

**UNIVERSIDADE FEDERAL RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

DILUENTES *INRA* PARA A CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN EQUINO

Elaborado por: Felipe François Motta
Número de matrícula: 112443
Acadêmico da Faculdade de Veterinária

**Porto Alegre
2010/01**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

DILUENTES *INRA* PARA A CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN EQUINO

Elaborado por: Felipe François Motta
Matrícula: 112443

**Monografia apresentada à
Faculdade de Veterinária como
requisito parcial para obtenção
da Graduação em Medicina
Veterinária**

Orientadora: Prof. Dr. Maria Inês Mascarenhas Jobim
Co-orientador: Prof. Dr. Rodrigo Costa Mattos

**Porto Alegre
2010/01**

M391d Motta, Felipe França

Diluentes *INRA* para a criopreservação do sêmen equino. / Felipe França Motta. – Porto Alegre: UFRGS, 2010.

31 f.; il. – Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Porto Alegre, RS-BR, 2010. Maria Inês Mascarenhas Jobim, Orient.

1. Reprodução animal: eqüinos 2. Inseminação artificial: eqüinos
I. Jobim, Maria Inês Mascarenhas, Orient. II. Mattos, Rodrigo Costa, Co-orient. III. Título

CDD 619.4

AGRADECIMENTOS

À minha família, por apoiar e incentivar minhas decisões. Sem ela nada seria possível.

A todos os meus amigos, pelo enorme incentivo, convívio e apoio em todos os momentos.

À Professora Maria Inês e ao Professor Rodrigo, pela orientação e convívio.

Aos colegas do Reprolab, pelo aprendizado, amizade e saudáveis discussões.

A todos meus professores e colegas, pelo aprendizado e convívio ao longo desses cinco anos.

À Larissa Beduschi, pelo apoio e incentivo nesses últimos anos.

À UFRGS, pública e de qualidade.

RESUMO

A inseminação artificial é uma tecnologia fundamental para a produção animal. A necessidade de preservação do sêmen para uso posterior é uma exigência para o progresso desta técnica. O objetivo deste trabalho foi realizar uma revisão bibliográfica sobre a tecnologia dos diluentes empregados para o sêmen equino, desenvolvida no INRA (Instituto Nacional de Pesquisa Agrônômica - França). A tecnologia utilizada atualmente não foge muito do que se fazia para a conservação dos espermatozoides nas décadas de 40 e 50 do século passado. Esses estudos revelaram o potencial de preservação do sêmen ao longo das horas principalmente de dois produtos de origem animal: a gema do ovo e o leite. Hoje se pretende obter um meio para a criopreservação do sêmen equino, mais seguro possível em sua formulação. Os estudos são direcionados no sentido da ausência de produtos de origem animal no diluente e na presença de elementos menos variáveis e mais conhecidos quanto às suas composições. Com esse objetivo, pesquisadores do INRA analisaram os efeitos de frações do leite na sobrevivência dos espermatozoides equinos. E atualmente os esforços são no sentido da substituição da gema do ovo por fosfolipídeos arranjados como lipossomos.

Palavras-chave: Equino, inseminação artificial, diluente, leite, fosfolipídeos.

ABSTRACT

Artificial insemination is a key technology for animal production. The need for preservation of semen for later use is a requirement for progress in this technique. This study objective is to review existing literature on the technology of extenders for equine semen developed at INRA (National Institute of Agronomic Research - France). The technology used today is not far from what was used in the spermatozoa conservation in the 1940's and 50's. These studies revealed the potential of two main products of animal origin: egg yolks and milk, which could preserve semen through hours or days. Nowadays, what is aimed is the development of a means of freezing equine semen, as safe as possible in its formulation. The studies are focused on eliminating animal products of the extender and in the use of less variable elements with a better known composition. With this objective, the INRA researchers analyzed the effects of milk fractions on equine spermatozoa survival. And efforts are also concentrated on the replacement of egg yolk for phospholipids arranged as liposomes.

