

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

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

**JEFFERSON VIANA ALVES DINIZ**

Botucatu – SP

Junho/2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

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

**JEFFERSON VIANA ALVES DINIZ**

Tese apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Biotecnologia Animal  
para obtenção do título de Doutor.

**Orientadora:** Prof. Eunice Oba

Botucatu – SP  
Junho/2017

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

Diniz, Jefferson Viana Alves.

Utilização do caseinato de sódio na congelação de sêmen  
bovino / Jefferson Viana Alves Diniz. - Botucatu, 2017

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

Orientador: Eunice Oba

Coorientador: Jose Antônio Dell'Aqua Junior

Coorientador: Frederico Ozanam Papa

Capes: 50504002

1. Bovino - Reprodução. 2. Sêmen - Criopreservação.  
3. Gema de ovo. 4. Preservação do sêmen. 4. Caseína.

Palavras-chave: CASA; Criopreservação; Gema de ovo; IATF;  
PIV.

Nome do Autor: Jefferson Viana Alves Diniz

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

### **COMISSÃO EXAMINADORA**

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

Presidente e Orientador  
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Unesp – Botucatu/SP

#### **Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa**

Membro Titular  
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Unesp – Botucatu/SP

#### **Prof Dr. Jose Antônio Dell'Aqua Junior**

Membro Titular  
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Unesp – Botucatu/SP

#### **Prof Dr. Rafael Augusto Satrapa**

Membro Titular  
Centro de Ciências Biológicas e da Natureza (CCBN)  
Faculdade de Medicina Veterinária  
Universidade Federal do Acre (UFAC), Rio Branco, AC, Brasil.

#### **Prof Dr. Fernando Andrade Souza**

Membro Titular  
Centro de Ciências Biológicas e da Natureza (CCBN)  
Faculdade de Medicina Veterinária  
Universidade Federal do Acre (UFAC), Rio Branco, AC, Brasil.

Data da defesa da tese 30 de junho de 2017

## **Dedicatória**

## Dedico este trabalho

Dedico essa obra a minha querida família, minha esposa **Renata Angelim**, meus filhos **Fillipi Angelim** e **Giovanni Angelim**, por todo amor incondicional, por superarem a minha ausência durante as minhas viagens e pelo companheirismo de todas as horas durante toda essa jornada, pois vocês são o motivo da minha vida, alegria do meu dia e a força de que preciso.

Ao meu pai **Jeová Alves Diniz**, à minha mãe **Maria das Neves Viana de Andrade Diniz**, dedico esta tese, mesmo longe, sei que posso contar com vocês, e saibam que todos os dias penso em vocês; queria poder tê-los ter sempre presente, mas a vida, às vezes, toma rumos que não esperamos. Mesmo assim, saibam que a força que vocês me dão é suficiente para que eu não desista dos meus sonhos.

# **Agradecimentos**

A **Deus**, primeiramente, pois sem Ele nada é possível.

A Nossa Senhora de Aparecida que me deu muita força no momento em que mais necessitava e fui agraciado com uma grande benção.

Especialmente a minha orientadora, professora Dr<sup>a</sup>. **Eunice Oba**, exemplo de profissionalismo e ética científica. Ensinou-me a questionar, a procurar as respostas. Sempre irei agradecer à senhora por ter aberto as portas para um mundo novo, que é o mundo da pesquisa.

Ao eterno amigo **Rodolpho Satrapa** por todos os ensinamentos que você sempre passa e por seu pleno compromisso e amor com o trabalho.

Ao amigo Dr. **Jose Antônio Dell'Aqua Junior**, ensinou-me a questionar, a procurar as respostas para as dúvidas, mas, sobretudo ensinou-me a ter paixão pela pesquisa.

À Dr<sup>a</sup> **Camila de Paula Freitas Dell'Aqua** pelas análises realizadas durante o experimento e pela colaboração no entendimento dos resultados.

Ao amigo Dr. **Frederico Ozanam Papa**, por todo apoio, pelos ensinamentos e pelo companheirismo durante toda essa jornada, você faz parte desse projeto.

Aos amigos **João Alexandre Matos Carneiro** e **Gabriel Leite de Freitas** pelo seu companheirismo, lealdade, honestidade e integridade, amigos de todas as horas, nos bons e maus momentos, que sempre me deram apoio no desenvolvimento do projeto de pesquisa.

Ao Dr. **José Roberto** por permitir o acesso as dependências da Seleon<sup>®</sup> e coleta das amostras.

Ao Dr. **Renato Giroto** da RG genética pelo total compromisso na execução dos protocolos de sincronização de cio.

Aos demais amigos de pós-graduação que sempre me incentivaram e me apoiaram nessa jornada.

Ao Governo do Estado do Acre, por meio do secretário **José Carlos Reis da Silva** por viabilizar minha liberação para cursar o doutorado e permitir o uso das instalações oficiais do laboratório da EMDGA para a realização de parte importante do projeto de pesquisa.



Aos meus amigos e colegas de trabalho **Rosano Ramos de Freitas** e **Marcos Nereu Luckner** que de varias formas colaboraram e apoiaram esse projeto.

Aos colegas de trabalho do Instituto Federal do Acre (IFAC) **Marcelo Helder Santana** e a **Italva Miranda da Silva** por todo apoio para a conclusão desse trabalho. A discente **Laine Oliveira da Silva** por mostrar total compromisso e colaboração para com esse projeto.

## Lista de Abreviaturas e Siglas

---

<b>ALH</b>	Movimento lateral de cabeça
<b>AMPc</b>	3-5-Adenosina monofosfato cíclica
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>BCF</b>	Frequência de batimento de cauda
<b>BSP</b>	Plasma seminal bovino
<b>Ca<sup>++</sup></b>	Cálcio
<b>CASA</b>	“Computer Assisted Semen Analysis”
<b>CAT</b>	<b>Catalase</b>
<b>CCO</b>	Citocromo C-oxidase
<b>CFDA</b>	Diacetato de carboxifluoresceína
<b>CIV</b>	Cultivo <i>in vitro</i>
<b>DAB</b>	Diaminobenzidina
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfoxido
<b>eCG</b>	Gonadotrofina coriônica equina
<b>EROS</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>FITC</b>	Isotiocionato de fluoresceína
<b>FIV</b>	Fertilização <i>in vitro</i>
<b>FSH</b>	Hormônio folículo estimulante
<b>GnRH</b>	Hormônio liberador de gonadotrofina
<b>GPx</b>	<b>Glutathione peroxidase</b>
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrogênio
<b>HCl</b>	Ácido clorídrico
<b>HPM</b>	Potencial mitocondrial
<b>IA</b>	Inseminação artificial
<b>IATF</b>	Inseminação artificial em tempo fixo
<b>IMP</b>	Integridade de membrana plasmática
<b>LDL</b>	Lipoproteína de baixa densidade
<b>LH</b>	Hormônio luteinizante

---

---

<b>LIN</b>	Linearidade
<b>LPO</b>	Peroxidação lipídica
<b>MDA</b>	Malondialdeído
<b>MIV</b>	Maturação <i>in vitro</i>
<b>mM</b>	Milimolar
<b>MP</b>	Motilidade progressiva
<b>MT</b>	Motilidade espermática total
<b>NaOH</b>	Hidróxido de sódio
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Superóxido
<b>OH<sup>-</sup></b>	Radical hidroxila
<b>OH<sup>•</sup></b>	Radical hidroxila
<b><i>p</i></b>	Nível de significância
<b>P4</b>	Progesterona
<b>pH</b>	Potencial de hidrogeniônico
<b>PI</b>	Iodeto de propídeo
<b>PIV</b>	Produção <i>in vitro</i>
<b>PSA</b>	Psium sativum
<b>RAP</b>	Porcentagem de espermatozoides com movimentos rápidos
<b>RCA</b>	Ricinus communis
<b>SCSA</b>	“Sperm Chromatin Structure Assay”
<b>SOD</b>	superóxido dismutase
<b>STR</b>	Retilinearidade
<b>VAP</b>	Velocidade de trajeto
<b>VCL</b>	Velocidade curvilínea
<b>VSL</b>	Velocidade retilínea
<b>ZP</b>	Zona pelúcida

---

## Lista de Símbolos

---

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
$>$	Maior que
$+$	Mais
$\text{\textcircled{R}}$	Marca registrada
$<$	Menor que
$\%$	Porcentagem

---

# Lista de Tabela

## Capítulo 01

	<b>Página</b>
<b>Tabela 1:</b> Ajuste do equipamento de análise computadorizada dos espermatozoides bovinos.	..... <b>50</b>
<b>Tabela 2:</b> Médias $\pm$ erro padrão das características da cinética espermática do sêmen de 30 touros no T0 e no T90 dos grupos G e GC.	..... <b>54</b>
<b>Tabela 3:</b> Média $\pm$ erro padrão das características avaliadas por citometria de fluxo da integridade das membranas plasmática, acrossomal e alterações semelhantes à capacitação, superóxido e potencial mitocondrial do sêmen (T0 e T90) dos grupos G e GC dos 30 animais.	..... <b>55</b>
<b>Tabela 4:</b> Taxa de clivagem no dia 3 do cultivo ( $n^\circ$ total de óocitos = 1.129) e de embriões no dia 8 do cultivo ( $n^\circ$ total de embriões = 433) no teste de fertilização <i>in vitro</i> com sêmen bovino criopreservado em diluentes dos grupos G e GC.	..... <b>56</b>
<b>Tabela 5:</b> Taxa e valores absolutos de prenhez resultantes de IATF ( $n = 907$ ) com sêmen congelado dos grupos G e GC.	..... <b>56</b>

# Lista de Figuras

## Capítulo 01

	<b>Página</b>
<b>Figura 1:</b> Média $\pm$ erro padrão no número de embriões clivados em relação ao número de oócitos totais disperso em 7 protocolos de FIV dispersos para cada grupo G: (20% de gema de ovo), GC: (15% de gema de ovo + 2% de caseinato de sódio). Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ( $P < 0,05$ ) entre grupos pelo teste t.	.....55
<b>Figura 2:</b> Média $\pm$ erro padrão no número de embriões em relação ao número de oócitos totais em 7 protocolos de FIV dispersos para cada grupo G: (20% de gema de ovo), GC: (15% de gema de ovo + 2% de caseinato de sódio). Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ( $P < 0,05$ ) entre grupos pelo teste t.	.....55

# SUMÁRIO

	Página
<b>Resumo</b> .....	01
<b>Abstrac</b> .....	02
<b>1.Introdução</b> .....	03
<b>2.Revisão bibliográfica</b> .....	04
2.1 Célula espermática .....	04
2.2 Membrana plasmática .....	05
2.3 Meios diluidores e crioprotetores .....	07
2.3.1. Gema de ovo .....	10
2.3.2. Caseinato de sódio .....	11
2.4 Mudanças nos parâmetros espermáticos decorrentes do processo de criopreservação.....	13
2.5 Avaliação do espermatozoides bovino.....	15
2.6 Análise computadorizada do movimento espermático .....	17
2.7 Integridade de membrana plasmática (IMP).....	18
2.8 Integridade de membrana acrossomal .....	19
2.9 Avaliação do estresse oxidativo .....	20
2.10. Teste de fertilidade – Inseminação artificial em tempo fixo ....	22
2.11. Teste de fertilidade – Produção in vitro de embriões .....	24
<b>3.0 Referência</b> .....	27
<b>4.0 Hipótese</b> .....	42
<b>5.0 Objetivos</b> .....	43
<b>Capítulo 01</b> .....	44
<b>Artigo científico</b> (Utilização do caseinato de sódio na congelção de sêmen bovino) .....	45
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	70

**DINIZ, J.V.A. Utilização do caseinato de sódio na congelação de sêmen bovino.** 2017. 70 f. Botucatu, 2017. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

### **Resumo**

Os meios diluidores de sêmen exercem importante papel na manutenção da qualidade e da viabilidade espermática, assim como da sua capacidade de fertilização após o processo de criopreservação. O estudo objetivou avaliar a eficácia do caseinato de sódio (2%) adicionado a diluente comercial com 15% de gema de ovo (grupo GC), na manutenção da fertilidade do sêmen bovino criopreservado e, como controle, empregou-se o mesmo diluente comercial com 20% de gema de ovo sem caseinato de sódio (grupo G). No experimento 1, em sêmen descongelado dos dois grupos foram avaliados padrões de cinética espermática, população de espermatozoides sem as alterações das membranas plasmática e acrossomal (IMPA), sem desestabilização da membrana (SDM) e sem translocação de fosfatidilserina da membrana (STF), alto potencial mitocondrial (APM) e geração de superóxido ( $O_2^-$ ). Nos experimentos 2 e 3 realizaram-se respectivamente, teste de fertilidade *in vitro* (taxa de clivagem no dia 3 e taxa de formação de embriões no dia 8 após a fecundação) e *in vivo* (porcentagem de prenhez) por meio da IATF. De acordo com os resultados, verificou-se diferença na cinética espermática entre os dois grupos, a favor do grupo GC ( $P < 0,05$ ) principalmente após estresse térmico (T90). Com relação às avaliações da IMPA, SDM, STF, observaram-se diferenças também no T90 em favor do grupo GC ( $P < 0,05$ ) para as três avaliações. Contudo, o alto potencial mitocondrial (APM) e as espécies reativas ao oxigênio (EROS) foram menores no T0 e no T90 para o grupo GC ( $P < 0,05$ ). No teste de fertilidade *in vitro* foi constatada diferença na taxa de clivagem no dia 3 e na taxa de produção de embriões no dia 8 do cultivo ( $P < 0,05$ ), assim como, no teste de fertilidade *in vivo* em programas de IATF, verificou-se diferença entre os dois grupos de diluentes, a favor do grupo GC ( $P < 0,05$ ). Conclui-se que houve uma melhoria na morfofuncionalidade espermática e na fertilidade tanto *in vivo* como *in vitro* do sêmen bovino criopreservado com adição de 2% de caseinato ao diluente.

**Palavra chave:** CASA, gema de ovo, criopreservação, FIV, IATF



**DINIZ, J.V.A. Sodium caseinate use in bovine semen freezing.** [Utilização do caseinato de sódio na congelação de sêmen bovino]. 2017. 70 f. Botucatu, 2017. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Semen extender play important role in maintaining sperm quality and viability, as well as the ability to fertilize after cryopreservation process. The objective of this study was to evaluate the efficacy of sodium caseinate (2%) added to commercial diluent with 15% egg yolk (CG group), to maintain the fertility of cryopreserved bovine sêmen; as control, the same commercial diluent with 20% egg yolk without sodium caseinate was used (group G). In experiment 1, sperm kinetics, spermatozoa population without plasma and acrosomal membranes changes (IMPA), without membrane destabilization (SDM) and without membrane phosphatidylserine translocation (FTS), mitochondrial potential (APM) and superoxide generation ( $O_2^-$ ) of thawed semen of both groups were evaluated. *In vitro* fertilization test (cleavage rate on D3 and embryo rate in D8) and percentage of pregnancy by TFAI were performed in experiments 2 and 3. According to the results, there was difference in spermatoc kinetics between groups, favoring GC ( $P < 0.05$ ), mainly after thermal stress (T90). IMPA, SDM, FTS, differences were also observed in T90 in favor of GC ( $P < 0.05$ ) for three evaluations. However, the high mitochondrial potential (APM) and oxygen reactive species (EROS) were lower in T0 and T90 in GC ( $P < 0.05$ ). *In vitro* fertility test showed difference on D3 cleavage rate and on D8 embryos production ( $P < 0.05$ ), as well as *in vivo* fertility test by TFAI in favor of GC ( $P < 0.05$ ). It was concluded that there was improvement of sperm morphofunctionality and fertility both *in vitro* and *in vivo* of cryopreserved bovine semen with addition of 2% caseinate to the diluent.

**Keywords:** CASA, egg yolk, cryopreservation, IVF, TFAI.

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil está entre os maiores produtores mundiais de carne bovina, movimentando em 2015, R\$ 93,98 bilhões com a venda do produto no mercado interno, e R\$ 19,49 bilhões com exportações. Somam-se a esses montantes, R\$ 10,19 bilhões com exportações de couro e R\$ 15,29 bilhões com demais derivados. A cadeia produtiva dessa proteína animal movimentou cerca de R\$ 147,03 bilhões, gerando cerca de 7 milhões de empregos (ABIEC, 2016). Porém, ainda que tenha essa importância na composição dos bens do país, há que se melhorar certos parâmetros na produção, o que fica explícito quando estatísticas apontam índices relativamente baixos de produtividade dos rebanhos, taxa de natalidade próxima de 60%, idade média ao abate de 48 meses e lotação que não atinge um boi por hectare nas propriedades que podem comprometer a rentabilidade da atividade (ESCOBAR, 2015).

Todavia, há tempos, preocupando-se em superar barreiras, buscou-se o apoio das biotecnologias reprodutivas com vistas a incrementar a produção, alcançada principalmente com o uso massificado da inseminação artificial (IA) que mais tardiamente, praticada na modalidade de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) (BARUSELLI et al., 2004; ESCOBAR, 2015) e outras biotécnicas aplicadas à reprodução animal, como sexagem de sêmen, fertilização *in vitro*, clonagem, transgenia e a utilização de marcadores moleculares (VARAGO et al., 2008; VIEIRA, 2012). Proporcionando desta forma, em menor espaço de tempo, o melhoramento genético do plantel, explorando ao máximo a capacidade reprodutiva de animais de alta linhagem genética, como ocorre atualmente com a IA (BARUSELLI et al., 2004; ARRUDA et al., 2011).

O êxito da aplicação da IA depende, dentre outros fatores, dos progressos relacionados às técnicas de criopreservação das células espermáticas e dos meios diluidores. Poucos avanços surgiram nas últimas décadas em relação ao desenvolvimento de novos meios diluidores de sêmen da espécie bovina, razão pela qual ainda se constata os efeitos deletérios da criopreservação sobre a integridade e funcionalidade dos espermatozoides (CELEGHINI et al., 2008)

O mecanismo de atuação do caseinato de sódio se faz no sentido de reduzir as ligações indesejáveis das proteínas do plasma seminal com a membrana plasmática dos espermatozoides (BERGERON et al., 2007), levando como consequência sua estabilização em razão da menor perda de seus lipídeos integrais (MANJUNATH, 2012; PLANTE et al., 2015), pela sua capacidade de reduzir a atividade das caspases e por

manter a integridade do DNA (PAGL et al., 2006; COUTINHO DA SILVA et al., 2012), além de possibilitar o incremento na taxa de fertilidade em decorrência de uma maior ligação espermática com a zona pelúcida, condição desejável para obtenção de boa fecundação. Um outro atributo, atrelado ao diluente contendo o caseinato de sódio, é sua afinidade com os íons de cálcio que pode promover um retardo na pré-capacitação em decorrência do processo de criopreservação (COUTINHO DA SILVA et al., 2012).

Assim, objetivou-se com o presente trabalho abordar aspectos relacionados à utilização do caseinato de sódio na congelação de sêmen bovino como composição química alternativa aos de uso já consagrados, como forma de alcançar melhores resultados que possam ser traduzidos em fertilidade do sêmen, posto que os diluentes são elementos chave na determinação da qualidade do sêmen congelado e, por via de consequência, na otimização dos resultados de concepção.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Célula espermática**

A formação do espermatozoide ocorre no interior dos túbulos seminíferos dos testículos, por um processo conhecido como espermatogênese (EDDY; O'BRIEN, 1994). Esta é dividida em três fases: a espermatocitogênese (proliferação), a meiose (multiplicação) e a espermiogênese (transformação de espermatídes em espermatozoides). Outros tipos celulares que não são da linhagem espermatogônica, como as células de Sertoli e as células intersticiais ou Leydig, estão envolvidas neste processo (GARNER; HAFEZ, 2004). Após a formação, as células espermáticas passam por um processo de maturação na cabeça do epidídimo e, posteriormente, são armazenados na cauda dessa mesma estrutura até o momento da ejaculação (SETCHELL, 1993).

Os espermatozoides são estruturas altamente especializadas, constituídos de três partes: cabeça, colo e cauda (SINGH, 2006). Sua característica estrutural é voltada para sua atividade funcional única: garantir a liberação do material genético presente no seu núcleo para o interior do oócito, onde posteriormente, pela fusão dos pró-núcleos masculino e feminino, torna-se o zigoto (AURICH, 2005).

A Principal função da cabeça do espermatozoide é de proteção do material genético e do seu transporte até o interior do oócito. Esta estrutura é composta pelo núcleo, o acrossomo, região pós-acrossomal, quantidade diminuta de elementos no

citoplasma e a fossa de implantação da cauda. O DNA está contido no núcleo, acondicionado por um envelope nuclear. O acrossoma, derivado do complexo de Golgi, possui enzimas hidrolíticas como pró-acrosina, hialuronidase, esterases e hidrolases ácidas (PESCH; BERGMANN, 2006) necessárias para a penetração na matriz extracelular do oócito para finalizar a fertilização (EDDY; O'BRIEN, 1994; GUYTON; HALL, 1997). A lâmina pós-acrossomal exerce um importante papel na ligação com o oócito e é a região onde se localiza a fossa de implantação da cauda (JUHÁSZ et al., 2000).

A área de transição entre a cabeça e a peça intermediária da célula espermática, conhecida como colo, possui a finalidade de armazenar os centríolos (MIES FILHO et al., 1987). A cauda ou flagelo, responsável pela cinética da célula, é construída por três estruturas: peças intermediária, principal e terminal, e representa a estrutura mais longa da célula espermática (SINGH, 2006). A peça intermediária se estende do colo até o anulus onde começa a peça principal, sendo o local da matriz energética do espermatozoide, composta pela bainha mitocondrial, tendo como principal função gerar energia na forma de adenosina trifosfato (ATP), propiciando movimentação flagelar por meio do axonema (MIES FILHO et al., 1987; CARVALHO et al., 2002; GARNER; HAFEZ, 2004; SINGH, 2006). A peça principal é a parte central do flagelo, responsável pelo suporte do flagelo e o controle de seus movimentos. A peça terminal contém apenas o axonema recoberto pela membrana plasmática (MORTIMER, 1997).

