

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor ,
o texto completo desta dissertação
será disponibilizado somente a partir
de 22/01/2020.

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^a. Dr^a. 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 conquista.

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

CAPÍTULO I.....	1
1. INTRODUÇÃO.....	2
2. REVISÃO DE LITERATURA	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
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	20
REFERÊNCIAS	21
CAPÍTULO II.....	28
ARTIGO	29
RESUMO	29
1. INTRODUÇÃO.....	30
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	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
3. RESULTADOS	34
4. DISCUSSÃO.....	37
5. CONCLUSÃO.....	39
REFERÊNCIAS	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.

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.; SCHAFER, W.; SANZ, L.; REINERT, M.; NESSAU, S.; RAID, 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 zona pellucida. **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 zona pellucida 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.; 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-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 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

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.

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., CarlucciO 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

- [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 espermatozoides 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.