Key-words: Equine, artificial insemination, extender, milk, phospholipids.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Reagentes do diluente comercial INRA82.....	14
Tabela 2 - Reagentes do diluente Hank's Glicose e Lactose Lactose (HGLL).....	14
Tabela 3 - Reagentes do diluente Hank's Hepes (HH).....	15
Tabela 4 - Análise físico-química das frações líquidas do leite.....	16
Tabela 5 - Proteínas solúveis do leite.....	20

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Demonstrativo das frações obtidas do leite.....	12
Figura 2 -	Porcentagem de espermatozoides rápidos após conservação durante 48 horas a 4°C ou a 15°C nas frações líquidas do leite.....	17
Figura 3 -	Porcentagem de espermatozoides rápidos após conservação durante 48 horas a 4°C ou a 15°C nas frações do leite PPCN e proteínas solúveis.....	17
Figura 4 -	Porcentagem de espermatozoides rápidos após a conservação durante 48 horas a 4°C ou a 15°C nas frações do leite <i>alfa</i> lactalbumina, <i>beta</i> lactoglobulina, PPCN e caseína <i>beta</i>	18
Figura 5 -	Porcentagem de espermatozoides rápidos após conservação durante 48 horas a 4°C no leite submetido a diferentes tratamentos térmicos.....	19

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	09
2	HISTÓRICO.....	10
2.1	Da inseminação artificial ao uso dos diluentes.....	10
3	LEITE.....	11
3.1	Fracionamento do leite.....	11
3.1.1	Os experimentos com as frações do leite.....	12
3.1.2	Diluentes de referência e novos diluentes testados.....	13
3.1.3	Análise físico-química e impurezas nas frações do leite.....	15
3.2	Experimentos com as frações do leite.....	16
3.2.1	Experimentos iniciais.....	16
3.2.2	Tratamento térmico.....	18
3.2.3	Ultrafiltrado.....	19
3.2.4	Proteínas solúveis e <i>beta</i> lactoglobulina.....	19
3.2.5	<i>Alfa</i> lactalbumina.....	20
3.2.5.1	As <i>alfa</i> lactalbuminas de diferentes origens.....	21
3.2.6	Fosfocaseinato nativo e caseína <i>beta</i>	22
3.2.7	Mistura das três caseínas do leite.....	22
3.2.8	Fração rica em fosfolipídeos.....	23
3.3	Estrutura micelar nativa das caseínas.....	23
3.4	Conservação do sêmen equino pela fração PPCN.....	24
3.5	Experimentos <i>in vivo</i>.....	24
3.6	Um diluente para resfriamento de sêmen equino.....	25
4	UM DILUENTE PARA CONGELAMENTO DE SÊMEN EQUINO.....	25
4.1	Comparação INRA82 x INRA96.....	25
4.2	Glicerol e o plasma da gema do ovo esterilizado.....	25
4.3	Membrana plasmática e fosfolipídeos exógenos.....	26
4.4	Dos fosfolipídeos exógenos aos lipossomos.....	26
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	28
	REFERÊNCIAS.....	29

1 INTRODUÇÃO

O agronegócio cavalo gera 642,5 mil empregos diretos, ficando na frente de segmentos como o comércio atacadista, correios e a indústria automotiva. Os postos de trabalho indiretos chegam a 2,6 milhões. Já as exportações desta atividade em 2009 totalizaram US\$ 27,4 milhões, receita superior a de produtos como café torrado e cachaça (CNA, 2010).

Nesse contexto, o uso de tecnologias como a inseminação artificial torna-se fundamental, e a necessidade da preservação do sêmen para posterior utilização é uma exigência para o progresso de alguns setores da equinocultura.

Os estudos nas décadas de 40, 50 revelaram o potencial de preservação do sêmen ao longo das horas, principalmente de dois produtos de origem animal: a gema do ovo e o leite. Atualmente as investigações estão direcionadas no sentido da ausência de produtos de origem animal no diluente e na presença de elementos menos variáveis e mais conhecidos quanto às suas composições.

O leite tem uma composição variável conforme a espécie animal, idade, estágio da lactação, estação do ano, alimentação e condições de ordenha. Por isso, pesquisadores do INRA (Instituto Nacional de Pesquisa Agronômica - França) analisaram os efeitos de frações do leite na sobrevivência dos espermatozoides de equinos. Esses estudos levaram a utilização de uma fração do leite em diluentes comerciais substituindo o uso do leite UHT (BATELLIER et al., 1997b).