## **2.2. Membrana plasmática**

A membrana plasmática reveste toda a célula espermática englobando os componentes intracelulares e organelas com a função de manter, por meio da sua permeabilidade, um gradiente químico de íons e de outros elementos solúveis entre os meios extra e intracelular (BRANDÃO, 2008). Essa estrutura celular flexível exerce a importante função também de barreira física de proteção dos espermatozoides durante seu deslocamento pelos tratos genitais masculino e feminino (AMANN; GRAHAM, 2010).

Está arranjada, de modo heterogêneo, com cinco domínios, os quais possuem composição e função distintas: acrossoma, segmento equatorial, segmento basal, domínio da peça intermediária e domínio da cauda (AURICH, 2005). São formadas por três classes de moléculas: os lipídios, responsáveis pela integridade estrutural; as proteínas,

responsáveis pelos processos dinâmicos; e os carboidratos, que aumentam o caráter hidrofílico e estabilização da estrutura da membrana (ALMEIDA, 2006). Nela, os lipídios e proteínas agrupam-se em uma bicamada, contendo de modo assimétrico, moléculas de fosfolipídios com características anfipáticas, ou seja, apresenta uma extremidade polar hidrofílica e outra apolar hidrofóbica. Na bicamada que forma a membrana celular, as extremidades hidrofílicas dos fosfolipídios voltam-se para os meios aquosos extra e intracelulares, enquanto que as extremidades hidrofóbicas se orientam para o meio da dupla camada (OLIVEIRA, 2007).

Esse arranjo permite seletividade na entrada e saída da água e de moléculas nela dissolvidas (GUYTON; HALL, 2000). O transporte das moléculas segue dois caminhos, ou atravessam diretamente a membrana ou são conduzidas por meio de canais ou poros formados pelas proteínas que se encontram intercaladas aos lipídios (HOOGEWIJS, 2010). Dentre os fosfolipídios formadores da membrana plasmática do espermatozoide, encontram-se, em maior quantidade, a fosfatidilcolina, esfingomiéline, fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina. As duas primeiras estão inseridas no folheto externo da bicamada lipídica, enquanto as duas últimas encontram-se no folheto interno. Quando há danos à membrana, como no resfriamento ou dano grave como no congelamento, a fosfatidilserina desloca-se dos folhetos internos para os folhetos externos. Complementando a lista dos constituintes da membrana dos espermatozoides destacam-se a presença dos esteroides e dos glicolipídios (GRAHAM, 2010; SILVA; GUERRA, 2011).

O principal ácido graxo constituinte da membrana plasmática, o ácido docosahexanóico, encontra-se presente na maioria dos mamíferos. Porém, em algumas espécies, como equinos, ovinos e aves o docosapentanóico figura como sendo o principal constituinte (GARCIA et al., 2011).

O colesterol, esteroide predominante, estabiliza a membrana preenchendo os espaços entre as cadeias de ácidos graxos e de fosfolipídios. A sua distribuição não é uniforme na membrana, concentrando-se mais na face extracelular (CROSS, 1998). A sua remoção pode acarretar em total desestabilização e, conseqüentemente, reorganização dos componentes da bicamada, incluindo a redistribuição de proteínas integrais, aumentando sua capacidade de fusão. Já os glicolipídios localizam-se na superfície da membrana e representam menos de 10% dos lipídios polares (SQUIRES et al., 1999; GONZALEZ, 2004).

Wales & White (1959) observaram relação direta entre o teor de colesterol presente nas células e a resistência ao choque frio, ou seja, quanto menor resistência ao choque frio menor teor de colesterol nas células. Poulos et al. (1973) constataram mais lipídios de cadeia insaturada na membrana plasmática nas espécies menos resistentes à criopreservação.

A busca por elementos que consigam conferir proteção às células espermáticas vem sempre se atualizando, ainda que os principais meios de congelação contenham como base a gema de ovo em sua composição e é seu fosfolípido que confere proteção às células espermáticas, minimizando as injúrias provenientes do processo de congelação. O componente que confere essa proteção é o fosfolípido lecitina (MEDEIROS et al., 2002).

### **2.3. Meios diluidores e crioprotetores**

Os primeiros ensaios com meios diluentes foram realizados na década de 40, quando se utilizou a gema de ovo com o intuito de criopreservar sêmen bovino (PHILLIPS; LARDY, 1940). Na década de 50, surgiram alguns estudos importantes com os diluentes à base de leite (THACKER; ALMQUIST, 1953). A principal função de um diluidor é permitir sua interação íntima com as células espermáticas com a finalidade de preservar a integridade do espermatozoide e de manter a sua capacidade de fecundação (MANJUNATH, et al., 2002). Devido ao processo de criopreservação, danos provocados aos espermatozoides podem ser irreversíveis, principalmente, em decorrência da formação de cristais de gelo intracelulares que afetam as características estruturais e físico-químicas da célula. Portanto, o diluidor e o crioprotetor devem apresentar como principais funções: minimizar os efeitos do choque frio e regular a alteração osmótica que ocorre no processo de congelação (VALCARCEL et al., 1996).

Durante o processo de congelação, as estruturas celulares mais afetadas são as membranas plasmática e acrossomal, que, por sua vez, acarretam transtornos à motilidade progressiva e à atividade metabólica, prejudicando assim, a produção de energia e o tempo de sobrevivência das células no trato reprodutivo da fêmea (PICKETT et al., 1987).

Para que um diluente possa ser considerado completo e eficiente, deve compor-se de elementos fundamentais, tais como, substâncias iônicas e aniônicas, que mantêm a osmolaridade; lipoproteínas ou material de alto peso molecular que agem como crioprotetores extracelulares e glicerol, propanodiol ou dimetilsulfoxido (DMSO), com

função de crioprotetores intracelulares; fonte de energia, como glicose, frutose; e outros aditivos como enzimas e antibióticos também complementam a composição (VISHWANATH; SHANNON, 2000; AIRES et al., 2003).

Em seu conjunto, os diluidores utilizados na criopreservação de sêmen desempenham as funções de manutenção da atividade metabólica dos espermatozoides, estabilização da membrana plasmática, mediante o equilíbrio do potencial hidrogeniônico (pH) do meio (efeito tampão), neutralização de produtos tóxicos provenientes do metabolismo dos espermatozoides, proteção contra o choque térmico, manutenção do equilíbrio eletrolítico e osmótico e fornecimento de energia; a adição de antibióticos promove a inibição do crescimento bacteriano (LORENZONI, 2010).

Assim, em razão da importante interação que há entre a composição dos meios diluidores/criopreservadores e as curvas de refrigeração/congelação, para a sobrevivência dos espermatozoides (CHAVEIRO et al., 2006), esses meios assumiram relevante papel na IA, tanto na sua introdução quanto na sua permanência, como ferramenta no manejo reprodutivo em bovinos (HURST, 1953).

Segundo Holt (2000), as principais substâncias tamponantes dos meios diluidores de congelação são citrato de sódio, Tris (tris- hidroximetilaminometano) e Tes (N-tris-hidroximetil-aminometano ácido sulfônico). Também são tampões os fosfatos e carbamatos (SALISBURY et al., 1941). Entre os açúcares, os mais utilizados em meios diluentes, com a finalidade de congelação de espermatozoides são frutose, lactose, sucrose, rafinose, manose e trealose, isoladamente ou em combinações de dois ou três deles (AMANN; PICKETT, 1987).

Os crioprotetores são classificados em extracelulares (não penetrantes) ou intracelulares (penetrantes) (ALVARENGA et al., 2005). Os não penetrantes são representados por moléculas de alto peso molecular, como açúcares, lipoproteínas da gema de ovo ou lecitina de soja, proteínas do leite e alguns aminoácidos (AIRES et al., 2003), as quais aumentam a osmolaridade do meio extracelular promovendo a saída de água da célula espermática e reduzindo, assim, a formação intracelular de cristais de gelo durante a congelação (GONZALEZ, 2004).

Os intracelulares penetram na membrana por difusão passiva, permanecendo no citoplasma, mas também atuam externamente no espermatozoide, de forma semelhante aos agentes não penetrantes criando um meio hipertônico que induz a saída de água das células espermáticas por osmose, (PURDY, 2006). Bons resultados foram obtidos com o

glicerol, como crioprotetor para congelação de células espermáticas de aves, e na congelação do sêmen bovino (POLGE et al., 1949).

O processo de estabilização realizado pelo glicerol, na membrana plasmática das células espermáticas, se explica através de ligações dos átomos de hidrogênio, dos grupos hidroxila do glicerol com os átomos de oxigênio dos grupos fosfatos dos fosfolipídios da membrana plasmática (KUNDU et al., 2000). Resultados superiores foram descritos por Davis et al. (1963) e Foote (1998), ao adicionarem o glicerol aos diluentes a base de Tris-gema de ovo em espermatozoides bovinos congelados e descongelados. Por apresentar tais características, o glicerol tornou-se o componente de diluidor mais utilizado em todo o mundo para criopreservação de espermatozoides de touro e de várias outras espécies (IRITANI, 1980).

O uso do diluidor Tris-gema, em relação ao diluidor à base de leite, apresentou melhores resultados em termos de proteção da membrana plasmática, manutenção da atividade mitocondrial e integridade de cromatina das células espermáticas (KARABINUS; EVENSON; KAPROTH, 1991). Normalmente, há um melhor efeito crioprotetor em diluidores à base de gema de ovo, por isso é considerado o diluidor que melhor protege a célula espermática do choque frio (WATSON, 1981). Purdy (2006) obteve melhores taxas de fertilização em ovelhas, com o uso do diluidor comercial Triladyl<sup>®</sup>, em gema de ovo, quando comparado aos diluidores à base de lactose e sacarose.

Sabe-se que o leite de vaca também pode ser utilizado como diluente de criopreservação por apresentar fontes de lipídios e lipoproteínas semelhantes à gema de ovo (DEJARNETTE et al., 2000). Diversos meios, utilizando leite integral homogeneizado, leite desnatado fresco ou reconstituído, além da água de coco, vêm sendo utilizados para a preservação do sêmen, embora a gema de ovo prevaleça como o componente mais utilizado para essa finalidade (AMIRAT et al., 2005).

Demonstrou-se também que a caseína presente no leite, minimiza a perda de lipídios na membrana plasmática durante os procedimentos de criopreservação, aumentando assim a proteção espermática durante a refrigeração e a congelação/descongelação, porque atua da mesma forma que os diluidores à base de gema de ovo na criopreservação (BERGERON et al., 2007).

Griffin (2004) relatou o interesse de minimizar a possibilidade de crescimento microbiano como uma das etapas mais importante na prevenção das enfermidades



reprodutivas transmitidas através do sêmen, justificando, desta forma, a utilização de antibióticos nos meios de criopreservação. Esses antimicrobianos vêm sendo utilizados isoladamente ou em associações, garantindo o controle do crescimento de patógenos que naturalmente são favorecidos pelos constituintes presentes nos diluentes, como é o caso da gema de ovo ou leite.

### **2.3.1. Gema de ovo**

As lipoproteínas de baixa densidade (LDL) da gema de ovo, particularmente os fosfolípidios, são componentes efetivos na preservação e proteção dos espermatozoides contra o choque térmico (MOUSSA et al., 2002). Tais lipoproteínas protegem de várias maneiras os fosfolípidios de membrana durante o processo de criopreservação. Uma delas seria que essas LDLs fossem atacadas em maior quantidade pelas Espécies Reativas de Oxigênio (EROS), evitando a peroxidação dos fosfolípidios de membrana (THUN; HURTADO; JANETT, 2002).

As proteínas BSP (Bovine Seminal Plasma) representam em torno de 70% das proteínas totais presentes no plasma seminal dos bovinos, algumas proteínas do plasma seminal possuem importante papel na função espermática ao se ligarem aos lipídios da membrana plasmática (colesterol e fosfolípidios) e induzirem o efluxo desses componentes para que ocorra a capacitação celular (MANJUNATH; SAIRAM; UMA, 1987).

No entanto, a manutenção dessa ligação das BSP com os lipídios da membrana, pode prejudicar o processo de criopreservação de sêmen de bovinos, já que continuamente mantém essa remoção de colesterol que são importantes para proteção contra os danos do congelamento. Portanto, constatou-se que as associações das BSP com as proteínas do leite podem prevenir o efeito prejudicial da exposição prolongada do espermatozoide ao plasma seminal (MANJUNATH; THÉRIEN, 2002; MENEZES et al., 2016).

Estudos demonstram que as LDL presente na gema de ovo se ligam as BSP, com grande afinidade de ligação entre as moléculas. Manjunath et al. (2002) observaram que uma única molécula de LDL pode se ligar em 240 a 555 moléculas de proteínas-BSP, o que faz dos diluidores à base gema de ovo o melhor produto para a criopreservação de sêmen bovino. Aurich (2005) e Amann e Graham (2011) constataram que as lipoproteínas presentes na gema de ovo atuam na estabilização da membrana espermática, por meio de ligações destas com as proteínas presente nas BSP, propiciando neutralização na

membrana, diminuindo assim, o efeito de ligação entre as BSP com lipídios da membrana plasmática (colesterol e fosfolipídios).

Amplamente empregada como agente crioprotetor não permeável (MOUSSA, et al., 2002), a proporção de gema de ovo utilizada nos diferentes diluidores pode variar em média, entre 15% a 30% do volume total dos meios de criopreservação (VISHWANATH; SHANNON, 2000). Ainda que o mecanismo de proteção conferido ao sêmen pela gema de ovo não seja totalmente conhecido (MEDEIROS et al., 2002), diversos trabalhos indicam que as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) sejam as grandes responsáveis por propiciar essa resistência ao choque frio (HOLT, 2000; MOUSSA et al., 2002; VISHWANATH; SHANNON, 2000).

Apesar da eficiência comprovada do efeito do diluidor à base de gema de ovo sobre a qualidade espermática e da possibilidade de pasteurização desse produto, sua substituição por um produto que não seja de origem animal seria o mais indicado (VAN WAGTENDONK- DE LEEUW et al., 2000).

### **2.3.2. Caseinato de sódio**

O leite é constituído de 3,3 a 3,5% de proteínas totais, das quais em torno de 20% são oriundas do soro (DE KRUIF; HOLT, 2003). As proteínas do leite podem ser classificadas em quatro grupos, de acordo com as suas propriedades físico-químicas e estruturais. Entre essa classificação destacam-se as caseínas, que representam 80% das proteínas presentes no leite bovino (LOURENÇO, 2000; DE KRUIF; HOLT, 2003).

As caseínas são classificadas como fosfoproteínas que, em sua forma natural, apresentam-se formando agregados ou partículas (micelas) contendo as caseínas  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  e  $\beta$ , em sua parte central, juntamente com fosfato de cálcio coloidal e na superfície do corpo da micela encontra-se a caseína  $\kappa$ , conferindo-lhe estabilidade físico-química (LOURENÇO, 2000; DALGLEISH, 2011). Portanto, quase a totalidade das proteínas do leite está agrupada em forma de micelas, sendo essa estrutura responsável por permitir a manutenção da estabilidade térmica (FOX; BRODKORB, 2008). A caseína possui como função primária, o transporte de cálcio, fosfato e de proteína ao lactante (DE KRUIF; HOLT, 2003), além de evitar o processo de calcificação do tecido mamário (SMYTH et al., 2004).

O leite apresenta-se como emulsão líquida, em que a fase contínua é formada de água e substâncias hidrossolúveis, ao passo que a fase interna ou descontínua é formada,

principalmente, por micelas de caseína e de glóbulos de gordura. Contudo, verifica-se que a variação na composição dessas substâncias, no leite, indica a necessidade de padronização (SGARBIERI, 1996; BATELLIER et al., 1997). Bergeron e Manjunath (2007), utilizando as frações do leite em suas pesquisas, constataram que os glóbulos de gorduras não seriam os responsáveis pela proteção das células espermáticas, e sim a caseína.

O fosfocaseinato destacou-se entre os vários compostos presentes no leite, apresentando melhor resultado no processo de criopreservação, pela sua capacidade de proteger a membrana plasmática por causa da sua forte ligação com os íons de  $\text{Ca}^{++}$  (HOCHACHKA, 1986; PAGL et al., 2006). As caseínas também sequestram o cálcio para manter sua estabilidade interna (COUTINHO DA SILVA et al., 2012). Essa ligação forte entre os íons de  $\text{Ca}^{++}$  retardou a capacitação espermática precoce. O processo de obtenção das frações do leite, a partir do leite cru, ocorreu proveniente de fervuras, microfiltração e ultrafiltração, tendo como produto final o fosfocaseinato nativo, subdividido em quatro frações (caseína  $\alpha$ ; caseína  $\beta$ ; caseína  $\kappa$ ; fração rica em fosfolípidios), e as proteínas solúveis ( $\alpha$  lactoalbumina;  $\beta$  lactoglobulina) (BATELLIER, 1997).

Batellier (1997) descreve a obtenção do caseinato de sódio, tendo como base o leite cru, submetido a um processo de precipitação, a partir da alteração do pH. Inicialmente, a acidificação pelo ácido clorídrico (HCl) e posterior elevação do pH por meio de solução básica de hidróxido de sódio (NaOH). O caseinato de sódio é o produto desse processo que poderá originar também o macro peptídeo de caseína a partir da proteólise por coalho.

Em pesquisa de avaliação comparativa com meios contendo proteínas solúveis (originada do leite cru), fosfocaseinatos nativos e um meio em que adicionou-se caseína  $\beta$  a um meio base contendo solução de sais de Hank's, glicose e lactose, com a finalidade de testar qual desses meios conferiu a melhor proteção as células espermáticas, constatou-se que o fosfocaseinato nativo possuiu a melhor capacidade protetora. Porém, o caseinato de sódio apresentou resultados similares ao fosfocaseinato nativo no processo de refrigeração por 96 horas (BATELLIER, 1997).

O mecanismo de proteção da caseína sobre a célula espermática não está totalmente elucidado, mas como foi verificado por diversos autores, a principal ação seria a interação das BSPs com as caseínas, a partir de ligação entre elementos proteicos. Já a

interação dos diluidores a base de gema de ovo com as BSPs se dá através das lipoproteínas de baixa densidade (LDL). Constatou-se ainda, a existência de diversas isoformas de BSPs no ejaculado, entre as várias espécies de mamíferos, em especial na espécie bovina (BERGERON; MANJUNATH, 2007).

Na criopreservação das células espermáticas, a forma de atuação das caseínas é bastante similar à gema de ovo, à medida que atuam reduzindo a ligação das proteínas do plasma seminal com os espermatozoides (BERGERON et al., 2007), propiciando menor perda de lipídio da membrana plasmática durante o procedimento de criopreservação, induzindo à estabilização e a proteção espermática durante a refrigeração e a congelação/descongelação. Entretanto, os mecanismos de atuação entre os dois compostos são distintos, ou seja, o efeito protetor do leite sobre a célula espermática envolve proteínas ao invés de lipídios (BERGERON et al., 2007; AMANN; GRAHAM, 2011). Uma vez que, as proteínas BSP de bovinos, associam-se a proteínas do leite (PLANTE et al., 2015).

A relação entre o tempo e a concentração de BSPs, na estocagem, pode atuar desestabilizando a membrana plasmática, devido ao efluxo de colesterol e fosfolipídios (MANJUNATH, 2012). Entretanto, as BSPs expressam a grande proporção de um ejaculado, estando envolvidas em processos fundamentais com a fertilidade do sêmen, a capacitação espermática e formação do reservatório espermático (EKHALASI-HUNDRIESER et al., 2005; MANJUNATH, 2012).

O meio diluidor contendo o caseinato de sódio propiciou maior capacidade de ligação das células com a zona pelúcida (ZP), o que é desejável para se obter boa fertilização. Entre os diluentes à base da proteína do leite, melhores resultados vêm sendo demonstrados pela caseína. Em um experimento com suínos, a caseína reduziu os danos gerados pela criopreservação, retendo colesterol, reduzindo a atividade das caspases e mantendo a integridade do DNA (COUTINHO DA SILVA, et al., 2012). Também em trabalho de fertilização *in vitro*, a suplementação com caseína elevou a taxa de clivagem (TATEMOTO et al., 2015).

#### **2.4.Mudanças nos parâmetros espermáticos decorrentes do processo de criopreservação**

O funcionamento completo das células espermáticas criopreservadas e descongeladas vai depender da integridade de todos os seus componentes e funções.

Portanto, a viabilidade celular está correlacionada a fatores estruturais, físicos, morfológicos, bioquímicos e metabólicos dos espermatozoides (GRAHAM et al., 1980).

O caráter móvel dos espermatozoides é uma variável de fácil avaliação e pode determinar com segurança seu estado fisiológico (CONTRI et al., 2010). A motilidade espermática é um teste funcional, que demonstra o status energético do espermatozoide, necessário para a penetração na junção útero-tubárica, durante a fecundação (QUINTERO-MORENO et al., 2004). Ferreira (2000) demonstrou que os parâmetros de motilidade são representantes fidedignos da qualidade espermática em amostras seminais congeladas.

Alterações na cinética dos espermatozoides podem acontecer por transtornos afuncionais das mitocôndrias, lesões na membrana plasmática ou por danos produzidos por choque frio (KIRK, 2001). O decréscimo da motilidade como um dos danos causados pela criopreservação acarreta em queda de fertilidade (OEHNINGER et al., 2000). Blotner et al. (2001), também demonstraram que ocorrem mudanças na linearidade e hiperatividade dos espermatozoides, em virtude das alterações provenientes da criopreservação.

A integridade da membrana plasmática é uma condição necessária para a viabilidade das células espermáticas, principalmente, quando são submetidas a processos de congelação e descongelação (PARKS; GRAHAM, 1992; HARRISON, 1997; HOLT; MEDRANO, 1997), e pode ser avaliada com a utilização de corantes fluorescentes supravitais (ALTHOUSE; HOPKINS, 1995; GRAVANCE et al., 2001). A congelação ocasiona modificações biofísicas e bioquímicas na membrana plasmática espermática, levando à diminuição da viabilidade, integridade de membrana, funções espermáticas e, conseqüentemente, do potencial de fertilidade desta célula (BUCAK et al., 2010).

