contendo diluente a base de caseinato foram numericamente superiores
250 às do grupo controle, apresentando tendência estatística ($P=0,0622$). A taxa de
251 fertilidade do grupo caseinato foi semelhante e por vezes superiores as
252 encontradas por outros autores usando diluentes a base de leite [14,18,21,22].
253 Tais resultados podem ser explicados devido a interação da caseína com as
254 HSPs [8,9] e a utilização das caseínas à zona pelúcida. Visto que os diluentes
255 que contêm proteínas do leite aumentam a ligação dos espermatozoides a ZP
256 em equinos e bovinos [23].

257

258 **5. Conclusão**

259 O uso de caseinato de sódio demonstrou ser uma alternativa viável para
 260 substituição do leite desnatado, mantendo as características de motilidade e
 261 viabilidade espermáticas, durante a refrigeração do sêmen equino por um
 262 período de 24 horas. Os resultados obtidos através do estudo da fertilidade
 263 ratificam o uso do caseinato para refrigeração de sêmen de garanhões *Bad*
 264 *Cooler* e posterior inseminação, elevando as taxas de prenhez indicando a sua
 265 eficácia.

267 **Referências**

- 269 [1] Brinsko SP, Varner DD. Artificial insemination and preservation of semen.
 270 Vet Clin North Am Equine Pract 1992;8:205-218.
- 271 [2] Batellier F, Vidament M, Fauquant J, Duchamp G, Arnaud G, Yvon JM,
 272 Magistrini M. Advances in cooled semen technology. Anim Reprod Sci
 273 2001;68:181-190.
- 274 [3] Kenney RM, Berman RV, Cooper WL, Morse GW. Minimal contamination
 275 techniques for breeding mares: techniques and preliminary findings. In: Annual
 276 Convention, American Association Equine Practitioners, Boston: AAEP
 277 1975;21:327-335.
- 278 [4] Canisso IF, Souza FA, Silva EC, Carvalho GR, Guimarães JD, Lima AL.
 279 Inseminação artificial em equinos: sêmen fresco, diluído, resfriado e
 280 transportado. Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais 2008;6:389-
 281 398.
- 282 [5] Darenius A. Experiences with chilled, transported equine sêmen. In: Stallion
 283 Reproduction Symposium. Society for Theriogenology – American Association
 284 of Equine Practitioners 1998, p. 60-70.
- 285 [6] Amann RP, Graham JK. Spermatozoal function. In: McKinnon AO, Voss JL
 286 (Ed.). Equine reproduction 1993, Philadelphia: Lea & Febiger, p.715-745.
- 287 [7] Aurich, C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored
 288 stallion spermatozoa. Animal Reproduction Science 2005, v. 89, p. 65–75.

- 289 [8] Plante G, Lusignan MF, Lafleur M, Manjunath P. Interaction of milk proteins
290 and Binder of Sperm (BSP) proteins from boar, stallion and ram semen.
291 Reproductive Biology and Endocrinology 2015, v.13, p.92.
- 292 [9] Manjunath P. New insights into the understanding of the mechanism of
293 sperm protection by extender components. Animal Reproduction 2012, v.9, n.4,
294 p.809-815.
- 295 [10] Hartwig FP, Lisboa FP, Hartwig FP, Monteiro GA, Maziero RRD, Freitas-
296 Dell'aqua CP, Alvarenga MA, Papa FO, Dell'aqua Jr JA. Use of cholesterol-
297 loaded cyclodextrin: An alternative for bad cooler stallions. Theriogenology
298 2014, v. 81, p. 340-346.
- 299 [11] Brinsko SP, Crockett EC, Squires EL. Effect of centrifugation and partial
300 removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and
301 storage. Theriogenology 2000;54:129–36.
- 302 [12] Freitas-Dell'aqua CP, Guasti PN, Monteiro GA, Maziero RRD, Dell'Aqua Jr
303 JA, Papa FO. Flow cytometric analysis of fertile and subfertile frozen stallion
304 spermatozoa. Animal Reproduction 2012, v.9, p.941
- 305 [13] Guasti PN, Freitas-Dell'Aqua CP, Maziero RRD, Hartwig FP, Monteiro GA,
306 Lisboa FP, Papa FO. Validation of flow cytometry for assessment of membrane
307 lipid peroxidation of equine spermatozoa. IV International Symposium on
308 Animal Biology of Reproduction, 2012.
- 309 [14] Guthrie HD, Welch GR. Determination of intracellular reactive oxygen
310 species and high mitochondrial membrane potential in Percoll-treated viable
311 boar sperm using fluorescence-activated flow cytometry. Journal of Animal
312 Science 2006, v.84, p.2089-2100.
- 313 [15] Pagl R, Aurich JE, Müller-schlösser F, Kankofer M, Aurich C. Comparison
314 of an extender containing defined milk protein fractions with a skim milk-based
315 extender for storage of equine semen at 5°C. Theriogenology 2006, v.66,
316 p.1115-1122.
- 317 [16] Farrás MC, Avanzi BR, Melo CM, Dell'aqua JA, Papa FO. Efeito de
318 diferentes diluentes na manutenção das características do sêmen eqüino em
319 dois sistemas de refrigeração passiva. Ciência Animal Brasileira 2008, v. 9, p.
320 693-699.