Com relação à gema de ovo, atualmente já é utilizado o plasma da gema do ovo esterilizado como substituinte. Entretanto, ainda é um elemento de origem animal e que pode sofrer variações. Com isso, evidências da participação de fosfolipídeos exógenos na proteção dos espermatozoides (QUINN et al., 1980) levaram a hipótese do uso de lipossomos nos meios de preservação do sêmen equino criopreservado para substituir o uso da gema de ovo (PILLET et al., 2009).

2 HISTÓRICO

2.1 Da inseminação artificial ao uso dos diluentes

Os primeiros registros sobre a inseminação artificial são encontrados em um antigo conto árabe datando de 1322. A história diz que um chefe de uma tribo, que cobiçava o garranhão de uma tribo rival, consegue obter o sêmen deste garranhão e inseminar uma égua sua logrando então um produto saudável e belo (ALLEN, 2005).

Entretanto, foi Spallanzani em 1784 quem teve os primeiros resultados devidamente documentados através da inseminação artificial em cães. Após, Spallanzani, em 1897 Heape e outros pesquisadores de diferentes nacionalidades começaram a relatar o uso da inseminação artificial em estudos com cães, equinos e coelhos (FOOTE, 2002).

A utilização da tecnologia foi crescendo e a necessidade de preservação do sêmen para uso posterior se tornou uma exigência para o progresso da inseminação artificial. Phillips e Lardy (1940) estão entre os pioneiros no desenvolvimento dos diluentes. Com o objetivo de criar um meio nutritivo que mantivesse o sêmen bovino viável por alguns dias, eles desenvolvem uma fórmula para diluir o sêmen baseada na gema de ovo tamponada com solução de fosfato de sódio e fosfato de potássio (gema-fosfato).

Em 1941, baseados em estudos da época sobre a presença de citrato na secreção das glândulas sexuais dos animais e do homem e de que uma considerável porção da capacidade tamponante do sêmen ser devido ao citrato, Salisbury (1941) propõe um meio de preservação do sêmen contendo gema do ovo tamponado com solução de citrato de sódio. Além de propor o meio de conservação, Salisbury faz uma comparação entre os meios gema-citrato e gema-fosfato, proposto por Phillips e Lardy (1940). Os resultados da comparação mostraram uma melhor preservação da motilidade *in vitro*, a partir do sexto dia de conservação e a ausência de diferenças significativas entre o uso dos dois diluentes nos resultados *in vivo*. De qualquer maneira, o meio citrato-gema apresenta a vantagem de não necessitar a rediluição do sêmen para a análise microscópica, o que em meio gema-fosfato é imprescindível, pela impossibilidade de visualização dos espermatozóides neste meio.

No final da década de 1940, os estudos de Foote e Bratton (1949), comprovados por Vandemark (1950), dão mais um passo na evolução da técnica, a partir do momento em que comprovam que a diluição deve ser realizada antes do resfriamento para se obter melhores resultados. Nesse mesmo período se discute a mudança terminológica que vem a ocorrer, na qual se adota a palavra *extender* em substituição a palavra *diluter* e é também quando

começam os estudos (ALMQUIST et al, 1949) da adição de antibióticos e os efeitos sobre a viabilidade do sêmen e o controle bacteriano.

Um pouco mais tarde, surgem os primeiros resultados que fornecem possibilidades de utilização do leite como diluente do sêmen bovino, publicados por Michajilov, em 1950, da antiga Tchecoslováquia (THACKER E ALMQUIST, 1953). Thacker e Almquist, com o objetivo de produzir um diluente mais econômico, prático e de fácil preparação, realizaram a comparação entre o diluente a base do leite bovino e o gema-citrato e não encontraram diferenças significativas tanto com relação a parâmetros de fertilidade *in vitro* como *in vivo* entre os meios.

3 LEITE

O leite tem uma composição variável conforme a espécie animal, idade, estágio da lactação, estação do ano, alimentação e condições de ordenha. Todavia, levando em consideração o leite UHT que é fruto de uma mistura originária de vários animais, ele tem uma composição mais estável. O leite consiste basicamente em uma emulsão de gordura em uma solução aquosa contendo proteínas, lactose, sais minerais e pequenas quantidades de enzimas e vitaminas (BATELLIER, et al., 1997b).