No processo de criopreservação, os lipídios da membrana passam de um estado fluido, no qual as cadeias de ácidos graxos são relativamente desorganizadas, para um estado de gel, em que as cadeias dos ácidos graxos são rígidas e paralelas. O desarranjo na arquitetura da membrana promove desorganização na assimetria da bicamada lipídica e na sua interação com as proteínas, devido ao choque térmico, determinando alterações nos receptores de membrana e nas suas funções, comprometendo a capacidade fecundante dos espermatozoides (AMANN; GRAHAM, 1993).

A fertilização tem como passo essencial a reação acrossomal, sendo este, portanto, um parâmetro importante para caracterizar a viabilidade espermática e prever a fertilidade

do sêmen (BLOTTNER et al., 1990; FENICHEL, 1995). Verificou-se em equinos que os principais defeitos estavam associados às alterações acrossomais, principalmente durante a criopreservação do sêmen (BLOTTNER et al., 2001).

Donnelly et al. (2000), constataram relação entre os marcadores de apoptose e a fragmentação do DNA dos espermatozoides. Essa condição pode promover alteração na capacidade fecundante ou ocasionar alterações no desenvolvimento embrionário (HENKEL et al., 2004; SACKKAS; ALVAREZ, 2010). Em algumas espécies, como no caso da equina, foi constatada correlação entre o nível de fragmentação de DNA e a fertilidade (KENNEY et al., 1994). Estudos realizados por Blottner et al. (2001) e Celeghini (2005) concluíram haver baixa alteração nos níveis de fragmentação de DNA decorrente da criopreservação nos espermatozoides equinos e bovinos.

As injúrias na célula espermática, decorrentes de um processo de criopreservação, propiciam o aparecimento do estresse oxidativo no espermatozoide, sendo a produção anormal de espécies reativas de oxigênio (EROS) ocasionada pela peroxidação lipídica da membrana espermática (MAXWELL; WATSON, 1996; CHATTERJEE et al., 2001). Relatou-se que, as condições de congelamento durante a estocagem, promovem a indução de apoptose devido à peroxidação lipídica e a oxidação dos aminoácidos aromáticos nos espermatozoides, além da perda da motilidade espermática (MAXWELL; WATSON, 1996; BUCAK et al., 2010).

Avaliando-se pelo número de espermatozoides móveis entre o sêmen fresco e o congelado, o primeiro apresenta maior taxa de fertilidade. Possivelmente, esse decréscimo na fertilidade seja proveniente, principalmente, o abaixamento da temperatura durante o processo de criopreservação, do efeito osmótico na formação de cristais de gelo e por fim pela toxicidade dos crioprotetores (WATSON, 2000).

## **2.5. Avaliação do espermatozoide bovino**

A funcionalidade celular e a predição do seu potencial de fertilidade são descritos como objetivos principais da avaliação da célula espermática (AMANN; HAMMERSTEDT, 1993). Assim, boa amostra seminal deve manter sua capacidade fertilizante, juntamente com as características mínimas de concentração, motilidade, morfologia adequada, integridade de membranas plasmáticas e acrossomal, atividade mitocondrial e integridade de material genético (WALLACE, 1992).

Portanto, boa motilidade é considerada como componente central para a qualidade

mínima aceitável da amostra seminal. Assim sendo, a avaliação computadorizada da motilidade é um exame de grande importância devido ao fato de a cinética celular apresentar relevância na determinação do potencial de fertilidade da amostra espermática (CENTOLA, 1996; HOLT et al., 1997; JANUSKAUSKAS; ZILINSKAS, 2002). Os potenciais da atividade mitocondrial, juntamente com a integridade estrutural das membranas, exercem um papel fundamental na fertilização (KATO et al., 2001). Portanto, avaliar esses parâmetros, assegura o estudo das estruturas e das funções espermáticas (BAILEY; BILODEAU; CORMIER, 2000).

A integridade das membranas plasmática e acrossomal do espermatozoide exerce papel fundamental na manutenção da fertilidade, e na sobrevivência celular no trato genital da fêmea. Além de serem responsáveis por propiciar o equilíbrio osmótico e a penetração na zona pelúcida (PARKS; GRAHAN, 1992; SQUIRES et al., 1999). Existem técnicas contemporâneas mais avançadas e até coloração mais simples e antiga, com a finalidade de promover a avaliação da integridade das membranas plasmática, acrossomal e atividade mitocondrial.

No grupo das técnicas contemporâneas, destaca-se a citometria de fluxo, e dentre as técnicas mais antigas, encontra-se o uso da coloração com eosina/nigrosina, tornando possível a verificação da manutenção de seletividade da membrana plasmática e consequentemente sua integridade (BARTH; OKO, 1989). Além disso, a integridade acrossomal e atividade mitocondrial podem ser avaliadas, respectivamente, pela utilização dos corantes *fastGreen/rosa bengala* e 3,3'-diaminobenzidina (DAB), este último, sendo um ensaio citoquímico para demonstração qualitativa e quantitativa da atividade da enzima Citocromo C-oxidase (CCO), enzima da cadeia respiratória, responsável pela produção de energia espermática (HRUDKA, 1987; POPE; ZHANG; DRESSER, 1991).

O marcador mais objetivo da função espermática é o DNA, por possuir importância vital sobre a célula juntamente com os outros parâmetros como a morfologia (RAJESH et al., 2002). Segundo Karabinus, Evenson e Kaproth (1991), o processo de criopreservação propiciou alteração na cromatina espermática diminuindo sua área de superfície. Um dos diversos ensaios utilizados para a avaliação do DNA espermático é o *Sperm chromatin structure assay* (SCSA), responsável pela determinação qualitativa da integridade da cromatina espermática, definida pela suscetibilidade do DNA à desnaturação ácido-induzida *in situ* (LARSON et al., 2000).

A capacidade fertilizante do espermatozoide pode ser altamente afetada pela degradação peroxidativa dos ácidos graxos poli-insaturados, o que leva à formação de produtos finais tóxicos como o 4- hidroxilnonenal e o malondialdeído (MDA) (JONES; MANN; SHERINS, 1979). Portanto, a estratificação do quantitativo final da peroxidação lipídica dessa degradação pode ser considerada técnica rotineira de avaliação espermática, uma vez que se constatou a existência de correlação negativa entre as altas concentrações de MDA com a motilidade espermática, e o sucesso no teste de penetração em oócito de hamster (AITKEN; BUCKINGHAM; HARKISS, 1993).

Na realidade, há grande relevância na aplicação dos testes supracitados. Contudo, para confirmar a qualidade do sêmen, o teste de fertilidade é decisivo e é realizado a campo ou pela utilização da técnica de produção *in vitro* de embriões.

## **2.6. Análise computadorizada do movimento espermático**

A avaliação computadorizada da cinética espermática tornou-se importante ferramenta de diagnóstico das condições de viabilidade do sêmen, e que permite, entre outros parâmetros, antecipar informações a respeito da provável fertilidade das amostras para uso em IAs (CRESPILHO et al., 2009). Novas técnicas de avaliação do sêmen bovino foram desenvolvidas e incrementadas principalmente nas últimas décadas, mas poucas delas foram de fato colocadas nas rotinas de trabalho (JANUSKAUSKAS; ZILINSKAS, 2002) como a utilização da análise computadorizada do movimento espermático (CASA), umas das principais técnicas de apreciação do potencial de fertilidade do sêmen (MAZIERO et al., 2009).

Essa análise permite gerar informações relevantes, principalmente quando se compara com outras ferramentas de análise, como no caso da microscopia de luz. Apresenta-se como técnica mais objetiva, permitindo um número maior de análises e menores equívocos quanto à subjetividade que estão tão presentes na microscopia de luz. Além de fornecer elementos robustos, frente à avaliação da cinética individual das células (JANUSKAUSKAS; ZILINSKAS, 2002). Permite também melhor identificação e mapeamento dos agregados seminais (subpopulações) em amostra de sêmen (VERSTEGEN et al., 2002).

A importância da cinética celular não está apenas no tipo de movimento, e sim no que ele pode refletir indiretamente como a atividade metabólica (GIL et al., 2003) e diretamente na propriedade da cinética presente na amostra seminal (FARREL et al.,



1996).

A característica do movimento constitui-se em da um grande elemento de referência para que se possa associá-la ao potencial de fertilização da amostra, e permitir estabelecer a diferença entre a ausência de movimento e os quadros de infertilidade (OLDS-CLARKE, 1996). Ainda que a avaliação computadorizada seja uma das ferramentas existentes para se aferir a possível capacidade da amostra seminal, existe inconsistência quanto sua correlação com os índices de concepção animal de modo isolado. Visto que, a avaliação da cinética funciona como relevante ferramenta para que se tenha apenas maior previsibilidade de êxito na fertilização do ovócito (GRAHAM; MOCÉ, 2005; MAZIERO et al., 2009).

## **2.7 Integridade de membrana plasmática (IMP)**

O processo de fertilização está intimamente relacionado com a IMP. Entretanto, o processo de criopreservação pode promover danos à membrana espermática que acarretará queda significativa da viabilidade (PAPA et al., 2000).

Grande vulnerabilidade foi constatada, em decorrência do processamento de criopreservação, resultando na ruptura e desestabilização das membranas espermáticas e da falta de atividade reparadora de crescimento e de divisão, porque os espermatozoides são desprovidos de atividade biossintéticas (YOSHIDA, 2000).

Para determinar a IMP, têm sido empregados vários testes de coloração, testes hiposmóticos e, mais recentemente, o uso das sondas fluorescentes, que atuam através de reações com enzimas citoplasmáticas ou de ligação com o DNA espermático (ARRUDA et al., 2003; BRITO et al., 2003).

A técnica mais estudada e utilizada na determinação da IMP é citometria de fluxo, devido aos dados quantitativos gerados sobre a permeabilidade relativa das membranas, conferindo especificidade na diferenciação entre células funcionais e afuncionais (MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, 2003).

As novas técnicas que utilizam as sondas fluorescentes vêm ganhando importância por sua característica de marcar estruturas específicas das células, principalmente certas formas de anormalidades morfológicas, nos espermatozoides, em decorrência da translocação de fosfatidilserina promovida em virtude da criopreservação. Possibilitando assim, avaliar a criocapacitação e os vários compartimentos celulares ao mesmo tempo

(CELEGHINI, 2005; DHURVEY et al., 2012).

A integridade da membrana plasmática e acrossomal é geralmente avaliada empregando-se corantes impermeáveis às membranas íntegras ou sondas acetiladas que, por isso, se tornam permeáveis. Imediatamente após penetração da sonda, ocorre sua desacetilação reassumindo o caráter impermeável à membrana íntegra, por esse motivo irá ficar retido em células espermáticas viáveis (SILVA; GADELLA, 2006). Como exemplo, pode ser citada a sonda Diacetato de carboxifluoresceína (CFDA), que, quando observada em microscópio de fluorescência, cora as células viáveis de verde. Essa sonda pode ser usada em associação com o Iodeto de propídeo (PI). Dessa forma, aquelas células ditas não viáveis são observadas na cor vermelha (DHURVEY et al., 2012).

## **2.8 Integridade de membrana acrossomal**

O complexo de Golgi, organela citoplasmática que dará origem ao acrossomo, é constituído por dobras de membrana e vesículas, caracteriza-se por apresentar enzimas hidrolíticas (RAMALHO-SANTOS et al., 2002). A junção dos espermatozoides com a região da zona pelúcida do oócito denominada glicoproteína 3 (ZP3) (FLORMAN et al., 2008), promoverá a reação acrossomal, processo pelo qual ocorre liberação e ativação das enzimas do acrossomo acompanhado de hiperatividade da motilidade espermática que confere ao espermatozoide a habilidade para penetrar na ZP e realizar a sigamia (HONDA et al., 2002). Portanto, a integridade do acrossoma é de grande relevância, uma vez que, qualquer lesão prematura no acrossoma durante o processamento do sêmen ou durante o trajeto espermático pelo trato reprodutor feminino pode originar falhas no processo de fertilização e, conseqüentemente, queda na fertilidade do sêmen (SILVA; GADELLA, 2006).

A reação acrossomal, sendo um processo resultante da fusão das membranas acrossomais, é de grande importância para se diagnosticar o grau de sensibilidade aos processos de refrigeração e congelação em relação aos outros domínios da membrana dos espermatozoides. Desse modo, o processo *in vitro* pode servir de prognóstico quanto à qualidade do sêmen bovino, principalmente depois de mensurada a capacidade dos espermatozoides em reagir à estimulação para reação acrossomal por meio do número de clivagens (GRAHAM, 2001).

O processo de capacitação caracteriza-se pelo efluxo do colesterol presente na membrana plasmática que está associado com ativação das vias de transmissão de sinais

(FLESCHE; GADELLA, 2000). Entretanto, as lipoproteínas de alta densidade juntamente com as albuminas presentes no fluido uterino e folicular são responsáveis por promover o efluxo de colesterol, permitindo incrementar a permeabilidade da membrana plasmática para vários íons, tais como cálcio e bicarbonato afetando as moléculas de sinalização (NAZ; RAJESH, 2004; NISHIGAKI et al., 2014).

Acontecimento imprescindível para que ocorra a capacitação e reação acrossomal é o aumento do cálcio intracelular que está associado a ativação da adenilato-ciclase (AC) que promove ativação das proteínas quinase do tipo A, responsáveis pela fosforilação de determinadas proteínas em resíduo de tirosina (FLESCHE; GADELLA, 2000). Outro mecanismo associado a capacitação é a fosforilação de proteínas que converte (difosfato de adenosina) ADP em ATP pela adição do grupo fosfato. Esse mecanismo é considerado como sendo um dos principais na regulação da célula e no ajuste dos receptores e modulação iônica, resultando em ativação ou inativação celular (PAWSON, 2004).

A integridade da membrana do acrossomo pode ser avaliada por meio de combinação de sondas fluorescentes como o isotiocianato de fluoresceína (FITC) associado a aglutininas como a do *Ricinus communis* (RCA) e *Psium sativum* (PSA), o que permite a ligação às glicoproteínas específicas da membrana acrossomal, propiciando, desse modo, a visualização das estruturas sob microscopia de epifluorescência ou citometria de fluxo (CELEGHINI et al., 2008).

## **2.9. Avaliação do estresse oxidativo**

As substâncias químicas altamente reativas, formadas por meio de oxirredução das moléculas de oxigênio, são denominadas de espécies reativas ao oxigênio (EROS). A formação se dá em presença de oxigênio que irá reagir com radicais livres, formando o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), produto primário do sistema de geração de EROS (HALLIWELL, 1991). Durante o processo de refrigeração das células espermáticas ocorre a queda na motilidade e na capacidade de fertilização de modo irreversível, em razão principalmente pelo comprometimento na integridade da membrana plasmática, acrossomal e mitocondrial (RAPHAEL et al., 2008).

Um dos principais indicadores responsáveis pelo decréscimo na viabilidade do sêmen submetido ao processo de criopreservação é a produção de EROS, oriundas da reação catalizadora primária dos espermatozoides mortos presentes em solução (NAIR et al., 2006). Entretanto, a síntese de EROS pode ser originada de outros processos

fisiológicos do metabolismo espermático e é inevitável nas condições de aerobiose ou microaerobiose, comuns na conservação do sêmen (VISHWANATH; SHANNON, 2000).

O ânion  $O_2^-$  é formado na membrana mitocondrial localizado na peça intermediária do espermatozoide de modo espontâneo por meio do metabolismo energético espermático. Demonstra ser o precursor do sistema de formação das EROS, porém pouco reativas, caracteriza-se por não penetrar a membrana lipídica atuando apenas no local onde é produzida. O processo não se encontra totalmente elucidado, contudo acredita-se que a formação  $O_2^-$  atue na enzima adenilato ciclase (2º mensageiro) que, uma vez quando estimulada, produz o AMPc que ativa as proteínas quinases dependentes no processo de fosforilação inibindo ou ativando determinadas alterações celulares essenciais para a capacitação e reação acrossomal, estando, portanto, relacionado com a quantificação da concentração de EROS produzida (FLESCH; GADELLA, 2000; O'FLAHERTY; LAMIRANDE; GAGNON, 2006).

O superóxido serve de base para a conversão em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) por meio da ação da enzima superóxido dismutase (SOD) (MAIA; BICUDO, 2009; ANDRADE et al., 2010). Pesquisas evidenciaram que há inibição da capacitação após a adição de superóxido dismutase ao sêmen, demonstrando importância das EROS na capacitação espermática e reação acrossomal (O'FLAHERTY et al., 1999). As enzimas catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) se integram para impedir o acúmulo de  $H_2O_2$ , que apesar de não ser um radical livre é precursor, quando em desequilíbrio, para formar radical hidroxila ( $OH^-$ ) (BARBOSA et al., 2010). Portanto, o  $H_2O_2$ , poderá sofrer redução de metais de transição (ferro  $Fe^{+2}$  ou cobre  $Cu^+$ ) e formar ( $OH^-$ ) que é de curta duração e muito energético, considerado como a EROS que causa mais danos aos sistemas biológicos devido a sua alta reatividade com biomoléculas (ANDRADE et al., 2010). Este radical pode ser formado por duas reações denominadas reação de Fenton e Haber-Weiss (SIKKA, 2001)

O estresse oxidativo é originado da produção excessiva de EROS que pode acarretar lesões estruturais às *biomoléculas*, DNA, lipídios, carboidratos e proteínas (NICHI et al., 2006). Entre as EROS produzidas, as mais deletérias são os ânions  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  e os radicais hidroxila  $OH^-$ , cuja maior produção ocorre no sêmen bovino quando exposto a temperatura ambiente (VISHWANATH; SHANNON, 2000). O processo de criopreservação minimiza a produção desses radicais, mas a refrigeração não evita lesões

de membrana plasmática e acrossomal, como observado com sêmen de garanhão mantido por 48h a 5°C, além da maior proporção de peroxidação de lipídios (RAPHAEL et al., 2008).

No processo de criopreservação das células espermáticas, o choque frio e a atmosfera de aerobiose, são circunstâncias que favorecem o aumento na peroxidação lipídica (LPO). Isso ocorre pela presença de ácidos graxos poliinsaturados na membrana espermática, comprometendo de modo efetivo os procedimentos de criopreservação, e, por conseguinte, redução da eficiência na IA (NAIR et al., 2006).

As altas produções de EROS foram associadas à implicação fisiopatológica de diversos problemas orgânicos (BAFANA et al., 2011), bem como na associação com oligoastenozoospermia e pouco potencial fertilizante do sêmen humano (ZINI; LAMIRANDE; GAGNON, 1993). Murawski et al. (2007) constataram a relação entre a quantidade de EROS com a capacidade fertilizante do sêmen humano. Nesse estudo, verificou-se que quantidade grande de EROS estava presente em 40% dos homens inférteis enquanto em homens férteis essa quantidade foi quase nula. Portanto, o estresse oxidativo está entre as principais causas de infertilidade em humanos (AGARWAL et al., 2014), o que pode ser também aplicado a outras espécies de mamíferos.

#### **2.10. Teste de fertilidade – Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF)**

Os progressos da IA são patentes, por tratar-se de importante biotécnica utilizada com a finalidade de difundir genética superior (SUGULLE et al., 2006), e conseqüentemente melhoria na produtividade e na reprodução animal, além de propiciar o acasalamento direcionado e favorecer a velocidade no ganho genético entre gerações (BARUSELLI et al., 2004). O incremento desses parâmetros permite ter relação custo benefício bastante interessante, uma vez que se obtém genética de animais melhorados, que agregam eficiência na produtividade, por um custo aceitável (VASCONCELOS; SÁ FILHO, 2010).

O grande avanço da IA está relacionado diretamente ao desenvolvimento de novas técnicas de criopreservação, de manejo dos reprodutores e na melhoria das condições nutricionais. Entretanto, ainda é comum observar perdas na detecção do cio em vacas, que resultam em perdas econômicas consideráveis, uma vez que um ciclo reprodutivo é perdido. Nesse contexto, o resultado da IA pode ser prejudicado, acarretando em perdas na eficiência da técnica, e, por conseguinte, perdas na eficiência reprodutiva

(BARUSELLI et al., 2004). Um significativo avanço no entendimento da fisiologia neuroendócrina da fêmea bovina propiciou a compreensão sobre a forma de atuação dos hormônios utilizados em diversos protocolos, para controlar o crescimento folicular e o momento da ovulação, eliminando a observação de cio e viabilizando a IATF (THATCHER et al., 2001).

A intervenção farmacológica, proposta pelos diversos protocolos de IATF, pode atuar em várias fases do ciclo reprodutivo, e a estratégia a ser utilizada dependerá do objetivo a ser alcançado. As formas mais comuns de atuação farmacológica, nos ciclos reprodutivos, são através da utilização de prostaglandina, a inibição da ovulação através do dispositivo intravaginal contendo progesterona (P4) e a indução das ondas foliculares de emergência e sincronização da ovulação com aplicação de ésteres de estradiol (PURSLEY; MEE; WILTBANK, 1995).

Os protocolos IATF vêm se aprimorando com a introdução de novos fármacos e, são de fato, a prática mais adequada para se otimizar a IA (SÁ FILHO et al., 2010). A grande vantagem da IATF frente a IA convencional está no volume de animais inseminados após o tratamento hormonal, além de propiciar um melhor manejo e concentração das parições (MADUREIRA, 2000).