- 321 [17] LeFrappier MS, Walston BS, Whisnant CS. Comparison of various
322 extenders for storage of cooled stallion spermatozoa for 72 hours. *Journal of*
323 *Equine Veterinary Science* 2010, v. 30, p. 200-204.
- 324 [18] Papa PM, Ramires-neto C, Monteiro GA, Sancier-silva YFR, Resende HL,
325 Freitas-Dell'aqua CP, Dell'aqua Jr JA, Alvarenga MA, Papa FO. Sperm
326 parameters and fertility of stallion semen cooled with different extenders.
327 *Journal of Equine Veterinary Science* 2014, v. 34, p. 79.
- 328 [19] Florez-Rodriguez SA, Arruda RP, Alves MBR, Affonso FJ, Carvalho HF,
329 Lemes KM, Lançon R, Andrade AFC, Celeghini ECC. Morphofunctional
330 characterization of cooled sperm with different extender to use in equine-
331 assisted reproduction. *Journal of equine veterinary science* 2014, v. 34, p. 911-
332 917.
- 333 [20] Aurich C, Seeber P, Müller-Schlösser F. Comparison of Different Extenders
334 with Defined Protein Composition for Storage of Stallion Spermatozoa at 5°C.
335 *Reproduction Domestic Animal* 2007, v. 42, p. 445–448.
- 336 [21] Fleury JJ, Pinto AJ, Celeghini ECC, Lima CG, Arruda RP. Influência do
337 garanhão e da técnica de inseminação sobre os índices de recuperação
338 embrionária e de gestação em um programa de transferência de embriões em
339 equinos da raça Mangalarga. *Brazilian Journal Veterinary Research Animal*
340 *Science* 2001, v. 38, p. 34-37.
- 341 [22] Pugliesi G, Carvalho GR, RatesDM, Ker PG, Matta MP, Oliveira RR, Filho
342 JMS. Viability and fertility of cooled equine semen diluted with skimmed milk or
343 glycine egg yolk-based extenders. *Revista Brasileira de Zootecnia* 2012, v. 41,
344 n. 12, p. 2411-2417.
- 345 [23] Coutinho da Silva MA, Seidel GE, Jr., Squires EL, Graham JK, Carnevale
346 EM. Effects of components of semen extenders on the binding of stallion
347 spermatozoa to bovine or equine zonae pellucidae. *Reproduction Advance*
348 *Publication* 2012.

CAPÍTULO III

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso da biotecnologia de refrigeração de sêmen representa um importante avanço genético para espécie equina, contudo os diluidores a base de leite em pó desnatado não são satisfatórios para se utilizar em todos os garanhões, principalmente aqueles que se apresentam pouco resistentes ao choque frio.

Demonstrar que caseinatos são efetivamente capazes de promover proteção adequada e longevidade as células espermáticas é importante para alavancar novos estudos. O desenvolvimento e aplicação destes diluidores tem o potencial de garantir trocas genéticas mais fáceis e seguras, reduzindo problemas sanitários e ampliando as reservas genéticas das raças.