Entre os primeiros estudos que trazem algumas informações sobre quais os constituintes do leite que implicariam nas propriedades de conservação do sêmen, a baixa temperatura (4°C) ou crio preservação, estão os realizados em 1954 na Pensilvânia (ALMQUIST et al). Neste estudo, já se verificou a inexistência de diferenças significativas quanto à qualidade do sêmen conservado em leite desnatado ou em leite integral, o que já evidenciava não serem os lipídeos do leite responsáveis pelas suas propriedades protetoras (BERGERON E MANJUNATH, 2006).

A hipótese de que são as micelas da caseína as principais responsáveis pelo efeito crio protetor do leite é bem aceita. Há relatos de estudos que demonstram que as micelas de caseína isoladas do leite podem proteger o sêmen refrigerado de diferentes espécies animais e adicionadas de glicerol podem conservar o sêmen bovino congelado (BERGERON E MANJUNATH 2006).

3.1 Fracionamento do leite

Baseado nas evidências de que determinadas partes do leite seriam as responsáveis

pela criopreservação, pesquisadores do INRA (*Institut National de la Recherche Agronomique*) analisaram os efeitos de frações do leite na sobrevivência dos espermatozoides equinos. Esse experimento passa a ser descrito mais detalhadamente (BATELLIER et al., 1997b).

3.1.1 Os experimentos com as frações do leite

Em todos os experimentos realizados no INRA foram utilizados oito garanhões de fertilidade comprovada, com todos os ejaculados com motilidade acima de 60 %. Cada experimento foi conduzido com no mínimo seis ejaculados de cada garanhão (BATELLIER et al., 1997b).

O fracionamento do leite foi realizado através de membranas de microfiltração. As frações foram obtidas do leite cru desnatado e purificado através de uma membrana de microfiltração com poros de diâmetro de 1,4 microm (BATELLIER et al., 1997b, p. 25).

A **figura 1** descreve a obtenção das frações do leite (BATELLIER et al., 1997b).