Em 2015, acredita-se que o percentual de matrizes inseminadas foi em torno de 12% do total de matrizes do rebanho nacional (ASBIA, 2015). Acredita-se que 77% desse total utilizaram a IATF (10,5 milhões), calcula-se que o volume se divide em 8,2 milhões de fêmeas de corte e 2,3 milhões de fêmeas de aptidão leiteira. Tal adesão dá-se pela dificuldade de detecção de cio nessas matrizes e pelo maior percentual de matrizes em anestro. O menor percentual em vacas leiteiras possivelmente esteja associado ao manejo diário, o que facilita a observação de cio. Estima-se que a cadeia de comercialização de protocolos de IATF tenha movimentado, em 2015, algo em torno de 567 milhões de reais, desde a comercialização do sêmen até o uso dos fármacos para realização dos protocolos de sincronização de cio. (BARUSELLI, 2015). Assim, este cenário de crescimento e de evolução põe o Brasil como sendo o maior mercado de IATF do mundo (MORGAN, 2015).

A associação de progestágenos com o estrógeno, no início do protocolo, representa o método mais utilizado para a IATF em bovinos na América do Sul (MENEGETTI et al., 2009), ocasionando redução dos níveis circulantes de FSH e LH, induzindo a atresia dos folículos dominantes (BARUSELLI et al., 2004; MADUREIRA,

2000), e promovendo sincronização de nova onda folicular (DUFFY et al., 2004). As características dos progestágenos vão além da sua aplicação em protocolos de IATF, a proporção que apresentam função terapêutica no restabelecimento da ciclicidade pós-parto (BARUSELLI et al., 2004; DAY, 2004).

O sucesso da IATF reside na previsibilidade do momento da ovulação, que é conseguido com fármacos indutores, como os estrógenos ou GnRH, que agem no lobo anterior da hipófise estimulando a liberação do LH armazenado, cuja atuação se dá nas células da granulosa em receptores específicos, desencadeando o processo ovulatório (BARUSELLI et al., 2004).

Variações na sequência de administração dos hormônios têm contribuído para a obtenção de melhores resultados de sincronização em protocolos de IATF, como no emprego de estradiol e eCG concomitantemente à remoção do progestágeno (KASTELIC et al., 1999). Em razão da similaridade de efeito biológico entre eCG, FSH e LH no processo de maturação, crescimento folicular e ovulação do folículo dominante, seu emprego tem-se justificado, parcialmente porque induz a liberação pré-ovulatória de LH e ovulação (SÁ FILHO et al., 2010).

No teste de fertilidade em éguas, a taxa de prenhez foi mantida, ou superior ao grupo controle utilizando diluidores à base de caseinato de sódio. Entretanto, no sêmen refrigerado o diluente à base de leite desnatado se mostrou mais favorável do que o diluente a base de caseinato de sódio no tempo de 24 horas. Contudo, relata-se por alguns autores um incremento propiciado pelos diluentes à base de caseinato de sódio em comparação ao diluente à base de leite no teste de fertilidade (GUTHRIE; WELCH, 2006; PUGLIESI et al., 2012; PAPA et al., 2014).

### **2.11. Teste de fertilidade – Produção *in vitro* de embriões (PIV)**

A participação do Brasil no cenário da produção *in vitro* de embriões, nos últimos 12 anos, está em torno de 85% da produção mundial e isso se dá principalmente pelo trabalho com raças zebuínas que proporcionam melhores resultados na PIV (VIANA et al., 2010).

No país, os primeiros embriões foram confirmados no início de 1993 (WATANABE et al., 1996). A produção de embriões *in vitro* apresenta características de produção em escalas bem definidas, que podem ser resumidas em três procedimentos: maturação *in vitro* (MIV), fecundação *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV). A evolução

do desenvolvimento embrionário termina no cultivo final, até a transferência ou a criopreservação, quando os embriões se encontram em estágio de blastocisto ou mórula, respectivamente (LU et al., 1987).

A união entre o espermatozoide com o complexo cúmulo oócitos dará início ao desenvolvimento embrionário e, conseqüente, à formação do blastocisto. As fases mais delicadas e complexas é a clivagem, que desencadeia as outras fases do desenvolvimento embrionário, passando pela ativação do genoma embrionário, divisão entre 8 e 16 células, compactação da mórula no dia 5, e por fim, a formação do blastocisto entre os dias 6 e 7 de desenvolvimento (LONERGAN et al., 2003).

O gameta masculino apresenta grande importância na fertilização e na conversão de oócitos em blastócitos, demonstrando a influência paterna no desenvolvimento embrionário (COMIZZOLI et al., 2000; WARD et al., 2001). Assim, qualquer artefato que promova alteração na capacidade de fusão dos gametas ou qualquer modificação no material genético acarretará alteração no início do desenvolvimento embrionário. Nesse aspecto, existem vários trabalhos relacionando à fertilidade do touro com a sua capacidade de fusão entre gametas (FAZELLI et al., 1993).

Alguns autores relatam haver diferenças entre os embriões produzidos pelas técnicas *in vitro* e *in vivo*. Dalvit et al. (2005), descreveram que embriões oriundos da PIV geram maior formação de espécies reativas de oxigênio (EROS), devido às elevadas concentrações de oxigênio e de gás carbônico provenientes dos gases liberados nas incubadoras. Contudo, os autores afirmam existir controvérsia com relação à quantidade mínima de EROS necessária para promover a maturação, fertilização e desenvolvimento embrionário *in vitro*.

Nesse sentido, constatou-se correlação negativa entre a quantidade de EROS e a taxa de fertilidade, mostrando, assim, a importância do monitoramento do EROS no processo de PIV (KODAMA; KURIBAYASHI; GAGNON, 1996). Por certo, a importância do diluente e do crioprotetor na preservação da célula espermática leva em conta a confecção de um meio diluente que preserve o espermatozoide, tendo como finalidade de combater a formação das EROS (LUVONI; KESKINTEPE; BRACKETT, 1996).

O processo de fertilização está relacionado com a capacidade de interação entre a célula espermática com a zona pelúcida do oócito. Esses processos de reconhecimento entre os gametas são bastante específicos. Entretanto algumas espécies, como no caso da



equina, são capazes de se ligar firmemente a ZP de oócitos bovinos. Assim sendo, promovem a reação acrossomal, penetram na ZP e se fundem com a ooplasma (SINOWATZ et al., 2003).

A capacidade de interação entre os espermatozoides equino com a ZP do oócito bovino foi avaliada utilizando diluente à base de proteína do leite na criopreservação espermática. Verificou-se ampliação de três a sete no número de ligações do espermatozoide com a ZP. Contudo, devido as diferenças entre as espécies, seria necessário replicar esse achado com intuito de constatar o aumento nas ligações nos indivíduos da mesma espécie. Esse achado pode colaborar na compreensão das interações entre os espermatozoides e a ZP, contribuindo em especial na fertilização *in vitro* em bovinos (COUTINHO DA SILVA, et al., 2012).

### 3 – Referências<sup>1</sup>

- AGARWAL, A.; VIRK, G.; ONG, C.; DU PLESSI, S, S. Effect of oxidative stress on male reproduction. **World J. Mens Health**, v. 32, p. 1-17, 2014.
- AIRES, V. A.; HINSCH, K. D.; MUELLER-SCHLOESSER, F.; BOGNER, K.; MUELLER-SCHLOESSER, S.; HINSCH, E. In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. **Theriogenology**, v. 60, p. 269-279, 2003.
- AITKEN, R. J.; BUCKINGHAM, D.; HARKISS, D. Use of a xanthine oxidase free radical generating system to investigate the cytotoxic effects of reactive oxygen species on human spermatozoa. **J. Reprod. Fertil.**, v. 97, p. 441-450, 1993.
- ALMEIDA, J. P. **Efeito de diferentes concentrações de plasma seminal na criopreservação de sêmen equino**. 2006. p. 77. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2006.
- ALTHOUSE, G. C.; HOPKINS, S. M. Assessment of boar sperm viability using a combination of two fluorophores. **Theriogenology**, v. 45, p. 595-603, 1995.
- ALVARENGA, M. A.; PAPA, F. O.; LANDIM-ALVARENGA, F. C.; MEDEIROS, A. S. L. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 89, p. 105-113, 2005.
- AMANN, R. P.; GRAHAM, J. K. Spermatozoal function. In: **Equine reproduction**. Oklahoma: 2010. p. 1053.
- AMANN, R. P.; GRAHAM, J. K. Spermatozoa function. In: MCKINNON, A. O.; VOSS, J. L. **Equine reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p. 715-745.
- AMANN, R. P.; GRAHAM, J. K. Spermatozoa function. In: MCKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L.; VAALA, W. E.; VARNER, D. D. **Equine reproduction**. 2. ed. Philadelphia: Wiley-Blackwell, 2011. p. 1053-1084.
- AMANN, R. P.; HAMMERSTEDT, R. H. In vitro evaluation of sperm quality: an opinion. **J. Androl.**, v. 14, n. 6, p. 397-406, 1993.
- AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **J. Equine Vet. Sci.**, v. 7, n. 3, p. 145-173, 1987.
- AMIRAT, L.; ANTON, M.; TAINTURIER, D.; CHATAGNON, G.; BATTUT, I.; COURTENS, J. L. Modifications of bull spermatozoa induced by three extenders: Biociphos, low density lipoprotein and Triladyl, before, during and after freezing and thawing. **Reproduction**, v. 129, p. 535-543, 2005.

---

<sup>1</sup> ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação - Referências - Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24 p.

ANDRADE, E. R.; MELO-STERZA, F. A.; SENEDA, M. M.; ALFIERI, A. A. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismo antioxidantes. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 34, p. 79-85, 2010.

ARRUDA, R. P.; BALL, B. A.; GRAVANCE, C. G.; LIU, I. K. M. Determinação da integridade da membrana plasmática e acrossomal de espermatozóides de garanhões pela técnica de citometria de fluxo. **Acta Sci. Vet.**, v. 31, supl., p. 226-227, 2003.

ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; ALONSO, M. A.; CARVALHO, H. F.; OLIVEIRA, L. Z.; NASCIMENTO, J.; SILVA, D. F.; AFFONSO, F. J.; LEMES, K. M.; JAIMES, J. D. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 35, p. 45-151, 2011.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNES – ABIEC. **Perfil da pecuária no Brasil: relatório anual 2016**. Disponível em: <[http://www.abiec.com.br/3\\_pecuaria.asp](http://www.abiec.com.br/3_pecuaria.asp)>. Acesso em: jul. 2016.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL – ASBIA. **Relatório Anula**. Disponível em: <<http://www.asbia.org.br/novo/relatorios/>>. Acesso em: maio 2017.

AURICH, C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 89, p. 65-75, 2005.

BARBOSA, K.B.F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de nutrição**, V.23, n.4, p.629-643, 2010.

BAFANA, A.; DUTT, S.; KUMAR, A.; KUMAR, S.; AHUJA, P. S. The basic and applied aspects of superoxide dismutase. **J. Mol. Catal. B Enzym.**, v. 68, p. 129-138, 2011.

BAILEY, J. L.; BILODEAU, J. F.; CORMIER, N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. **J. Androl.**, v. 21, p. 1-7, 2000.

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

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

BARUSELLI, P. S. Produção Animal: IATF supera dez milhões de procedimentos e amplia o mercado de trabalho. **Rev. CFMV**, v. 22, n. 69, p. 57-60, 2015.

BATELLIER, F. **Identification, purification et mécanisme d'action d'éléments contenus dans le lait, agissant sur les spermatozoides équin**. 1997. Tese (Doutorado) – Université François Rabelais de Tours, UFR, Sciences et Techniques, Tours, 1997.

BATELLIER, F.; MAGISTRINI, M.; FAUQUANT, J.; PALMER, E. Effect of milk fractions on survival of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 48, p. 391-417, 1997.

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

BERGERON, A.; MANJUNATH, P. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 73, p. 1338-1344, 2006.

BLOTTNER, S.; NEHRING, H.; TORNER, H. Individual differences in capacitation of bull spermatozoa by heparin in vitro: relationship to fertility. **Theriogenology**, v. 34, p. 619-628, 1990.

BLOTTNER, S.; WARNKE, C.; TUCHSCHERER, A.; HEINEN, V.; TORNER, H. Morphological and functional changes of stallion spermatozoa after cryopreservation during breeding and non-breeding season. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 65, n. 1, p. 75-88, 2001.

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

BRITO, L. F. C.; BARTH, A. D.; BILODEAU-GOESEELS, S.; PANICH, P. L.; KASTELIC, J. P. Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate. **Theriogenology**, v. 60, p. 1539-1551, 2003.

BUCAK, M. N.; TUNCER, P. B.; SARIÖZKAN, S.; BASPINAR, N.; TASPINAR, M.; ÇOYAN, K.; BILGILI, A.; AKALIN, P. P.; BÜYÜKLEBLEBICI, S.; AYDOS, S.; ILGAZ, S.; SUNGUROGLU, A.; ÖZTUNA, D. Effects of antioxidants on post-thawed bovine sperm and oxidative stress parameters: antioxidants protect DNA integrity against cryodamage. **Cryobiology**, v. 61, p. 248-253, 2010.

CARVALHO, O. F.; FERREIRA, J. D. J.; SILVEIRA, N. A.; FRENEAU, G. E. Efeito oxidativo do óxido nítrico e infertilidade no macho. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 38, p. 33-38, 2002.

CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F.; RODRIGUES, P. H. M. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 104, p. 119-131, 2008.

CELEGHINI, E. C. C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos**

**espermatozóides utilizando sondas fluorescentes.** 2005. 186 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

CENTOLA, G. M. Comparison of manual microscopic and computer-assisted methods for analysis of sperm count and motility. **Arch. Androl.**, v. 36, p. 1-7, 1996.

CHATTERJEE, S.; DE LAMIRANDE, E.; GRAGNON, C. Criopreservation alters membrane sulfhydryl status of bull spermatozoa: protection by oxidized glutathione. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 60, p. 498-506, 2001.

CHAVEIRO, A.; MACHADO, L.; FRIJTERS, A.; ENGEL, B.; WOELDERS, H. Improvement of parameters of freezing protocol for bull sperm using two osmotic Supports. **Theriogenology**, v. 65, p. 1875-1890, 2006.

COMIZZOLI, P.; MERMILLOD, P.; MAUGET, R. Reproductive biotechnologies for endangered mammalian species. **Reprod. Nutr. Dev.**, v. 40, p. 493-504, 2000.

CONTRI, A.; VALOR, C.; FAUSTINI, M.; WEGHER, L.; CARLCCIO, A. Effect of semen preparation on casa motility results incryopreserved bull spermatozoa. **Theriogenology**, v. 74, p. 424-435, 2010.

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

CRESPILHO, M. A.; PAPA, O. F. **Uso do sêmen bovino refrigerado como estratégia para o aumento da taxa de concepção dos programas de inseminação artificial em tempo-fixo.** 2010. 97 f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2010.

CRESPILHO, A. M.; PAPA, F. O.; MARTINS JUNIOR, A.; DELL'AQUA JUNIOR, J. A. Evaluation of frozen bovine semen: how do semen collection and processing evaluate the quality of commercialized samples? **Vet. Zootec.**, v. 6, n. 2, p. 335-342, 2009.

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

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

DALVIT, G.; LLANES, S. P.; DESCALZO, A.; INSANI, M.; BECONI, M.; CETICA, P. Effect of alpha-tocopherol and ascorbic acid on bovine oocyte in vitro maturation. **Reprod. Dom. Anim.**, v. 40, p. 93-97, 2005.

DAVIS, I. S.; BRATTON, R. W.; FOOTE, R. H. Livability of bovine spermatozoa at 50, -25 and -85°C in Tris-buffered and citrate buffered yolk-glycerol extenders. **J. Dairy Sci.**, v. 46, p. 333-336, 1963.

DAY, M. L. Hormonal induction of estrous cycles in anestrous bos taurus beef cows. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 82-83, p. 487-484, 2004.

DEJARNETTE, J. M.; BARNES, D. A.; MARSHALL, C. E. Effects of pre-and postthaw thermal insults on viability characteristics of cryopreserved bovine semen. **Theriogenology**, v. 53, p. 1225-1238, 2000.

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

DHURVEY, M.; GRUPTA, V. K.; NEMA, S. P.; PATIDAR, A.; SHIVHARE, M.; SINGH, N.; SHAKYA, V. Modern semen evaluation techniques in domestic animals: a review. **DHR Int. J. Biomed. Life Sci.**, v. 3, n. 1, p. 62-83, 2012.

DONNELLY, E. T.; O'CONNELL, M.; MCCLURE, N.; LEWIS, S. E. Differences in nuclear DNA fragmentation and mitochondrial integrity of semen and prepared human spermatozoa. **Hum. Reprod.**, v. 15, p. 1552-1561, 2000.

DUFFY, P.; MARK, A.; CROWE, C.; AUSTIN, E. J.; MIHM, M.; BOLAND, M. P.; ROCHE, J. F. The effect of eCG or estradiol at or after norgestomet removal on follicular dynamics, estrus and ovulation in early post-partum beef cows nursing calves. **Theriogenology**, v. 61, p. 725-734, 2004.

EDDY, E. M.; O'BRIEN, D. A. The spermatozoon. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. (Ed.). **The physiology of reproduction**. 2. ed. New York: Raven Press, 1994. Cap. 2, p. 29-77.

EKHALASI-HUNDRIESER, M.; SCHÄFER, B.; KIRCHHOFF, C.; HESS, O.; BELLAIR, S.; MÜLLER, P.; TÖPFER-PETERSEN, E. Structural and molecular characterization of equine sperm-binding fibronectin-II module proteins. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 70, p. 45-57, 2005.

ESCOBAR, N. 21 arrobas em até 24 meses. **Rev. Pecu. Bras. On-line**, nov. 2015. Disponível em: <<http://www.revistapecuariabrasil.com.br/noticia/131-arrobas>>. Acesso em: 11 out. 2016.

FARREL, P. B.; FOOTE, R. H.; MCARDLE, M. M.; TROUERN-TREND, V.; TARDIF, A. L. Media and dilution procedures tested to minimize handling effects on human, rabbit, and bull sperm for computer-assisted sperm analyses (CASA). **J. Androl.**, v. 17, p. 293-300, 1996.

FAZELLI, A. R.; STEENWEG, W.; BEVERS, M. M.; DE LOOS, F. A. M.; VAN DEN BROEK, J.; COLENBRANDER, B. Development of a sperm zona pellucida binding assay for bull semen. **Vet. Rec.**, v. 132, p. 14-16, 1993.

FENICHEL, P. Acrosomal function and sperm fertilizing ability. In: FENICHEL, P.; PARINAUD, J. (Ed.). **Human sperm acrosome reaction**. Colloque INSERM, 1995. v. 236, p. 277-285.

FERREIRA, J. C. P. **Avaliação subjetiva e computadorizada do movimento espermático pós-descongelamento do sêmen equino**. 2000. p. 93. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2000.

FLESCH, F. M.; GADELLA, B. M. Dynamics of the mammalian sperm membrane in the process of fertilization. **Biochim. J. Biophys. Acta**, v. 1469, p. 197-235, 2000.

FOOTE, R. H. Media and dilution procedures tested to minimize handling effects on human, rabbit, and bull sperm for computer-assisted sperm analyses (CASA). **J. Androl.**, v. 17, p. 293-300, 1998.

FOX, P. F.; BRODKORB, A. The casein micelle: historical aspects, current concepts and significance. **Int. Dairy J.**, v. 18, p. 677-684, 2008.

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

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.

GIL, J.; LUNDHEIN, N.; SÖDERQUIST, L.; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, H. Influence of extender, temperature, and addition glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. **Theriogenology**, v. 59, p. 1241-1255, 2003.

GONZALEZ, R. A. F. **Efeito da criopreservação usando diferentes técnicas de congelamento e crioprotetores sobre parâmetros espermáticos e a integridade de membrana do espermatozoide bovino**. 2004. 92 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

GRAHAM, J. K. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. **Anim. Reprod. Sci.**, p. 239-247, 2001.

GRAHAM, J. K.; MOCÉ, E. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. **Theriogenology**, v. 64, p. 492-504, 2005.

GRAHAM, J. K. Principles of cooled semen. In: INTERNATIONAL CONGRESS EQUINE REPRODUCTION, 2010, Oklahoma. **Proceedings...** Oklahoma, 2010. p. 1308.

GRAHAM, E. F.; SCHMEHL, M. K. L.; NELSON, D. S. Problems with laboratory assays. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION ARTIFICIAL, 8., 1980, Madrid. **Proceedings...** Madrid, 1980. p. 1-8.

GRAVANCE, C. G.; GARNER, D. L.; MILLER, M. G.; BERGER, T. Fluorescent probes and flow cytometry to assess rat sperm integrity and mitochondrial function. **Reprod. Toxicol.**, v. 15, p. 5-10, 2001.

GRIFFIN, E. M. **Development of an extender protocol to enhance the viability of frozen-thawed bovine spermatozoa**. 2004. 212 f. Dissertação (Mestrado) - Texas A & M University, Houston, Texas, 2004.

GUTHRIE, H. D.; WELCH, G. R. Determination of intracellular reactive oxygen species and high mitochondrial membrane potential in percoll-treated viable boar sperm using fluorescence-activated flow cytometry. **J. Anim. Sci.**, v. 84, p. 2089-2100, 2006.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Textbook of medical physiology**. 9. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2000.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. p. 1014.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role human disease. **Am. J. Med.**, v. 91, n. 3C, p. 14S-22S, 1991.

HARRISON, R. A. Sperm plasma membrane characteristics and boar semen fertility. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v. 52, p. 195-211, 1997.

HENKEL, R.; HAJIMOHAMMAD, M.; STALF, T.; HOOGENDIK, C.; MEHNERT, C.; MENKVELD, R.; GIPS, H.; SCHILL, W. B.; KRUGER, T. F. Influence of deoxyribonucleic acid damage on fertilization and pregnancy. **Fertil. Steril.**, v. 81, n. 4, p. 965-972, 2004.

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

HOLT, C.; HOLT, W. V.; MOORE, H. D.; REED, H. C.; CURNOCK, R. M. Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of on-farm inseminations: results of two fertility trials. **J. Androl.**, v. 18, n. 3, p. 312-323, 1997.

HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage semen. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 62, n. 1/3, p. 2-22, 2000.

HOLT, W. V.; MEDRANO, A. Assessment of boar sperm function in relation to freezing and storage. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v. 52, p. 213-222, 1997.

HONDA, A.; SIRUNTAWINETI, J.; BABA, T. Role of acrosomal matrix proteases in sperm-zona pellucida interactions. **Hum. Reprod. Update**, v. 8, p. 405-412, 2002.

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

HRUDKA, F. Cytochemical and ultracytochemical demonstration of cytochrome-c oxidase in spermatozoa and dynamics of changes accompanying ageing or induced by stress. **Int. J. Androl.**, v. 10, n. 6, p. 809-828, 1987.



HURST, V. Dilution of bull semen with frozen egg yolk-sodium citrate. **J. Dairy Sci.**, v. 36, p. 181-184, 1953.

IRITANI, A. Problems of freezing spermatozoa of different species. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION ARTIFICIAL INSEMINATION, 9., 1980, Madrid. **Proceedings...** Madrid, 1980. p. 115-131.

JANUSKAUSKAS, A.; ZILINSKAS, H. Bull semen evaluation post-thaw and relation of semen characteristics to bull's fertility. **Vet. Zootec.**, v. 17, n. 39, p. 1-8, 2002.

JONES, R.; MANN, T.; SHERINS, R. Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acids peroxides, and protective action of seminal plasma. **Fertil. Steril.**, v. 31, p. 531-537, 1979.

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

KARABINUS, D. S.; EVENSON, D. P.; KAPROTH, M. T. Effects of egg yolk-citrate and milk extenders on chromatin structure and viability of cryopreserved bull sperm. **J. Dairy Sci.**, v. 74, n. 11, p. 3836-3848, 1991.

KASTELIC, J. P.; OLSON, W. O.; MARTINEZ, M. A.; COOK, R. B.; MAPLETOFT, R. J. Synchronization of estrus in beef cattle with norgestomet and estradiol valerate. **Can. Vet. J.**, v. 40, p. 173-178, 1999.

KATO, M.; MAKINO, S.; KIMURA, H.; OTA, T.; FURUHASHI, T.; NAGAMURA, Y. Evaluation of mitochondrial function and membrane integrity by dual fluorescent staining for assessment of sperm status in rats. **J. Toxicol. Sci.**, v. 27, n. 1, p. 11-18, 2001.

KENNEY, W. C.; HANIU, M.; HERMAN, A. C.; ARAKAWA, T.; COSTIGAN, V. J.; LARY, J.; YPHANTIS, D. A.; THOMASON, A. R. Formation of mitogenically active PDGF-B dimer does not require interchain disulfide bonds. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 16, p. 12351-12359, 1994.

KIRK, E. S. **Flow cytometric evaluation of stallion sperm**. 2001. Dissertação (Mestrado) – Colorado State University, Fort Collins, Colorado, 2001.

KODAMA, H.; KURIBAYASHI, Y.; GAGNON, C. Effect of sperm lipid peroxidation on fertilization. **J. Androl.**, v. 17, p. 151-157, 1996.

KUNDU, C. N.; CHAKRABORTY, J.; DUTRA, P.; BHATTACHARYYA, D.; GHOSH, A.; MAJUMDER, G. C. Development of a simple sperm cryopreservation model using a chemical defined medium and goat cauda epididymal spermatozoa. **Cryobiology**, v. 40, p. 117-125, 2000.

LARSON, K. L.; DEJONGE, C. J.; BARNES, A. M.; JOST, L. K.; EVENSON, D. P. Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. **Hum. Reprod.**, v. 15, n. 8, p. 1717-1722, 2000.

LONERGAN, P.; RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; FAIR, T.; BOLAND, M. P. Effect of culture environment on embryo quality and gene expression – experience from animal studies. **Reprod. Biomed. Online**, v. 7, n. 6, p. 657-663, 2003.

LORENZONI, S. R. G. **Criopreservação de sêmen equino envasado em criotubo**. 2010. 65 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

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

LU, K. H.; GORDON, I.; CHEN, H. B.; MCGORVEN, H. In vitro culture of early bovine embryos derived from in vitro fertilization of follicular oocytes matured in vitro. In: SCIENTIFIC MEETING EUROPEAN EMBRYO TRANSFER ASSOCIATION, 3., 1987, Lyon. **Proceedings...** Lyon, 1987. p. 70.

LUVONI, C.; KESKINTEPE, L.; BRACKETT, B. G. Improvement in bovine embryo production in vitro by glutathione-containing culture medium. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 43, p. 437-443, 1996.

MADUREIRA, E. H. Controle farmacológico do ciclo estral com o emprego de progesterona e progestágenos em bovinos. In: SIMPÓSIO SOBRE CONTROLE FARMACOLÓGICO DO CICLO ESTRAL EM RUMINANTES, 1., 2000, São Paulo. **Anais...** São Paulo, 2000. p. 90-98.

MAIA, M. S.; BICUDO, S. D. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 33, n. 4, p. 183-193, 2009.

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

MANJUNATH, P.; NAUC, V.; BERGERON, A.; MÉNARD, M. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. **Biol. Reprod.**, v. 67, n. 4, p. 1250-1258, 2002.

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

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

MANJUNATH, P.; SAIRAM, M. R.; UMA, J. Purification of four gelatin-binding proteins from bovine seminal plasma by affinity chromatography. **Biosci. Rep.**, v. 7, p. 231-238, 1987.

MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, H. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? **Reprod. Dom. Anim.**, v. 38, p. 312-318, 2003.

MAXWELL, W. M. C.; WATSON, P. F. Recent progress in the preservation of ram semen. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 42, p. 55-65, 1996.

MAZIERO, R. R. D.; CRESPILO, A. M.; FREITAS-DELL'AQUA, C. P.; DELL'AQUA JR., J. A.; PAPA, F. O. Análise de sêmen bovino e sua relação com a fertilidade. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 18., 2009, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: CBRA, 2009. p. 9-14.

MEDEIROS, C. M.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A. T.; RODRIGUES, J. L. Current status of sperm cryopreservation: why isn't better. **Theriogenology**, v. 57, p. 327-344, 2002.

MENEGHETTI, M.; SÁ FILHO, O. G.; PERES, R. F. G.; LAMB, G. C.; VASCONCELOS, J. L. M. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows I: basis for development of protocols. **Theriogenology**, v. 72, p. 179-189, 2009.

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.**, v. 366, n. 2, p. 427-442, 2016.

MIES FILHO, A.; MEYERS, S. A.; TABLIN, F.; COWE, J. H. Does cellular injury resulting from cryopreservation share traits with sperm capacitation? In: WORKSHOP ON TRANSPORTING GAMETES AND EMBRYOS, 1987, Brewster. **Proceedings...** Brewster, 2003. p. 70-73.

MORGAN, A. **IATF nos rebanhos bovinos tem inúmeras vantagens**. 2015. Disponível em: <<http://www.cpt.com.br/noticias/iatf-rebanhos-bovinos-vantagens-gado-corte-leite>>. Acesso em: 06 out. 2016.

MORTIMER, S. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. **Hum. Reprod. Update**, v. 3, p. 403-439, 1997.

MOUSSA, M.; MARTINET, V.; TRIMECHE, A.; TAINTURIER, D.; ANTON, M. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, v. 57, p. 1695-1706, 2002.

MURAWSKI, M.; SACZKO, J.; MARCINKOWSKA, A.; KOWSKA, A. C.; GRYBOOE, M.; BANAOE, T. Evaluation of superoxide dismutase activity and its impact on semen quality parameters of infertile men. **Folia Histochem. Cytobiol.**, v. 45, n. 1, p. 123-126, 2007.

NAIR, S. J.; BRAR, A. S.; AHUJA, C. S.; SANGHA, S. P. S.; CHAUDHARY, K. C. A comparative study on lipid peroxidation, activities of antioxidant enzymes and viability

of cattle and buffalo bull spermatozoa during storage at refrigeration temperature. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 96, p. 21-29, 2006.

NAZ, R. K.; RAJESH, P. B. Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation/acrosome reaction. **Reprod. Biol. Endocrinol.**, v. 2, p. 1-12, 2004.

NICHI, M.; BOLS, P. E. J.; ZÜGE, R. M.; BARNABE, V. H.; GOOVAERTS, I. G. F.; BARN-ABE, R. C.; CORTADA, C. N. M. Seasonal variation in semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* bulls raised under tropical conditions. **Theriogenology**, v. 66, p. 822-828, 2006.

NISHIGAKI, T.; JOSÉ, O.; GONZÁLEZ-COTA, A. L.; ROMERO, F.; TREVIÑO, C. L.; DARSZON, A. Intracellular pH in sperm physiology. **Biochem. Biophys. Res.**, v. 450, p. 1149-1158, 2014.

OEHNINGER, S.; DURU, N. K.; SRISOMBUT, C.; MORSHEDI, M. Assessment of sperm cryodamage and strategies to improve outcome. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 169, p. 3-10, 2000.

O'FLAHERTY, C.; BEORLEGUI, N. B.; BECONI, M.T. Reactive oxygen species requirements for bovine sperm capacitation and acrosome reaction. **Theriogenology**, v. 52, p. 289-301, 1999.

O'FLAHERTY, C.; DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Positive role of reactive oxygen species in mammalian sperm capacitation: triggering and modulation of phosphorylation events. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 41, n. 4, p. 528-540, 2006.

OLDS-CLARKE, P. How does poor motility alter sperm fertilizing ability? **J. Androl.**, v. 17, p. 183-186, 1996.

OLIVEIRA, C. H. **Avaliação das características do espermatozoide bovino congelado submetido a inclusão e remoção do colesterol das membranas.** 2007. 84 f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

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

PAPA, F. O.; GABALDI, S. H.; WOLF, A. Viabilidade espermática pós-descongelamento de sêmen bovino criopreservados com meio diluente glicina-gema em quatro diferentes tempos de estabilização. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 24, p. 39-44, 2000.

PAPA, L.; HAHN, M.; MARSH, E. L.; EVANS, B. S.; GERMAIN, D. SOD2 to SOD1 switch in breast cancer. **J. Biol. Chem.**, v. 289, p. 5412-5416, 2014.

PARKS, J. E.; GRAHM, J. K. Effects of cryopreservation on sperm membranes. **Theriogenology**, v. 38, p. 209-222, 1992.

PAWSON, T. Specificity in signal transduction: from phosphotyrosine-SH2 domain interactions to complex cellular systems. **Cell**, v.116, p.191-203, 2004

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

PICKETT, B. W.; SQUIRES, E. L.; AMANN, R. P. et al. **Procedures for collection, evaluation and utilization of stallion semen for artificial insemination**. Colorado: Colorado State University, Animal Reproduction Laboratory, 1987. p. 125. (Bulletin n. 3).

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

PLANTE, G.; LUSIGNIAN, M. F.; LAFLEUR, M.; MANJUNATH, P. Interaction of milk Proteins and Binder of Sperm (BSP) proteins from boar, stallion and ram semen. **Reprod. Biol. Endocrinol.**, v. 13, p. 92, 2015.

POLGE, C.; SMITH, A. U.; PARKES, A. S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, v. 164, p. 666, 1949.

POPE, C. E.; ZHANG, Y. Z.; DRESSER, B. L. A simple staining method for evaluating acrosomal status of cat spermatozoa. **J. Zoo Wildl. Med.**, v. 22, n. 1, p. 87-95, 1991.

POULOS, A.; DARIN-BENNETT; A.; WHITE, I. G. The phospholipid-bound fatty acids and aldehydes of mammalian spermatozoa. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 46, p. 541-549, 1973.

PUGLIESI, G.; CARVALHO, G. R.; RATES, D. M.; KER, P. G.; PEREIRA, M. O.; RENAN, R. O.; MONTEIRO, J. D. S. Viability and fertility of cooled equine semen diluted with skimmed milk or glycine egg yolk-based extenders. **Rev. Bras. Zootec.**, v. 41, n. 12, p. 2411-2417, 2012.

PURDY, P. H. The post-thaw quality of ram sperm held for 0 to 48 h at 5°C prior to cryopreservation. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 93, p. 114-123, 2006.

PURSLEY, J. R.; MEE, M. O.; WILTBANK, M. C. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2 $\alpha$  and GnRH. **Theriogenology**, v. 44, p. 915-923, 1995.

QUINTERO-MORENO, A.; RIGAU, T.; RODRIGUEZ-GIL, J. E. Regression analyses and motile sperm subpopulation structure study as improving tools in boar semen quality analysis. **Theriogenology**, v. 61, p. 673-690, 2004.

RAJESH, K. T.; DORESWAMY, K.; SHRILATHA, B.; MURALIDHARA, M. Oxidative stress associated DNA damage in testis of mice: induction of abnormal sperms and effects on fertility. **Mutat. Res.**, v. 513, p. 103-111, 2002.

RAMALHO-SANTOS, J.; SCHATTEN, G.; MORENO, R. D. Control of membrane fusion during spermiogenesis and the acrosome reaction. **Biol. Reprod.**, v. 67, p. 1043-1051, 2002.

RAPHAEL, C. F.; ANDRADE, A. F. C.; NASCIMENTO, J.; ARRUDA, R. P. Effects of centrifugation on membrane integrity and lipid peroxidation of equine cooled spermatozoa. In: 5th International Symposium on Stallion Reproduction. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 107, p. 344-345, 2008.

SÁ FILHO, M. F.; CRESPILO, A. M.; SANTOS, J. E. P.; PERRY, G. A.; BARUSELLI, P. S. Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous response influence likelihood of ovulation and pregnancy after estrous synchronization with progesterone or progestin-based protocols in suckled *Bos indicus* cows. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 120, p. 23-30, 2010.

SACKKAS, D.; ALVAREZ, J. G. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. **Fertil. Steril.**, v. 93, n. 4, p. 1027-1036, 2010.

SALISBURY, G. W.; FULLER, H. K.; WILLET, E. L. Preservation of bovine spermatozoa in yolk-citrate diluent and field results from its use. **J. Dairy Sci.**, v. 24, p. 905-910, 1941.

SETCHELL, B. P. Spermatogenesis and spermatozoa. In: AUSTIN, C. R.; SHORT, R. V. **Germ cells and fertilization**. Cambridge: Cambridge University Press, 1993. p. 63-101.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos proteicos**: propriedades, degradações, modificações. São Paulo: Editora-Livraria Varela, 1996. p. 139-157.

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

SILVA, S. V.; GUERRA, M. M. P. Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 35, n. 4, p. 370-384, 2011.

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

SINOWATZ, F.; WESSA, E.; NEUMULLER, C.; PALMA, G. On the species specificity of sperm binding and sperm penetration of the zona pellucida. **Reprod. Dom. Anim.**, v. 38, n. 2, p. 141-146, 2003.

SIKKA, S. C. Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. **Current Medical Chemistry**, v.8, p.851-862, 2001.

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

SQUIRES, E. L.; PICKET, B. W.; GRAHAM, J. K.; VANDERWALL, D. K.; MCCUE, P. M.; BRUEMMER, J. E. **Cooled and frozen stallion semen**. Fort Collins: Colorado State University, 1999. (Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, Bulletin n. 9).

SUGULLE, A. H.; BHUIYAN, M. M. U.; SHAMSUDDIN, M. Breeding soundness of bulls and the quality of their frozen sêmen used in cattle artificial insemination in Bangladesh. **Livestock Res. Rev. Dev.**, v. 18, n. 54, p. 44-54, 2006.

TATEMOTO, H.; OSHIRO, R.; SHIMADA, H.; KONNO, T.; YAMANAKA, K.; ASHIZAWA, K. **Addition of casein to the diluents during sêmen transportation improves the post-thaw qualities of okinawan native agu pig spermatozoa**. Nishihara: Editora, 2015. p. 75-86.

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

THATCHER, W. W.; MOREIRA, F.; SANTOS, J. E. P.; MATTOS, R. C.; LOPES, F. L.; PANCARCI, S. M.; RISCO, C. A. Effects of hormonal treatments on reproductive performance and embryo production. **Theriogenology**, v. 55, p. 75-89, 2001.

THUN, R.; HURTADO, M.; JANETT, F. Comparison of Biociphos-Plus 1 and TRIS-egg yolk extender for cryopreservation of bull semen. **Theriogenology**, v. 57, p. 1087-1094, 2002.

VALCARCEL, A.; DE LAS HERAS, M. A.; MOSES, D. F.; PEREZ, L. J.; BALDASSARRE, H. Comparison between Sephadex G-10 and Percoll for preparation of normospermic, asthenospermic na frozen/thawed ram semen. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 41, p. 215-224, 1996.

VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, A. M.; HARING, R. M.; KAALLANSBERGEN, L. M. T. E.; DEN DAAS, J. H. G. Fertility results using bovine semen cryopreserved with extenders based on egg yolk and soy bean extract. **Theriogenology**, v. 54, p. 57-67, 2000.

VARAGO, F. C.; MENDONÇA, L. F.; LAGARES, M. A. Produção in vitro de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 32, n. 2, p. 100-109, 2008.

VASCONCELOS, J. L. M.; SÁ FILHO, O. G. **Não adianta produzirmos um bezerro por vaca por ano precisamos produzir um bezerro de qualidade/vaca/ano**. BeefPoint – Dicas de Sucesso. 05 jul. 2010. Disponível em: <[www.beefpoint.com.br](http://www.beefpoint.com.br)>. Acesso em: 06 out. 2016.

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

VIANA, J. H. M.; SIQUEIRA, L. G.; PALHAO, M. P.; CAMARGO, L. S. Use of in vitro fertilization technique in the last decade and its effect on Brazilian embryo industry and animal production. **Acta Sci. Vet.**, v. 38, n. 2, p. 661-674, 2010.

VIEIRA, R. J. Biotécnicas aplicadas à reprodução bovina: generalidades. In: CONGRESSO NORTE NORDESTE DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 6., 2012, Fortaleza. **Ciênc. Anim.**, v. 22, n. 1, p. 55-65, 2012.

VISHWANATH, R.; SHANNON, P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 62, p. 23-53, 2000.

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

WALLACE, J. M. Artificial insemination and embryo transfer. In: SPEEDY, A. W. (Ed.). **Progress in sheep and goat research**. Oxford: C. A. B. International, 1992. Chap. I.

WARD, F.; RIZOS, D.; CORRIDAN, D.; QUINN, K.; BOLAND, M.; LONERGAN, P. Paternal influence on the time of first embryonic cleavage post insemination and the implications for subsequent bovine embryo development in vitro and fertility in vivo. **Mol. Reprod. Develop.**, v. 60, p. 47-55, 2001.

WATANABE, T.; SHIMBO, S.; MOON, C. S.; ZHANG, Z. W.; IKEDA, M. Cadmium Contents in rice samples from various areas in the world. **Sci. Total Environ.**, v. 184, p. 191-196, 1996.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 60-61, n. 2, p. 481-492, 2000.

WATSON, P. F. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5°C by egg yolk lipoprotein. **J. Reprod. Fertil.**, v. 62, p. 483-492, 1981.

YOSHIDA, M. Conservation of sperms: current status and new trends. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 60/61, p. 349-355, 2000.

ZINI, A.; LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Reactive oxygen species in semen of infertile patients: levels of superoxide dismutase and catalase-like activities in seminal plasma and spermatozoa. **Int. J. Androl.**, v. 16, n. 3, p. 183-188, 1993.



#### **4. Hipótese**

Adição de caseinato de sódio ao diluidor para congelação do sêmen bovino exerce efeito protetor sobre as células espermáticas, melhorando os índices relativos às suas características morfofuncionais e incrementando a fertilidade do sêmen assim preservado.

## 5. Objetivo

### 5.1 Objetivo Geral

Comparar o diluidor, à base de gema de ovo, com o mesmo diluidor acrescido do caseinato de sódio, sobre a manutenção da qualidade de amostras seminais bovinas criopreservadas.

### 5.2. Específico

1. Avaliar a cinética espermática, integridade da membrana plasmática após a congelação e as suas alterações que antecedem ao processo de capacitação, bem como, potencial mitocondrial e geração de superóxido de espermatozoides bovinos criopreservados com diluidor à base de gema de ovo, com ou sem associação de caseinato de sódio.
2. Comparar a taxa de fertilidade *in vitro* por meio de clivagem e de embriões produzidos, utilizando sêmen bovinos criopreservadas com diluidor à base de gema de ovo, com ou sem associação de caseinato de sódio.
3. Comparar a taxa de fertilidade *in vivo*, por meio de prenhez na IATF, utilizando sêmen bovino criopreservado com diluidor à base de gema de ovo, com e sem a associação de caseinato de sódio.

# Capítulo 1

1 (Artigo redigido segundo as normas da Theriogenology, ISSN:0093-691X, fator de  
2 impacto JCR: 1,838, como A2 pelo QUALIS – CAPES 2015. Disponível em:  
3 <https://www.elsevier.com/journals/theriogenology/0093-691X?generatepdf=true>  
4

## 5 **Utilização do caseinato de sódio na congelação de sêmen** 6 **bovino**

7  
8 Jefferson. V.A. Diniz<sup>a</sup>, José A. Dell’Aqua Jr<sup>a</sup>, Federico O. Papa<sup>a</sup>, Camila de P. F.  
9 Dell’Aqua<sup>a</sup>, Gabriel L. de Freitas<sup>a</sup>, Rosano R de Freitas<sup>b</sup>, Rodolpho Satrapa<sup>b</sup>, Rafael  
10 A. Satrapa<sup>c</sup>, Fernando A. Souza<sup>c</sup>, João A. M. Carneiro<sup>a</sup>, Eunice Oba<sup>a\*</sup>

11  
12 <sup>a</sup> Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – Universidade Estadual Paulista,  
13 Botucatu, SP, Brasil.

14 <sup>b</sup> Estação de Melhoramento e Difusão de Genética Animal (EMDGA), Departamento da Secretária de  
15 Agropecuária do Estado do Acre (SEAP), Rio Branco, AC, Brasil.

16 <sup>c</sup> Centro de Ciências Biológicas e da Natureza (CCBN), Universidade Federal do Acre (UFAC), Rio  
17 Branco, AC, Brasil.