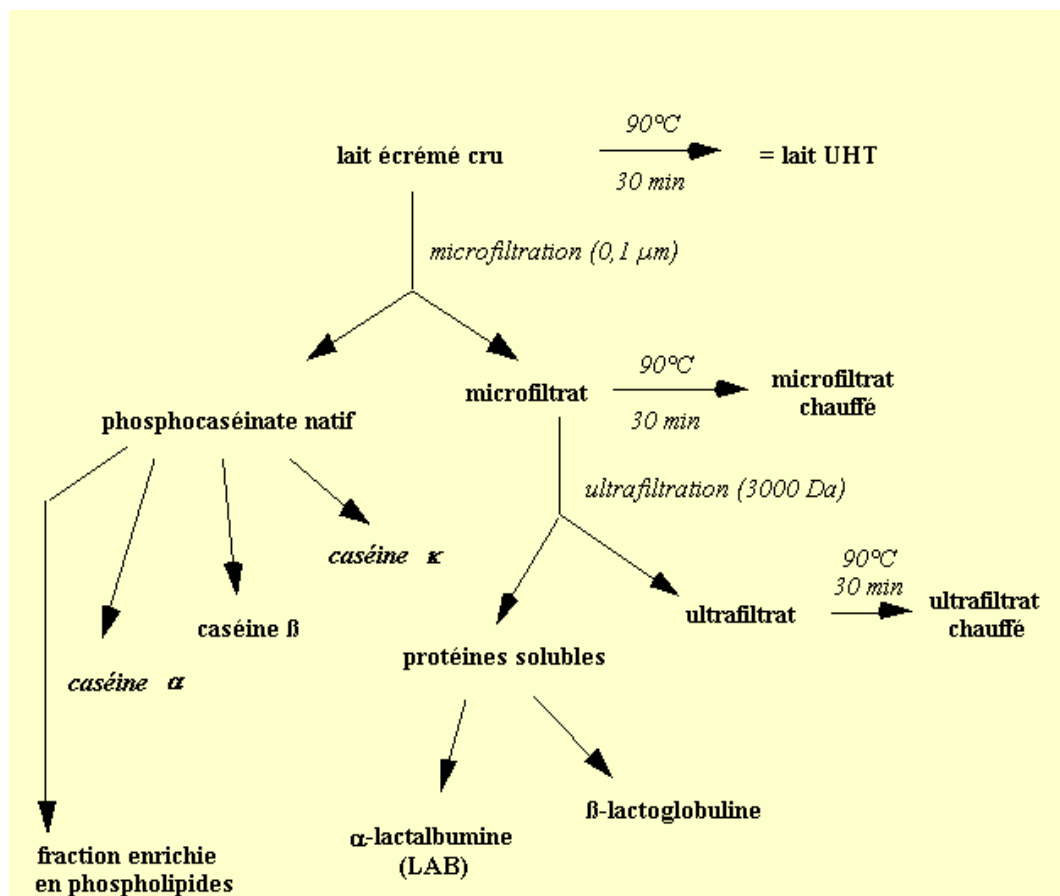


Figura 1: Demonstrativo das frações obtidas do leite.

Fonte: BATELLIER et al (1997b).

Batellier et al (1997b) descreve a obtenção das frações do leite (**Figura 1**) conforme o que segue abaixo:

1. Um aquecimento a 90°C por 30 minutos permitiu a obtenção do Leite UHT.
2. Através de uma microfiltração (0,1 microm) se obteve o fosfocaseinato nativo (PIERRE, 1992).
3. Da fração fosfocaseinato nativo pôde purificar-se a caseína beta, já a caseína *alfa* e *kapa*, também presentes na fração fosfocaseinato nativo, foram obtidas a partir da empresa Sigma.
4. A partir do microfiltrado pode-se obter o microfiltrado aquecido (90°C por 30 minutos) e realizar a ultrafiltração.
5. Na ultrafiltração são separadas as proteínas solúveis: alfa lactalbumina e beta lactalbumina, e se obteve o ultrafiltrado aquecido (90°C por 30 minutos).
6. A alfa lactalbumina utilizada nos experimentos foi de três origens distintas. Uma proveniente do soro do leite cru desnatado através da coagulação enzimática das caseínas (LAA). A outra através da microfiltração e ultrafiltração do leite cru desnatado (LAB). E a terceira, testemunha ou controle, obtida da empresa Sigma (LAS).

3.1.2 Diluentes de referência e novos diluentes testados

Os meios para preservação do sêmen utilizados foram divididos em dois grandes grupos. Os diluentes que serviram de referência ou controle e os novos meios propostos a partir do fracionamento do leite desnatado cru (BATELLIER et al., 1997b, p. 30).

Os diluentes utilizados como referência são apresentados nas **Tabelas 1, 2 e 3**:

1. Leite desnatado UHT.
2. INRA 82, constituído por metade leite desnatado e a outra metade por uma solução contendo citrato e glicose.
3. HGLL: solução de sais de Hank's, glicose (67 mM), lactose (126 mM), suplementada ou não por BSA (1%).
4. HH, solução de sais de Hank's adicionada de HEPES (solução tampão) e suplementada com BSA (1%).

Tabela 1: Reagentes do diluente comercial INRA82.

Constituinte	Quantidade
Leite UHT desnatado	500 ml
Glicose C ₆ H ₁₂ O ₆	25 g
Lactose C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ , H ₂ O	1,5 g
Rafinose C ₁₈ H ₃₂ O ₁₆ , 5 H ₂ O	1,5 g
Citrato de sódio Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ , 2 H ₂ O	0,25 g
Citrato de potássio K ₃ C ₆ H ₅ O ₇ , H ₂ O	0,41 g
HEPES C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S	4,76 g
Água destilada	qsp 1000 ml

Fonte: Adaptado de BATELLIER et al (1997b).

Tabela 2: Reagentes do diluente Hank's Glicose Lactose Lactose (HGLL).

Constituinte	Quantidade
CaCl ₂	0,14 g
KCl	0,4 g
KH ₂ PO ₄	0,06 g
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	0,2 g
NaCl	1,25 g
Na ₂ HPO ₄ , 12 H ₂ O	0,118 g
NaHCO ₃	0,35 g
HEPES	4,76 g
Glicose C ₆ H ₁₂ O ₆	13,21 g
Lactose C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ , H ₂ O	45,39 g
Água destilada	qsp 1000 ml

Fonte: Adaptado de BATELLIER et al (1997b).