18 \*Autor para correspondência: (55) 14 997721029 Departamento de Reprodução Animal e Radiologia  
19 Veterinária – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brasil.

20 euniceoba@fmvz.unesp.br

### 22 **Resumo**

23 O objetivo desse trabalho foi avaliar a morfofuncionalidade espermática, a  
24 fertilidade *in vitro* e *in vivo* de sêmen bovino criopreservado em diluente contendo  
25 caseinato de sódio. Foram utilizados ejaculados de 30 touros para serem processados  
26 em diluente comercial Botu-Bov<sup>®</sup> ao qual se adicionaram gema de ovo nas proporções  
27 de 20% (grupo G) ou de 15% acrescido de 2% de caseinato de sódio (grupo GC),  
28 posteriormente submetidos à congelação. O sêmen de cada um dos dois grupos foi

29 avaliado imediatamente após a descongelação (T0) ou após ter sido submetido ao  
30 estresse térmico a 37° C por 90 de minutos (T90), para as características de cinética  
31 espermática pelo método CASA e de integridade de membranas plasmática e  
32 acrossomal (IMPA), como ainda, quantificaram-se as populações espermáticas sem as  
33 alterações de membranas que antecedem ao processo de capacitação, a concentração  
34 de O<sub>2</sub><sup>-</sup> (superóxido) e o alto potencial mitocondrial (APM) por citometria de fluxo. No  
35 processo de produção *in vitro* de embriões (PIV), avaliou-se no dia 3 do cultivo a taxa  
36 de clivagem e no dia 8 a taxa de embriões a partir de blastocisto expandido (BX). O  
37 teste de fertilidade *in vivo* foi realizado através de IATF. Nas avaliações do sêmen no  
38 T0 as variáveis VAP, VSL, VCL e ALH mostraram valores superior no GC (P<0,05),  
39 entretanto após o T90 apenas as variáveis STR e LIN não diferiram entre G e GC  
40 (P>0,05) enquanto que os demais parâmetros foram superiores no GC. A IMPA  
41 mostrou-se sem alterações para G e GC no T0 (P>0,05), mas diferiram no T90,  
42 superior no GC (P<0,05). Os valores de O<sub>2</sub><sup>-</sup> e APM diferiram entre os dois grupos  
43 (P<0,05), sendo menores no GC para o T0 e T90. No teste de fertilidade *in vitro* e *in*  
44 *vivo* GC foi superior (P<0,05) ao do grupo G em relação às taxas de clivagem no dia  
45 03 e de embriões no dia 08 e nas taxas de prenhez na IATF. O caseinato de sódio  
46 adicionado ao meio de congelação proporcionou uma melhoria nas características de  
47 cinética e morfofuncionais especialmente após o estresse térmico, bem como um  
48 incremento nos índices de fertilidade *in vivo* e *in vitro*. Conclui-se, portanto que a  
49 melhoria nas condições morfofuncionais das células espermáticas e na fertilidade do  
50 sêmen bovino foi proporcionado pela adição do caseinato de sódio adicionado ao meio  
51 diluidor para criopreservação.

52 Palavras-chaves: CASA, gema de ovo, criopreservação, PIV, IATF.

53

## 54 1. INTRODUÇÃO

55

56 O resultado da IA como ferramenta biotecnológica está subordinado a várias  
57 condições, dentre as quais a qualidade do sêmen se apresenta como fator importante  
58 tendo como objetivando o incremento na taxa de prenhez. A gema de ovo, um  
59 componente de diluidores mais estudado na criopreservação das células espermáticas,

60 possui propriedades similares às do caseinato de sódio, porque também induz a redução  
61 das ligações das proteínas do plasma seminal com os espermatozoides [1], com a  
62 diferença de que seu efeito protetor envolve proteínas ao invés de lipídios [1,2].

63 As caseínas são classificadas como fosfoproteínas representam 80% das  
64 proteínas presente no leite bovino e quando empregadas como diluidores de sêmen  
65 desempenham função de estabilizar a membrana plasmática dos espermatozoides por  
66 reduzirem perda de seus lipídeos integrais [3,4], entretanto, o leite apresenta uma  
67 desvantagem em relação a outros meios químicos definidos em razão de ter composição  
68 heterogênea, apresentando mais de 100 mil diferentes moléculas, portanto de difícil  
69 padronização [5].

70 Esse efeito competitivo da caseína apresenta relevância principalmente em razão  
71 da grande proporção das proteínas do plasma seminal liberadas no ejaculado que estão  
72 fundamentalmente envolvidas nos processos de fertilidade do sêmen, na capacitação  
73 espermiática e na formação do reservatório espermiático [6,3], porém podem atuar  
74 desorganizando a membrana plasmática dos espermatozoides removendo colesterol e  
75 fosfolipídios que as integram em razão da prolongada exposição do sêmen a essas  
76 proteínas durante o processamento e estocagem [3].

77 Os danos produzidos às células espermiáticas são representados pelo próprio  
78 processo de criopreservação, que pode promover uma indesejada crio-capacitação e  
79 diminuir o tempo de vida e o poder fecundante das células espermiáticas. Sua ocorrência  
80 pode ser contornada pelo emprego de meios diluentes contendo o caseinato, cuja ação  
81 provoca um retardo naquele mecanismo por meio de suas ligações com íons cálcio  
82 envolvidos no processo fisiológico da reação acrossomal e da capacitação [7,8].

83 Outro atributo atrelado ao diluente contendo o caseinato de sódio é sua  
84 capacidade de propiciar maior ligação do espermatozoide com a zona pelúcida (ZP),  
85 condição desejável para se obter boa fertilização [8], como relatam trabalhos com  
86 fertilidade *in vitro*, para os quais a suplementação com caseína elevou a taxa de  
87 clivagem [9]. Em vista desses fatos, objetivou-se avaliar características espermiáticas e  
88 fertilidade do sêmen bovino criopreservado em diluente contendo caseinato de sódio.

89

90

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. ASPECTOS ÉTICOS

Os aspectos éticos recomendados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) foram considerados em cada etapa desse estudo, tendo sido aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Botucatu, protocolo CEUA 37/2016.

### 2.2. ANIMAIS

Foram utilizados 30 touros de diferentes raças com idade entre quatro e cinco anos, pesando em média 786 Kg ( $\pm$  69), com histórico de fertilidade comprovada, alojados em central de coleta de sêmen, localizada no município de Itatinga (latitude 23°06'06" sul e longitude 48°36'57" oeste), Estado de São Paulo.

### 2.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Na primeira etapa, as amostras obtidas de sêmen coletado dos 30 animais foram submetidas à avaliação da cinética espermática pelo método CASA (Hamilton Thorne Research – IVOS 12, Beverly, MA, USA). Na segunda etapa, sêmen de 30 animais foi analisado pela citometria de fluxo, utilizando-se o equipamento BD LSR Fortessa (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA), visando avaliar a integridade da membrana plasmática e acrossomal, quantificar a população espermática que não apresentava desestabilização e tão pouco a translocação de fosfatidilserina na membrana plasmática, o potencial mitocondrial e a geração de superóxido de oxigênio ( $O_2^-$ ). A primeira e segunda etapas foram analisadas nas condições T0 e T90. Na terceira etapa foi realizado o teste de fertilidade *in vitro* e *in vivo*.

### 2.4. COLHEITA E PROCESSAMENTO DO SÊMEN

Os ejaculados foram obtidos por meio de vagina artificial (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil) aquecida a 42 °C e os volumes de sêmen foram determinados nos tubos graduados, posteriormente mantidos em banho-maria à 37 °C, até serem

122 processados. A motilidade, vigor e turbilhonamento dos espermatozoides foram  
123 avaliados sobre lâmina aquecida a 37 °C, em microscópio de contraste de fase com  
124 aumentos de 100 e 400x. A motilidade foi avaliada em percentual, o vigor e o  
125 turbilhonamento em uma escala de 0-5 e a concentração espermática determinada por  
126 espectrofotometria (Accucell (IMV® Technologies, L'Aigle Cedex, France), adotando-  
127 se como ponto de corte os valores iguais ou superiores à concentração de  $300 \times 10^6$   
128 espermatozoides totais/mL e de motilidade superior a 70% espermatozoides móveis.  
129 Para a congelação, empregou-se o diluente Botu-Bov® (Botupharma, Botucatu, SP,  
130 Brasil) contendo gema de ovo nas proporções de 20% (grupo G) ou 15% com adição de  
131 2% de caseinato de sódio (Sigma-Aldrich C8654) (grupo GC).

132 O ejaculado de cada touro foi fracionado em duas alíquotas de igual volume,  
133 cada qual diluída em conformidade com os grupos G e GC, de modo a se obter  
134 concentração de  $60 \times 10^6$  espermatozoides/mL. A seguir, o sêmen foi envazado em  
135 palhetas de 0,5 mL de volume, lacrados com álcool polivinílico e acondicionadas em  
136 balcão frigorífico à temperatura constante de 5 °C durante quatro horas.

137 Decorrido esse período de refrigeração, as palhetas de cada grupo experimental  
138 foram submetidas a uma pré-congelação por 20 minutos em uma caixa isotérmica de  
139 poliestireno de (40 litros) no interior da qual foram mantidas horizontalmente em uma  
140 grade colocada a uma distância de três centímetros da lâmina de nitrogênio líquido e,  
141 posteriormente, submersas nele e, a seguir, colocadas em raques e armazenadas no  
142 botijão criogênico. Para as avaliações das características seminais, as palhetas foram  
143 descongeladas por submersão em água a 37 °C por 30 segundos, sendo posteriormente  
144 abertas e seu conteúdo, individualmente, colocado em micro tubos com capacidade de 2  
145 mL previamente aquecidos a 37 °C. A primeira avaliação foi realizada imediatamente  
146 após a descongelação denominado de tempo zero (T0) e outra mantida a 37 °C em  
147 banho-maria por 90 minutos (T90), denominado de teste de estresse térmico.

## 148 **2.5. AVALIAÇÃO DA CINÉTICA ESPERMÁTICA**

149

150 Em câmara de Makler pré-aquecida a 37 °C, definiram-se cinco campos  
151 aleatórios com número mínimo de 200 espermatozoides por campo. Pelo método CASA  
152 (Hamilton Thorne Research – IVOS 12, Beverly, MA, USA), avaliaram-se motilidade  
153 espermática total (MT), motilidade espermática progressiva (MP), velocidade de trajeto



154 (VAP), velocidade linear (VSL), velocidade curvilinear (VCL), movimento lateral de  
 155 cabeça (ALH), frequência de batimento de cauda (BCF), retilinearidade (STR),  
 156 linearidade (LIN) e porcentagem de espermatozoides com movimento rápido (RAP),  
 157 utilizando-se o *setup* descrito na tabela 1.

158

159 Tabela 1 – Ajuste do equipamento de análise computadorizada dos  
 160 espermatozoides bovinos.

<b>Características</b>	<b>Ajuste</b>
Número de imagens adquiridas por campo	30
Contraste mínimo de células	60 pixels
Tamanho mínimo de células	6 pixels
Contraste para célula	60 pixels
Linearidade (LIN)	70%
Média mínima para VAP	< 40,0 $\mu\text{m/s}$
VAP mínimo para células progressivas	< 30,0 $\mu\text{m/s}$
VSL mínimo para células lentas	< 20,0 $\mu\text{m/s}$
Tamanho da cabeça estática	0,30 a 7,89
Intensidade da cabeça estática	0,41 a 1,19
Alongamento estático	96 - 0
Magnificação	1,95
Temperatura	37 °C

161 Abreviaturas: Linearidade (LIN), velocidade de trajeto (VAP), velocidade linear (VSL).

## 162 2.6. AVALIAÇÃO MORFUNCIONAL POR CITOMETRIA DE FLUXO

163

164 Para essa avaliação, empregou-se o equipamento BD LSR (Fortessa; Becton  
 165 Dickinson, Mountain View, CA, USA) provido de lasers violeta com comprimento de  
 166 onda de 405 nm, 100 mW; azul 488 nm, 100 mW e vermelho 640 nm, 40 mW. Após a  
 167 análise, os dados foram avaliados por programa do mesmo fabricante BD FACSDiva™  
 168 software v6.1. As mensurações de fluorescência foram realizadas nos filtros 450/50 nm  
 169 (H342), 530/30 nm (FITC); 660/20 nm (APC) e 694/50 nm (PI). Auto-fluorescência e  
 170 controles de cada fluorocromo foram adquiridos para ajuste de sobreposição de onda e  
 171 compensação utilizando-se a matriz de compensação do próprio software.

172 Os dados foram gerados utilizando-se gráficos dotplot incluindo eixo <0 (bi-  
 173 exponencial) tornando todos os eventos visíveis e propriamente compensados. As  
 174 amostras de sêmen foram diluídas em TALP-PVA segundo Parrish et al. [10] (100mM  
 175 NaCl, 3,1mM KCl, 25,0mM NaHCO<sub>3</sub>, 0,3mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 21,6mM DL-lactato de sódio  
 176 60%, 2,0mM CaCl<sub>2</sub>, 0,4mM MgCl<sub>2</sub>, 10,0mM HEPES-livre de ácido, 1,0mM piruvato de

177 sódio, 1,0mg/mL álcool polivinil-PVA e 25µg/mL gentamicina) na concentração de 5  
178  $\times 10^6$  espermatozoides/mL acrescido de Hoechst 3342 (7µM; 14533, Sigma) para  
179 eliminação dos *debris*.

180 Para a integridade de membranas plasmática, acrossomal e translocação de  
181 fosfolipídios de membrana utilizou-se protocolo descrito por Freitas-Dell'Aqua et al.  
182 [11]. Assim, com associação de iodeto de propídio (1,5µM; IP) e FITC-PSA (2ng;  
183 aglutinina de *Pisum sativum* conjugada ao isotiocianato de fluoresceína) e AnexinaV-  
184 APC (concentração de acordo com o fabricante, BD Pharmigen), classificaram-se duas  
185 populações distintas: células com membrana plasmática e acrossomal integra (IMPA,  
186 %) como sendo aquelas não marcadas pelas sondas IP e FITC-PSA; e células íntegras  
187 sem translocação de fosfatidilserina (STF, %) como sendo aquelas não marcadas pelas  
188 sondas IP, FITC-PSA e AnexinaV.

189 Para a avaliação da desestabilização de membranas, alto potencial mitocondrial e  
190 concentração de anion superóxido na matriz mitocondrial, utilizou-se protocolo descrito  
191 por Freitas-Dell'Aqua et al. [12] modificado pela troca da sonda SitoxGreen por Yo-  
192 Pro® (YP, Y3603 – Life Technologies) na concentração de 25nM. Os parâmetros  
193 avaliados foram: células sem desestabilização de membranas (SDM, %), sendo aquelas  
194 não marcadas pelo YP; concentração de anion superóxido na matriz mitocondrial ( $O_2^-$ ) e  
195 o alto potencial Mitocondrial (APM) foram avaliados como intensidade de fluorescência  
196 emitida, sendo que para concentração de  $O_2^-$  levou-se em consideração todas as células  
197 avaliadas enquanto que para APM apenas as células íntegras.

## 198 2.7. TESTE DE FERTILIDADE *IN VITRO*

199

200 Para a produção *in vitro* de embriões, foi utilizado de modo aleatório o sêmen  
201 criopreservado de quatro touros. Os ovários para obtenção de oócitos foram coletados  
202 em abatedouro no município de Rio Branco – AC (latitude 6°58'32" sul e longitude  
203 67°48'30" oeste), colocados em recipientes esterilizados com solução de DMPBS-  
204 FLUSH® (Nutricell, Campinas, SP, Brasil) a 35°C e transportado ao laboratório em  
205 caixa isotérmica.

206 Os folículos antrais (3 a 8mm de diâmetro) foram aspirados com o uso de agulha  
207 (21G) e seringa (10mL) e o conteúdo transferido para um tubo cônico de 15 mL,  
208 mantido em “banho-maria”, a 35°C por 10 minutos até a sedimentação dos oócitos.

209 Posteriormente, retirou-se o sobrenadante e o sedimento foi transferido para placa de  
210 petri de 60 mm de diâmetro e avaliado em microscópio estereoscópio. Foram  
211 selecionados oócitos com citoplasma de coloração homogênea e com mais de duas  
212 camadas completas de células do *cummulus*; essa etapa foi considerada como dia menos  
213 do experimento D(-1).

214 Ainda no D(-1), para a maturação *in vitro* (MIV), os oócitos selecionados foram  
215 armazenados no meio de lavagem da Bioklone® (constituído por meio TCM-199,  
216 suplementado com 0,2mM de Piruvato, 20mM de HEPES, 5mM de Bicarbonato de  
217 sódio, 75µg de Sulfato de amicacina/mL) e foram maturados durante 24 horas em estufa  
218 a 38,5°C, 100% de umidade e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar.

219 Para a fecundação *in vitro* (FIV), em placa de petri foram aliquotadas microgotas  
220 de 100µl de meio TALP suplementado com heparina (10µg/mL), piruvato (22µg/mL),  
221 gentamicina (50µg/mL), albumina sérica bovina (BSA) sem ácidos graxos (6mg/mL) e  
222 solução de PHE (2µM de penicilina, 1µM de hipotaurina e 0,25µM de epinefrina). Os  
223 espermatozoides previamente selecionados em gradiente percoll foram transferidos para  
224 as microgotas juntamente com os oócitos maturados e incubados em atmosfera com 5%  
225 de CO<sub>2</sub> em ar, a 38,5°C durante 18 horas, esse etapa foi considerada como dia zero  
226 D(0).

227 Após esse período, todos os oócitos foram removidos da placa de FIV para a  
228 placa contendo o meio CIV e nessa passagem foram dados dois banhos com meio TL-  
229 Sêmen Bioklone® e dois banhos com o meio CIV por gota antes de colocar na placa de  
230 CIV; esse período foi considerado como dia 1 do cultivo (D1). No terceiro dia do  
231 cultivo (D3), realizou-se a contagem na taxa de clivagem e renovaram-se 50% do meio  
232 de cultura (*feeding*). No oitavo dia do cultivo (D8), foram contabilizados a taxa de  
233 embriões nas seguintes fases de desenvolvimento embrionário: blastocisto em expansão  
234 (BX), blastocisto em eclosão (BN) e blastocisto eclodido (BE).

## 235 **2.8. TESTE DE FERTILIDADE *IN VIVO* (IATF)**

236  
237 As inseminações foram realizadas no Estados do Mato Grosso do Sul (latitude  
238 20°26'34" sul e longitude 54°38'47" oeste) utilizando o mesmo sêmen criopreservado  
239 dos quatro touros utilizados na FIV. Foram utilizadas 907 vacas azebuadas que  
240 apresentaram escore corpóreo de  $\pm 3$  (1-5) no início do protocolo de sincronização de

241 cio, uni ou múltiparas, com idades entre 03 e 06 anos, não lactantes, criadas em regime  
242 extensivo, com água e sal mineral (60% de fósforo) *ad libitum*.

243 O protocolo para sincronização das ovulações constou de: no D0, dia aleatório  
244 do ciclo estral, cada vaca recebeu 1 g de progesterona (P4) através de um dispositivo de  
245 liberação intravaginal de P4 e 2,5 mg de Benzoato de estradiol (BE) por via  
246 intramuscular (IM). No D8 o dispositivo P4 foi retirado e 150 µg de D-cloprostenol  
247 (PGF2α), 1 mg de BE e 300 UI de eCG (Folligon®, Intervet / Schering-Plough, Brasil)  
248 foram administrados IM. Em cada propriedade, as vacas foram inseminadas com 48  
249 horas após D8 com sêmen do grupo G ou do GC do mesmo touro em igual número e de  
250 modo aleatório. O diagnóstico de gestação foi realizado 35 dias após a IA por meio de  
251 ultrassonografia (Aloka SSD 500, Aloka, Japan).

252

## 253 2.9. ANALISE ESTATÍSTICA

254

255 Para as análises, utilizou-se o Programa GraphPad Prism versão 6.0 para  
256 Windows (GraphPad software, LA Jolla, Califórnia, USA; www.graphpad.com). Análises  
257 laboratoriais de cinética e morfofuncionais calcularam-se as médias e erro padrão e  
258 então aplicou-se o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. Quando os dados  
259 apresentavam distribuição normal, utilizou-se o teste t e, quando não (dados não  
260 paramétricos) utilizou-se Mann-Whitney. Para os testes de fertilidade *in vitro* e *in vivo*  
261 utilizaram o teste do Qui-quadrado, as diferenças entre valores foram consideradas  
262 significativas quando  $P < 0,05$ .

## 263 3. RESULTADOS

264

265 Os resultados obtidos com os ejaculados a fresco foram (média ± erro padrão):  
266 motilidade (79% ± 14,42), concentração espermática (1.072 espermatozoides móveis  
267 totais/mL ± 195,71), vigor (3,8 ± 0,69), volume (9,83 mL ± 1,79) e turbilhonamento  
268 (3,56 ± 0,64), encontravam-se dentro dos padrões de normalidade para a espécie bovina  
269 preconizados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA) [13].

270 Na avaliação da cinética espermática do sêmen pelo CASA no T0, constatou-se  
271 diferença ( $P > 0,05$ ) entre os grupos G e GC em relação às variáveis VAP, VSL, VCL e  
272 ALH e, após o T90, apenas STR e LIN, não diferiram entre G e GC ( $P > 0,05$ ) enquanto  
273 que os demais parâmetros foram superiores no GC (Tabela 2).

274

275 Tabela 2 – Médias  $\pm$  erro padrão das características da cinética espermática do sêmen de  
 276 30 touros no T0 e no T90 dos grupos G e GC.

Variável	T0		T90	
	G	GC	G	GC
MT (%)	52 $\pm$ 3,4	54 $\pm$ 2,9	26 $\pm$ 4,3 <sup>B</sup>	35 $\pm$ 3,4 <sup>A</sup>
MP (%)	41 $\pm$ 2,6	43 $\pm$ 2,1	19 $\pm$ 3,2 <sup>B</sup>	27 $\pm$ 2,5 <sup>A</sup>
VAP ( $\mu$ m/s)	76 $\pm$ 1,5 <sup>b</sup>	79 $\pm$ 1,4 <sup>a</sup>	63 $\pm$ 2,3 <sup>B</sup>	73 $\pm$ 1,7 <sup>A</sup>
VSL ( $\mu$ m/s)	64 $\pm$ 1,0 <sup>b</sup>	66 $\pm$ 1,0 <sup>a</sup>	52 $\pm$ 2,0 <sup>B</sup>	61 $\pm$ 1,1 <sup>A</sup>
VCL ( $\mu$ m/s)	117 $\pm$ 2,7 <sup>b</sup>	124 $\pm$ 2,7 <sup>a</sup>	100 $\pm$ 3,9 <sup>B</sup>	119 $\pm$ 3,2 <sup>A</sup>
ALH ( $\mu$ m)	4 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>	5 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	4 $\pm$ 0,1 <sup>B</sup>	5 $\pm$ 0,1 <sup>A</sup>
BCF (Hz)	26 $\pm$ 0,4	25 $\pm$ 0,4	19 $\pm$ 1,0 <sup>B</sup>	22 $\pm$ 0,5 <sup>A</sup>
STR (%)	85 $\pm$ 0,4	84 $\pm$ 0,5	82 $\pm$ 0,7	84 $\pm$ 0,6
LIN (%)	57 $\pm$ 0,6	56 $\pm$ 0,6	53 $\pm$ 0,8	53 $\pm$ 0,6
RAP(%)	49 $\pm$ 3,4	52 $\pm$ 2,8	23 $\pm$ 4,1 <sup>B</sup>	32 $\pm$ 3,4 <sup>A</sup>

277 G: (20% de gema de ovo), GC: (15% de gema de ovo + de 2% de caseinato de sódio), T0: Tempo zero; T90: Tempo  
 278 de 90 minutos; MT: motilidade espermática total; MP: motilidade espermática progressiva; VAP: velocidade de  
 279 trajeto; VSL: velocidade retilínea; VCL: velocidade curvilínea; ALH: movimento lateral de cabeça; BCF: frequência  
 280 de batimento de cauda; STR: retilinearidade; LIN: linearidade; RAP: porcentagem de espermatozoides com  
 281 movimento rápido. Nas colunas (T0) e (T90), letras minúsculas distintas na mesma linha diferem ( $P < 0,05$ ) pelo teste  
 282 t.; letras maiúsculas distintas na mesma linha diferem ( $P < 0,05$ ) pelo teste t.

283

284 O resultado de integridade de membranas plasmática e acrossomal não diferiu  
 285 entre os grupos no T0 ( $P > 0,05$ ), contudo verificou-se diferença em favor ao grupo GC  
 286 na porcentagem de células espermáticas com membranas integras no T90 ( $P < 0,05$ ).  
 287 (Tabela 3)

288 Os valores para SDM e STF não diferiram ( $P > 0,05$ ) no T0, portanto não se  
 289 constaram alterações precoces e tão pouco tardias no processo de capacitação. No T90  
 290 constatou-se que a porcentagem de células que não apresentavam desestabilização como  
 291 também, sem translocação de fosfatidilserina foram maiores no grupo GC ( $P < 0,05$ ), ou  
 292 seja, maior população de células espermáticas sem alterações precoces ou tardias de  
 293 capacitação encontrava-se no GC. Os dados relativos à avaliação dos valores de  
 294 superóxido ( $O_2^-$ ) e do alto potencial mitocondrial (APM) diferiram tanto no T0 quanto  
 295 no T90 entre G e GC ( $P < 0,05$ ). (Tabela 3)

296

297

298

299

300

301 Tabela 3 – Média  $\pm$  erro padrão das características avaliadas por citometria de  
 302 fluxo da integridade das membranas plasmática, acrossomal e alterações semelhantes à  
 303 capacitação, superóxido e potencial mitocondrial do sêmen (T0 e T90) dos grupos G e  
 304 GC dos 30 animais.

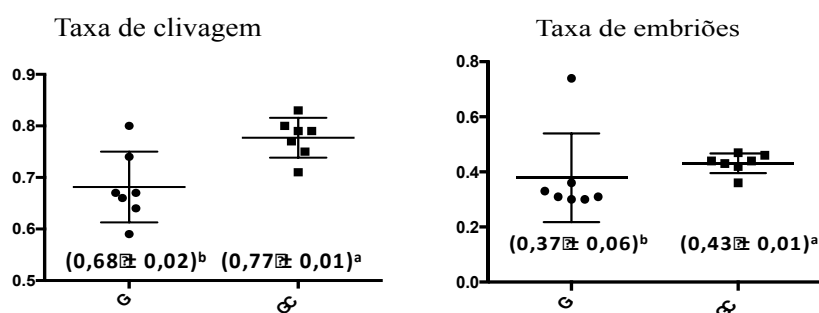
Parâmetro	T0		T90	
	G	GC	G	GC
IMPA (%)	56 $\pm$ 2,2	56 $\pm$ 3,1	25 $\pm$ 2,4 <sup>b</sup>	34,4 $\pm$ 2,9 <sup>a</sup>
SDM (%)	53 $\pm$ 2,5	54 $\pm$ 2,8	25 $\pm$ 2,5 <sup>b</sup>	34 $\pm$ 2,7 <sup>a</sup>
STF (%)	53 $\pm$ 2,4	52 $\pm$ 3,2	25 $\pm$ 2,5 <sup>b</sup>	30 $\pm$ 2,8 <sup>a</sup>
APM (UA)	59793 $\pm$ 3177 <sup>a</sup>	42584 $\pm$ 2857 <sup>b</sup>	9478 $\pm$ 1195 <sup>a</sup>	5929 $\pm$ 420 <sup>b</sup>
O <sub>2</sub> <sup>-</sup> (UA)	17311 $\pm$ 1216 <sup>a</sup>	11228 $\pm$ 652 <sup>b</sup>	2472 $\pm$ 180 <sup>a</sup>	1770 $\pm$ 87 <sup>b</sup>

305 G: 20% de gema de ovo; GC: 15% de gema de ovo + de 2% de caseinato de sódio; T0: momento zero hora após o  
 306 descongelamento a 37 °C por 30 segundos; T90: momento 90 minutos de exposição no banho maria a 37 °C; IMPA:  
 307 integridade de membrana plasmática e acrossomal; SDM: células sem desestabilização de membrana; STF: células  
 308 sem translocação de fosfatidilserina; O<sub>2</sub><sup>-</sup>: concentração de ânion superóxido na matriz mitocondrial; APM: Alto  
 309 potencial mitocondrial; UA: Unidade arbitrária. Letras minúsculas, dentro de cada momento, diferentes na mesma  
 310 linha indicam diferença estatística (P<0,05) entre os grupos pelo teste t.  
 311

312 Para os testes *in vitro*, o experimento foi distribuído em 7 protocolos, para cada  
 313 grupo sendo que no grupo G trabalhou-se em média com 80,1  $\pm$  8,6 oócitos e no grupo  
 314 GC com 79,4  $\pm$  8,6. Somente oócitos com citoplasma de coloração homogênea e com  
 315 mais de duas camadas completas de células do *cumulus* foram selecionados para a  
 316 realização das PIV. (Figura 2 e 3). A taxa geral de embriões foi de 38,35%  
 317 independentemente do grupo e enquanto que as taxas de blastocistos no dia 8 foram de  
 318 32,9% e 43,8% para G e GC, respectivamente.  
 319

Figura 1

Figura 2



320

321 **Figura 1** - Média  $\pm$  erro padrão na taxa de clivagem em relação ao número de oócitos totais em 7  
 322 protocolos de PIV dispersos para cada grupo G: (20% de gema de ovo), GC: (15% de gema de ovo +  
 323 2% de caseinato de sódio). Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística (P<0,05) entre  
 324 grupos pela ANOVA e teste t. **Figura 2** - Média  $\pm$  erro padrão na taxa de embriões em relação ao  
 325 número de oócitos totais em 7 protocolos de PIV dispersos para cada grupo G: (20% de gema de  
 326 ovo), GC: (15% de gema de ovo + 2% caseinato de sódio). Letras minúsculas diferentes indicam  
 327 diferença estatística (P<0,05) entre grupos pelo teste t.  
 328

329

330 O teste de fertilização *in vitro* resultou em diferença entre G e GC na taxa de  
 331 clivagem no dia 3 e na taxa de embriões no dia 8, maiores no GC (P<0,05).  
 332 Individualmente para as mesmas variáveis, constatou-se que os touros número 2 e 3  
 333 refletiram diferenças (P<0,05)

334 Tabela 4 – Taxa de clivagem no dia 3 do cultivo (n° total de óocitos = 1.129) e  
 335 de embriões no dia 8 do cultivo (n° total de embriões = 433) no teste de fertilização *in*  
 336 *vitro* com sêmen bovino criopreservado em diluentes dos grupos G e GC.

		Fertilização <i>In vitro</i>	
	Variáveis	G	GC
Touro 1	D3	80,6% (167/207)	76,5% (157/205)
	D8	36,7% (76/207)	43,4% (89/205)
Touro 2	D3	59,2% (64/108) <sup>B</sup>	74,5% (79/106) <sup>A</sup>
	D8	29,6% (32/108) <sup>B</sup>	44,3% (47/106) <sup>A</sup>
Touro 3	D3	65,6% (84/128) <sup>B</sup>	80,8% (101/125) <sup>A</sup>
	D8	30,4% (39/128) <sup>B</sup>	43,20% (54/125) <sup>A</sup>
Touro 4	D3	66,4% (83/125)	75,2% (94/125)
	D8	32% (40/125)	44,8% (56/125)
Total	D3	70% (398/568) <sup>B</sup>	76,8% (431/561) <sup>A</sup>
	D8	32,9% (187/568) <sup>B</sup>	43,8% (246/561) <sup>A</sup>

337 G: (20% de gema de ovo), GC: (15% de gema de ovo + de 2% de caseinato de sódio), D3 –números de embriões  
 338 clivados no dia 3 do cultivo, D8 – números de embriões a partir de blastocisto expandido no dia 8 do cultivo, letras  
 339 maiúsculas distintas na mesma linha diferem pelo teste de Qui-quadrado (P<0,05).  
 340

341 A taxa de prenhez por IATF diferiu (P<0,05) entre os grupos, sendo que o sêmen  
 342 do GC resultou em incremento em relação ao G, ainda que não se tenha constatado  
 343 diferença em relação ao fator touro. A taxa de prenhez total, somados os resultados dos  
 344 dois grupos foi de 46,74% (424/907) (Tabela 5).

345

346 Tabela 5 – Taxa e valores absolutos de prenhez resultantes de IATF (n = 907)  
 347 com sêmen congelado dos grupos G e GC.

		Fertilização <i>In vivo</i>		
		G	GC	Total
Touro 1		39,2% (66/168)	43,6% (76/174)	41,5% (142/342)
Touro 2		46,7% (80/171)	50,5% (87/172)	48,6% (167/343)
Touro 3		42,3% (25/59)	58,3% (35/60)	50,4% (60/119)
Touro 4		46,1% (24/52)	60,7% (31/51)	50,4% (55/103)
Total		43,33% (195/450) <sup>B</sup>	50,10% (229/457) <sup>A</sup>	46,74% (424/907)

348 G: (20% de gema de ovo), GC: (15% de gema de ovo + de 2% de caseinato de sódio), valores com letras maiúscula  
 349 sobrescritas distintas na mesma linha diferem (P<0,05) pelo teste de Qui-quadrado.  
 350

351

#### 352 4. DISCUSSÃO

353 O grande desafio do processo de congelação de células espermáticas,  
354 independente da espécie, está associado à técnica e aos constituintes dos meios de  
355 criopreservação, ainda que avanços e resultados robustos tenham sido relatados,  
356 entretanto, lesões decorrentes do processo de criopreservação em espermatozoides de  
357 ruminantes continuam a ser descritas como elevadas [14].

358 O percentual de MT de espermatozoides do grupo GC no T0 foi superior em  
359 relação aos resultados descritos por Swelun et al. [15], ambos utilizando proteína de  
360 leite na composição dos diluentes de sêmen. Nas avaliações da cinética espermática no  
361 T90, foram evidenciadas diferenças para as variáveis MT e MP entre G e GC,  
362 semelhante ao observado no experimento de Tatemoto et al. [9], para grupos sem ou  
363 com caseína a 2%, mantidos em incubação por três horas. Nesse mesmo experimento a  
364 adição de caseína ao meio de transporte para sêmen de suíno nativo incrementou a MT e  
365 MP em comparação ao meio sem caseína. Desse modo, pode-se inferir que,  
366 possivelmente, as micelas de caseína foram capazes de conferir proteção às células  
367 espermáticas que exibiram melhores condições de MT e MP no T90 [1,7,9]. Essa  
368 capacidade de sobrevivência das células espermáticas em condições de congelação  
369 também foi constatada por Van Den Berg et al. [16] em javalis, quando utilizaram três  
370 diferentes diluentes, dois dos quais contendo na sua composição proteína do leite.

371 Na avaliação da cinética de amostras de sêmen no T90 constatou-se que, dentre  
372 todas as variáveis examinadas, apenas STR e LIN, não diferiram entre G e GC, ou seja,  
373 que a maioria resultou em valores que indicaram ser o diluente do GC o mais eficiente.  
374 Entretanto, resultados distintos foram relatados por Crespilho et al. [17], para sêmen  
375 submetido a estresse térmico, para os quais a comparação entre os meios Botu-Bov® e  
376 Tes-Tris (Gema de ovo + Leite desnatado) resultou em diferenças estatísticas em  
377 relação a quase todos os parâmetros, favoráveis ao diluente que apresentava apenas  
378 gema de ovo na sua composição.

379 Possivelmente, o comportamento das células espermáticas do GC no T90 pode  
380 estar relacionado à concentração das  $O_2^-$  que se encontrava em menor quantidade do  
381 início até o fim do estresse térmico mostrando, portanto, que presumivelmente os  $O_2^-$   
382 em maior quantidade poderiam estar inibindo a fosforilação de algumas proteínas  
383 quinase dependentes interferindo assim na cinética espermática, principalmente após o  
384 processo de estresse térmico [18].



385 Os padrões de motilidade espermática podem ser correlacionados com a  
386 fertilidade *in vitro*, ainda que essa afirmação possa provocar controvérsias. Para  
387 algumas características avaliadas pelo método CASA, como MP, ALH, BCF e VCL,  
388 parecem apresentar maior correlação com a fertilidade e podem ser critérios de predição  
389 de fertilidade de sêmen bovino [19, 20]. Assim, com base nesses relatos, o sêmen do  
390 GC, presumivelmente, teria maior capacidade fecundante por apresentar características  
391 de motilidade superiores às do G após o T90.

392 Para alguns autores, características seminais como MT, MP, RAP quando se  
393 apresentarem com padrões normais após o estresse térmico correlacionam-se  
394 positivamente com a fertilidade, como descrevem Love [21] em garanhões, Kathiravan  
395 et al. [22] na fertilização *in vitro* com sêmen bovino e Broekhuijse et al. [23] em relação  
396 à taxa de parição de porcas, tudo em decorrência da chegada de maior número de  
397 espermatozoides ao local de fertilização na fêmea. Assim, a avaliação da cinética  
398 espermática constitui-se em valiosa ferramenta que permite estabelecer previsibilidade  
399 em termos de fertilidade do sêmen [24,25].

400 A eficácia de um protocolo de criopreservação espermática afere-se também  
401 pela proporção de espermatozoides íntegros após a descongelação, condição essa  
402 decorrente da preservação da estrutura das suas membranas plasmática [24] e  
403 acrossomal [26]. Nesse contexto, todos os parâmetros morfofuncionais relacionados à  
404 IMPA avaliados por citometria de fluxo no T0, apresentaram-se igualmente  
405 preservados, não sendo evidenciadas diferenças entre G e GC, fato sugestivo de que as  
406 membranas plasmáticas e acrossomal foram preservadas, como também relataram  
407 Tatemoto et al. [9] para a situação experimental semelhante, possivelmente em virtude  
408 de a análise ter sido realizada em seguida ao descongelamento do sêmen.

409 No T90, a presença da caseína, presumivelmente, incrementou as interações  
410 com as BSP do plasma seminal propiciando menor perda de lipídio da membrana  
411 plasmática durante o procedimento de criopreservação [4,1], como também, pela mesma  
412 razão, apresentou maior concentração de células espermáticas sem desestabilização e  
413 sem a translocação de fosfatidilserina da membrana, como se verificou pela diferença  
414 evidenciada entre os grupos, mais expressiva no GC, fato não observado no T0 por  
415 causa do tempo da análise.

416 O processo de criopreservação pode produzir injúrias irreversíveis às células  
417 espermáticas, particularmente aquelas impostas às condições estruturais de suas

418 membranas plasmática e acrossomal, implicando em redução significativa da sua  
419 capacidade fecundante [27]. Em razão disso, é pertinente a preocupação com o uso de  
420 diluente que sejam adequados para manter a qualidade espermática antes e após o  
421 processo de criopreservação.

422 As avaliações de concentração de  $O_2^-$  evidenciaram maior quantidade de EROS  
423 no G tanto no T0 quanto no T90. Sendo o primeiro subproduto da cadeia respiratória,  
424 caracteriza-se por ser pouco reativo e não é capaz de transpassar as membranas  
425 lipídicas, atuando apenas no sítio de produção [28,29,30]. De modo semelhante,  
426 Stradaoli et al. [31] descreveram que o diluente à base de gema de ovo apresentou  
427 menor capacidade de neutralizar as EROS. Baixas concentrações das EROS são  
428 essenciais para a realização de algumas atividades orgânicas, incluindo a estabilização  
429 da membrana mitocondrial em bovino, porém quando em elevadas, têm efeito  
430 prejudicial a todas as estruturas e funções celulares [32]. Portanto, as EROS foram  
431 apontadas por Michael et al. [33] como as principais causadoras da deterioração da  
432 qualidade do sêmen justificando-se, portanto, especular se a quantificação das EROS  
433 e/ou peroxidação lipídica, poderá representar uma técnica eficiente de avaliação da  
434 qualidade espermática [34].

435 Observou-se uma relação entre a produção de  $O_2^-$  e APM de tal modo que o  
436 aumento ou diminuição de uma, é acompanhado da outra no mesmo sentido. Assim, os  
437 valores inferiores observados para GC em relação ao G, permitem inferir-se que a  
438 participação do caseinato de sódio conferiu maior controle da atividade metabólica  
439 refletindo menor produção de  $O_2^-$ . Uma relação dessa natureza, entre EROS e APM foi  
440 também relatada por Evenson et al. [35].

441 Relatou-se a possibilidade de existir associação entre a cadeia respiratória dos  
442 espermatozoides e a produção das EROS e que ocorreria na peça intermediária, em  
443 virtude da grande quantidade de mitocôndrias, necessárias para o fornecimento  
444 constante de energia para manter a motilidade espermática. Nesse contexto, há a  
445 participação da NADH óxido-redutase dependente que irá liberar as EROS para o  
446 compartimento celular. Assim sendo, possivelmente a produção das EROS esteja  
447 associada à APM dos espermatozoides[29].

448 Ao observar a APM analisada por Florez-Rodriguez et al. [36], constatou-se  
449 que diluente à base de leite desnatado produziu resultados semelhante ao obtido para  
450 GC. Já, Tatemoto et al. [9] constatou que o diluente que apresentou a melhor capacidade

451 de promover a integridade mitocondrial apresentava concentração de caseinato de sódio  
452 entre 0,25% a 1,0%, resultado esse semelhante ao diluente do grupo GC com 2% de  
453 caseinato de sódio. Desse modo, constatou-se que os diluentes contendo leite ou  
454 caseinato de sódio colaboraram para que o APM fosse mantido, possivelmente por  
455 promoverem estabilidade da membrana plasmática dos espermatozoides e controle da  
456 atividade metabólica em virtude das ligações do caseinato com os íons  $\text{Ca}^{+2}$  [1,7].

457 No grupo GC observou-se menor atividade do  $\text{O}_2^-$  acompanhada de menor APM  
458 no T0, o que pode significar menor atividade metabólica e menor produção de  $\text{O}_2^-$ ,  
459 portanto, insuficientes para que ocorressem diferenças entre G e GC na IMPA e nos  
460 processos que antecedem a capacitação. Os fatos foram confirmados pela menor  
461 população das células espermáticas sem desestabilização e sem translocação de  
462 fosfatidilserina da membrana. Porém no T90, verificou-se diferença na IMPA, SDM e  
463 STF mais evidente no GC. Logo, pode-se inferir que a maior longevidade das células  
464 espermáticas se deu por manutenção da integridade da membrana plasmática  
465 acompanhada de menor atividade do APH relacionada com menor concentração de  $\text{O}_2^-$   
466 e maior cinética espermática. Portanto, a concentração de  $\text{O}_2^-$  possivelmente propiciou  
467 condições desfavoráveis para manutenção da viabilidade espermática e de sua  
468 capacidade fecundante [37].

469 Os resultados da cinética espermática após o T90 corroboraram essa afirmação,  
470 na medida em que as variáveis MT, MP, VAP, VSL, VCL, ALH, BCF e RAP  
471 apresentaram diferenças mais expressivas no GC em relação ao G. Portanto, pode-se  
472 deduzir que houve otimização do metabolismo energético no GC, na medida em que o  
473 APM foi menor, porém com maior cinética espermática. Possivelmente esse achado seja  
474 em virtude das ligações dos íons  $\text{Ca}^{+2}$  com o caseinato, controlando de modo efetivo a  
475 motilidade e, por conseguinte controlando o APH e as  $\text{O}_2^-$  [1, 7, 38]. Ademais, a  
476 motilidade, presumivelmente, pode servir de indicador de estresse oxidativo, pois o  
477 decréscimo da cinética espermática é observado antes mesmo do surgimento de  
478 qualquer alteração da peroxidação lipídica [39].

479 O diluente do GC, possivelmente, retardou o processo de capacitação  
480 espermática em virtude das interações do caseinato de sódio com as BSP, criando assim,  
481 condição favorável para manutenção da capacidade fecundante durante o processo de  
482 criopreservação [4] e modulou a disponibilidade do cálcio na célula espermática por  
483 meio da afinidade deste com o caseinato [7]. O processo não se encontra totalmente

484 elucidado, porém, acredita-se que o foco principal seja a adenil ciclase que converte o  
485 ATP em AMPc. Elevadas concentrações de AMPc podem promover a desestabilização  
486 da membrana espermática favorecendo a troca de cátions (efluxo  $H^+$  e influxo de  $Na^+$ )  
487 gerando alteração no pH intracelular propiciando o influxo de  $Ca^{+2}$  que desencadeia a  
488 capacitação, hipermotilidade e reação acrossomal [37] Portanto, a IMPA, a porcentagem  
489 de células espermáticas sem desestabilização e sem translocação fosfatidilserina da  
490 membrana corroboram com os resultados detectados em favor do GC. Esses achados  
491 reforçam a necessidade de se manter, ao máximo, a qualidade espermática após o  
492 processo de criopreservação através do emprego de diluentes adequados e de  
493 suplementos, quando necessários.

494 A taxa de clivagem observada no GC (77,52%) aproximou-se à descrita por  
495 Baruselli et al. [40] de 82,6% em vacas não lactantes da raça Nelore, porém foi superior  
496 à observada por Morotti et al. [41] de 61% também na raça Nelore. A taxa de oócitos  
497 clivados convertidos em blastocistos em ambos os grupos foi superior ao relatado por  
498 Ward et al. [42], enquanto que para o GC a taxa de embriões a partir dos oócitos totais  
499 foi superior aos 40% relatados Feugang et al. [43], aos 35%, Gonçalves et al. [44] e aos  
500 30% Rizos et al. [45]. Em relação aos resultados da PIV, deve-se também considerar a  
501 possível influência da qualidade oocitária, a qual depende do estado fisiológico do  
502 animal [46].

503 Os resultados da fertilidade *in vivo* refletiram em incremento na taxa de prenhez  
504 para GC (50,10%) frente ao G (43,33%). Esses resultados foram percentualmente  
505 semelhantes aos relatados em IATF, respectivamente, por Souza et al. [47] e Pentead  
506 et al. [48] de 38,25% e 55,6%, em cujos protocolos empregou-se eCG no D8 para  
507 sincronização de ovulações, fato que atesta a eficácia tanto dos protocolos utilizados,  
508 quanto de ambos os diluentes empregados na congelamento do sêmen dos dois grupos.

509 As diferenças nas taxas resultantes dos eventos avaliados no dia 3 e no dia 8  
510 após a fecundação *in vitro* e na taxa de prenhez, superiores no GC, baseiam-se no fato  
511 de que, presumivelmente, o diluente contendo caseinato de sódio propiciou condições  
512 mais favoráveis para que ocorresse maior número de ligações dos espermatozoides com  
513 a zona pelúcida e, desse modo, incrementou a taxa de embriões e de prenhez. Ainda que  
514 o mecanismo não esteja totalmente elucidado, acredita-se que o caseinato sequestre íons  
515  $Ca^{+2}$  e nessa combinação, interaja com o glicocalix da membrana espermática e dessa  
516 forma aumente exposição de seus receptores e posterior aumento da sensibilidade para

517 as proteínas de adesão à ZP3 [8]. Possivelmente a sinalização entre espermatozoides e  
518 oócito promoverá a liberação dos íons cálcio do caseinato e sua posterior migração para  
519 interior da membrana estimulado assim a hipermotilidade espermática.

520 O caseinato de sódio adicionado ao diluidor para criopreservação de sêmen  
521 bovino incrementou a taxa de embriões e de prenhez por meio do aumento da  
522 penetrabilidade espermática nos oócitos [9], ou ainda em razão da redução do número  
523 de espermatozoides com características relacionadas à apoptose, proporcionada pelo  
524 diluente [49, 50, 51].

525 Nas células espermáticas, algumas lesões consequentes ao processo de  
526 criopreservação, podem ser atribuídas, pelo menos em parte, à exposição prolongada de  
527 espermatozoides ao plasma seminal [52, 53]. Esse incremento observado na taxa de  
528 embriões, no dia 8 do cultivo, e na taxa de prenhez, também pode ser atribuído ao efeito  
529 protetor do caseinato de sódio, que evita a ocorrência de danos à membrana plasmática  
530 e acrossomal dos espermatozoides decorrentes da exposição prolongada do sêmen às  
531 BSP durante os procedimentos de diluição [1, 54], alterações essas que levam à  
532 diminuição da capacidade de fertilização do espermatozoide [55]. Portanto, maior  
533 população de células espermáticas sem desestabilização e sem translocação das  
534 fosfatidilserina na membrana espermática identificada no GC, corrobora com esses  
535 achados.

536 Em estudo sobre alterações produzidas no material genético dos  
537 espermatozoides, Fatehi et al. [56] verificaram que com as células espermáticas assim  
538 alteradas, não ocorreram modificações no número de clivagens, porém relataram um  
539 bloqueio no desenvolvimento embrionário após o 3° dia de cultivo. Isto posto,  
540 constatou-se que o efeito crioprotetor, possivelmente superou o aparecimento daquela  
541 anormalidade observada no desenvolvimento embrionário e na taxa blastocistos no GC,  
542 como também descrevem Tatemoto et al. [9] sobre a participação do caseinato de sódio  
543 no diluente e na redução dos danos ao DNA dos espermatozoides durante o processo de  
544 criopreservação. Também se verificou incremento no tempo de sobrevivência de  
545 espermatozoides de touro congelados com o diluente contendo caseinato [57].

546 Nos processos de fecundação *in vitro* e *in vivo*, o GC apresentou maior  
547 concentração de células espermáticas íntegras e com menos alterações em decorrência  
548 do processo de criocapacitação, portanto, maior possibilidade de fertilização, uma vez  
549 que na fecundação *in vitro* os meios utilizados na FIV combinam-se com substâncias

550 capacitantes semelhantes a glicosaminoglicanos como forma de estimular a capacitação  
551 e na fecundação por IATF, aumentaria a população de células não capacitadas no útero  
552 após o descongelamento, as quais têm implicações diretas com a capacidade  
553 espermática de fecundação [27]. Além disso, acredita-se que a presença caseinato de  
554 sódio na composição do diluente, propicie otimização nos mecanismos de ligações dos  
555 espermatozoides com o oócito, em função do que, aumentam as probabilidades de  
556 ocorrência de fecundação tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

## 557 **5. CONCLUSÃO**

558 O diluente contendo 2% caseinato de sódio incrementou os principais parâmetros de  
559 cinética espermática, reduziu o número de células espermáticas com alterações semelhantes  
560 à capacitação decorrentes da congelação, reduziu APM e a produção de  $O_2^-$ , aumentou a  
561 taxa de embriões e aumentou na taxa de prenhez por IATF, permitindo-se, concluir que seu  
562 emprego na composição do diluidor resulta em sêmen com fertilidade superior.

563

## 564 **6. REFERÊNCIAS**

565 [1] Bergeron, A, Brindle Y, Blondin P, Manjunath, P. Milk caseins decrease the binding  
566 of the major bovine seminal plasma proteins to sperm and prevent lipid loss from the  
567 sperm membrane during sperm storage. Biol Reprod 2007;77:120-6.

568 [2] Amann RP, Graham JK. Spermatozoa function. In: Mckinnon AO, Squires EL,  
569 Vaala WE, Varner DD. Equine reproduction. 2nd ed. New York: Wiley-Blackwell;  
570 2011, p. 1053-84.

571 [3] Manjunath P. New insights into the understanding of the mechanism of sperm  
572 protection by extender components. Anim Reprod 2012;9:809-15.

573 [4] Plante G, Lusignian MF, Lafleur M, Manjunath P. Interaction of milk Proteins and  
574 Binder of Sperm (BSP) proteins from boar, stallion and ram semen. Reprod Biol  
575 Endocrinol 2015;13:92.

576 [5] Batellier F, Vidament M, Fauquant J, Duchamp G, Arnaud G, Yvon JM, et al.  
577 Advances in cooled semen technology. Anim Reprod Sci 2001;68:181-90.

- 578 [6] Ekhlesi-Hundrieser M, Schäfer B, Kirchhoff C, Hess O, Bellair S, Müller P, et al.  
579 Structural and molecular characterization of equine spermbinding fibronectin-II module  
580 proteins. *Mol Reprod Dev* 2005;70:45-57.
- 581 [7] Pagl R, Aurich JE, Muller-Schlosser F, Kankofer M, Aurich C. Comparison of an  
582 extender containing defined milk protein fractions with a skim milk-base extender for  
583 storage equine semen at 5°C. *Theriogenology* 2006;66:1115-22.
- 584 [8] Coutinho Da Silva MA, Seidel GE, Squires EL, Granham JK. Effects of components  
585 of semen extenders on the binding of stallion spermatozoa to bovine or equine zonae  
586 pellucidae. *Reproduction* 2012;143:577-85.
- 587 [9] Tatemoto H, Oshiro R, Shimada H, Konno T, Yamanaka K, Ashizawa K. Addition  
588 of casein to the diluents during semen transportation improves the post-thaw qualities  
589 of okinawan native Agu pig spermatozoa. Nishihara: 2015, p. 75-86.
- 590 [10] Parrish JJ, Susko-Parrish J, Winer MA, First NL. Capacitation of bovine sperm by  
591 heparin. *Biology of Reproduction* 1988;38:1171-1180.  
592
- 593 [11] Freitas-Dell'Aqua CP, Sancler-Silva YFR, Dell'Aqua Jr. JA, Papa FO. Multicolor  
594 protocol for evaluation of apoptosis or damage to the plasma membrane of the  
595 spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 2016;169:99–135<sup>a</sup>.  
596
- 597 [12] Freitas-Dell'Aqua CP, Sancler-Silva YFR, Silva-Jr ER, Dell'Aqua Jr. JA, Papa FO.  
598 Determination of intracellular and mitochondrial superoxide generation and high  
599 mitochondrial membrane potential in equine sperm using flow cytometry. *J Equine Vet*  
600 *Sci* 2016;43:69-70.
- 601 [13] Henry M, Neves JP. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal.  
602 Belo Horizonte: CBRA; 1998, p. 49.
- 603 [14] Singh M, Ghosha SK, Prasada JK, Kumara A, Tripathia RP, Bhureb SK, et al.  
604 Seminal PDC-109 protein vis-à-vis cholesterol content and freezability of buffalo  
605 Spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 2014;144:22-9.

- 606 [15] Swelum AA, Mansour HÁ, Elsayed AA, Amer HA. Comparing ethylene glycol  
607 with glycerol for cryopreservation of buffalo bull semen in egg-yolk containing  
608 extenders. *Theriogenology* 2011;76:833-42.
- 609 [16] Van Den Berg BM, Reesink J, Reesink W. TRIXcell+, a new long-term boar  
610 semen extender containing whey protein with higher preservation capacity and litter  
611 size. *Open Vet J* 2014;4:20-5.
- 612 [17] Crespilho AM, Sá Filho MF, Dell'aqua Jr JA, Nichi M, Monteiro GA, Avanziz BR,  
613 et al. Comparison of in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in  
614 egg yolk or new lecithin based extenders. *Livest Sci* 2012;149:1-6.
- 615 [18] O'flaherty C, De Lamirande E, Gagnon C. Positive role of reactive oxygen species  
616 in mammalian sperm capacitation: triggering and modulation of phosphorylation events.  
617 *Free Radic. Biol. Med.* 2006;41:528-540.
- 618 [19] Martínez-rodríguez H. Evaluation of frozen semen: traditional and new approaches.  
619 In: *Topics in bull fertility*, [www.ivis.org/bull](http://www.ivis.org/bull) [accessed 20.08.06].
- 620 [20] Farrell PB, Presicce GA, Brockett CC, Foote RH. Quantification of bull sperm  
621 characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the  
622 relationship to fertility. *Theriogenology* 1998;49:871-9.
- 623 [21] Love CC. Relationship between sperm motility, morphology and the fertility of  
624 stallions. *Theriogenology* 2001;76:547-57.
- 625 [22] Kathiravan P, Kalatharan J, Edwin MJ, Veerapandian C. Computer automated  
626 motion analysis of crossbred bull spermatozoa and its relationship with in vitro fertility  
627 in zona-free hamster oocytes. *Anim Reprod Sci* 2008;104:9-17.
- 628 [23] Broekhuijse MLWJ, Sostaric E, Feitsma H, Gadella BM. Application of computer  
629 assisted semen analysis to explain variations in pig fertility. *J Anim Sci* 2012;90:779-  
630 89.
- 631 [24] Graham JK, Mocé E. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. *Theriogenology*  
632 2005;64:492-502.



- 633 [25] Maziero RRD, Crespilho AM, Freitas Dell'Aqua CP, Dell'Aqua Jr. JA, Papa FO.  
634 Análise de sêmen bovino e sua relação com a fertilidade. Rev Bras Reprod Anim Supl  
635 2009;6:5-10.
- 636 [26] Dayem AAMH, Mahmoud KGHM, Nawito MF, Ayoub MM, Scholkamy TH.  
637 Fertility evaluation in Egyptian buffalo bulls using zona pellucida binding and in vitro  
638 fertilization assays. Livest Sci 2009;122:93-198.
- 639 [27] Papa FO, Felício GB, Melo CM, Alvarenga MA, De Vita B, Avanzi BR, et al.  
640 Effect of substituting soybean lecithin for egg yolk in an extender used for the  
641 cryopreservation of stallion semen. Anim Reprod Sci 2010;121:71-2.
- 642 [28] Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas,  
643 sistema de defesa e estresse oxidativo. Rev Assoc Med Bras 1997;43:1-16.
- 644 [29] Nordberg J, Árner ESJ. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian  
645 thioredoxin system. Free Radic Biol Med 2001;31:1287-312.
- 646 [30] Andrade ER, Melo-Sterza FA, Seneda MM, Alfieri AA. Consequências da  
647 produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos  
648 antioxidantes. Rev Bras Reprod Anim 2010;34:79-85.
- 649 [31] Stradaioli G, Noro T, Sylla L, Monaci M. Decrease in glutathione (GSH) content in  
650 bovine sperm after cryopreservation: comparison between two extenders.  
651 Theriogenology 2007;67:1249-55.
- 652 [32] Gonçalves FS, Barretto LSS, Arruda RP, Perri SHV, Mingoti GZ. Effect of  
653 antioxidants during bovine *in vitro* fertilization procedures on spermatozoa and embryo  
654 development. Reprod. Dom. Anim. 2010;45:129-135.
- 655 [33] Michael AJ, Alexopoulos C, Pontiki EA, Hadjipavlou-litina DJ, Saratsis P,  
656 Ververidis HN, Boscos CM. Effect of N-acetyl-L-cysteine supplementation in semen  
657 extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa.  
658 Reproduction in Domestic Animals 2010;45:201-207.

- 659 [34] Waterhouse KE, Gjeldnes A, Tverdal A, De Angelis PM, Farstad W, Håård M,  
660 Kommisrud E. Alterations of sperm DNA integrity during cryopreservation procedure  
661 and *in vitro* incubation of bull semen. Anim. Reprod. Sci. 2010;117:34-42.
- 662 [35] Evenson DP, Janca FC, Jost LK, Baer RK, Karabinus DS. Flow cytometric  
663 analysis of effects of 1,3-dinitrobenzene on rat spermatogenesis. J. Toxicol. Environ.  
664 1989;28:81-98.
- 665 [36] Florez-rodriguez SA, Arruda RP, Alves MBR, Affonso FJ, Carvalho HF,  
666 Lemes KM, Lançoni R, Andrade AFC, Celeghini ECC. Morphofunctional  
667 characterization of cooled sperm with different extender to use in equine-assisted  
668 reproduction. J. Equine Vet. Sci. 2014;34:911-917.
- 669 [37] Kothari S, Thompson A, Agarwal A, Du Plessis SS. Free radicals: their beneficial  
670 and detrimental effects on sperm function. Indian J Exp Biol 2010;48:425-435.
- 671 [38] Saalu L.C. The incriminating role of reactive oxygen species in idiopathic male  
672 infertility: An evidence based evaluation. Pakistan Journal of Biological Sciences  
673 2010;13:413-422.
- 674 [39] Baumber J, Ball BA, Gravance CG, Medina V, Daves-Morel MCG. The effect of  
675 reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrossomal integrity,  
676 mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. Journal of  
677 Andrology 2000;21;6:895-902.
- 678 [40] Baruselli OS, Vieira LM, Batista EOS, Ferreira RM, Sales JNS, Gimenes LU, et al.  
679 Updates on embryo production strategies. Anim Reprod 2015;12:375-82.
- 680 [41] Morotti F, Barreiros TRR, Machado FZ, González SM, Marinho LSR, Seneda  
681 MM. Is the number of antral follicles an interesting selection criterium for fertility in  
682 cattle?. Anim Reprod 2015;12:479-86.
- 683 [42] Ward F, Enright B, Rizos D, Boland D, Lonergan P. Optimization of *in vitro*  
684 bovine embryo production: Effect of duration of maturation, length of gamete co-  
685 incubation, sperm concentration and sire. Theriogenology 2002;57:2105-17.

- 686 [43] Feugang JM, Camargo-Rodríguez O, Memili E. Culture systems for bovine  
687 embryos. *Livest Sci* 2009;121:141-9.
- 688 [44] Gonçalves PBD, Barreta MH, Siqueira LC, Antoniazzi AQ. Biotecnologias da  
689 reprodução animal produção in vitro de embriões bovinos. *Ciênc Vet Tróp*  
690 2008;11:135-8.
- 691 [45] Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP, Lonergan P. Consequences of bovine  
692 oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo:  
693 implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol Reprod Dev* 2002;61:234-  
694 48.
- 695
- 696 [46] Dode MAN, Rodovalho NC, Ueno VG, Alves RGA. Number and morphology of  
697 oocytes obtained from ovaries of zebu cows according to 35 follicle size, physiological  
698 status and season. *Arch. Zootec.* 2001;50:415-418.
- 699 [47] Souza AH, Viechnieski S, Lima FA, Silva FF, Araujo R, Bó GA, et al. Effects of  
700 equine chorionic gonadotropin and type of ovulatory stimulus in timed-IA protocol on  
701 reproductive responses in dairy cows. *Theriogenology* 2009;72:10-21.
- 702 [48] Penteado L, Ayres H, Reis EL, Madureira EH, Baruselli PS. Efeito do eCG e do  
703 desmame temporário na taxa de prenhez de vacas Nelore lactantes inseminadas em  
704 tempo fixo. *Acta Sci Vet* 2004;32:223.
- 705 [49] Kasai T, Ogawa K, Mizuno K, Nagai S, Uchida Y, Ohta S, et al. Relationship  
706 between sperm mitochondrial membrane potential, sperm motility, and fertility  
707 potential. *Asian J Androl* 2002;4:97-103.
- 708 [50] Grunewald S, Said TM, Paasch U, Glander HJ, Agarwal A. Relationship between  
709 sperm apoptosis signalling and oocyte penetration capacity. *Int J Androl* 2007;31:325-  
710 30.
- 711 [51] Grunewald S, Kriegel C, Baumann T, Glander HJ, Paasch U. Interaction between  
712 apoptosis signal transduction and capacitation in human spermatozoa. *Hum Reprod*  
713 2009;24:2071-8.

- 714 [52] Srivastava N, Srivastava SK, Ghosh SK, Singh LP, Prasad JK, Kumar A, et al.  
715 Sequestration of PDC- 109 protein improves freezability of crossbred bull spermatozoa.  
716 *Anim Reprod Sci* 2012;131:54-62.
- 717 [53] Maxwell WM, De Graaf SP, Ghaoui Rel H, Evans G. Seminal plasma effects on  
718 sperm handling and female fertility. *Soc Reprod Fertil Suppl* 2007;64:13-38.
- 719 [54] Lusignan MF, Bergeron A, Crête MH, Lazure C, Manjunath P. Induction of  
720 epididymal boar sperm capacitation by pB1 and BSP-A1/-A2 proteins, members of the  
721 BSP protein family. *Biol Reprod* 2007;76:424-32.  
722
- 723 [55] Rodriguez-Villamil P, Hoyos-Marulanda V, Martins JA, Oliveira AN, Aguiar LH,  
724 Moreno FB, et al. Purification of binder of sperm protein 1 (BSP1) and its effects on  
725 bovine in vitro embryo development after fertilization with ejaculat- ed and epididymal  
726 sperm. *Theriogenology* 2016;85:540-54.
- 727 [56] Fatehi AN, Bevers MM, Schoevers E, Roelen BAJ, Colenbrander B, Gadella BM.  
728 DNA damage in bovine sperm does not block fertilization and early embryonic  
729 development but induces apoptosis after the first cleavages. *J Androl* 2006;27:176-88.
- 730 [57] Manjunath P, Bergeron A, Lefebvre J, Fan J. Seminal plasma proteins: functions  
731 and interaction with protective agents during semen preservation. *Soc Reprod Fertil*  
732 *Suppl* 2007;65:217-28.

## **Considerações Finais**

Os efeitos do caseinato de sódio no diluidor de sêmen tornaram-se evidentes quando se observa que a integridade das membranas foi melhor preservada mesmo quando desafiada pela ação deletéria da congelação e, também, pelo fato de que o desgaste metabólico das células espermáticas foi poupado por tempo maior, permitindo aos espermatozoides expressarem com vantagem a sua capacidade fecundante de modo mais duradouro. Portanto, o seu emprego seria recomendável na rotina de produção de sêmen bovino congelado. Todavia, como o mecanismo de ação do caseinato de sódio ainda não está elucidado por completo, estudos fazem-se necessários no sentido de esclarecer o seu papel nos diluidores