Tabela 3: Reagentes do diluente Hank's Hepes (HH).

Constituinte	Quantidade
CaCl ₂	0,14 g
KCl	0,4 g
KH ₂ PO ₄	0,06 g
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	0,2 g
NaCl	8 g
Na ₂ HPO ₄ , 12 H ₂ O	0,118 g
NaHCO ₃	0,35 g
Glicose C ₆ H ₁₂ O ₆	1 g
HEPES	4,76 g
Água destilada	qsp 1000 ml

Fonte: Adaptado de BATELLIER et al (1997b).

Já os novos meios propostos a partir dos resultados do fracionamento do leite foram agrupados em dois grupos. O primeiro grupo foi das frações líquidas diretamente utilizadas como diluentes, suplementadas ou não. São eles: leite desnatado cru; leite desnatado após aquecimento por 30 minutos a temperatura de 90°C; o microfiltrado; microfiltrado após aquecimento por 30 minutos a temperatura de 90°C; ultrafiltrado aquecido (por 30 minutos a temperatura de 90°C) ou não, suplementado ou não por 1% de BSA, suplementado ou não pela fração PPCN (fosfocaseinato nativo), suplementado ou não por glicose (67 mM).

O segundo grupo se constitui das frações protéicas sob a forma seca utilizadas em diferentes concentrações, individualmente ou misturadas, suplementando um diluente composto a base de HGLL. Então, as frações são: PPCN (fosfocaseinato nativo), as caseínas alfa, beta e kappa, a beta-lactoglobulina, a fração rica em fosfolipídeos e a alfa-lactalbumina (BATELLIER et al., 1997b, p. 31). A apresentação dos diluentes propostos a base de HGLL se deu da seguinte maneira: HGLL-fração (X g/l).

Em todos os diluentes formulados, o pH e a osmolaridade foram medidos e, havendo necessidade, adequados as condições ideais, pH 7,1 e 280 a 300 mosm. Após a composição dos diluentes, foi adicionado penicilina e gentamicina antes do congelamento para conservação e uso ao longo dos experimentos propostos.

3.1.3 Análise físico-química e impurezas nas frações do leite

Foi realizada uma análise físico-química das frações líquidas do leite, a qual é apresentada no quadro abaixo.

Tabela 4: Análise físico-química das frações líquidas do leite.

Diluente	Nitrogênio total x 6,38 (g/kg)	Lactose (g/L)	Osmolaridade (mosm)	pH
Leite desn. Cru	35	50	272	6,8
Microfiltrado	4,9	50	262	6,7
Microfiltrado aquec.	3,8	50	263	6,7
Ultrafiltrado	1,9	47	253	6,7

Fonte: Adaptado de BATELLIER et al (1997b).

Além da análise físico-química, também foi realizada uma análise através de géis de eletroforese, o que evidenciou a presença de impurezas. Na fração PPCN ficou demonstrada a presença majoritária de caseínas (conforme o objetivo da microfiltração), mas também a contaminação com *beta* lactoglobulina, BSA e outras proteínas de alto peso molecular. Nas frações de caseína *alfa*, *beta* e *kapa*, ao se examinar em uma primeira coloração (*blue de coomasie*), elas se apresentavam aparentemente purificadas, porém em nitrato de prata, que permite a coloração de um maior número de bandas protéicas, foi verificada a presença de proteínas de alto peso molecular e *beta* lactoglobulina na fração caseína *kapa* (BATELLIER et al., 1997b, p. 44).

O microfiltrado contém uma pequena quantidade de caseínas e todas as outras proteínas presentes no leite desnatado cru utilizado na mesma proporção. A fração *alfa* lactalbumina apresentou-se contaminada por uma quantidade importante de *beta* lactoglobulina.

E em ambas as colorações, *blue de coomasie* e nitrato de prata, não foi evidenciada a presença de proteínas na fração ultrafiltrado.

3.2 Experimentos com as frações do leite

3.2.1 Experimentos iniciais

Uma série de experimentos iniciais foi conduzida na tentativa de uma primeira

identificação das frações do leite mais implicadas na preservação do sêmen (**figuras 2**). Esses resultados direcionaram a proposição de novos experimentos (BATELLIER et al., 1997b, p. 48).

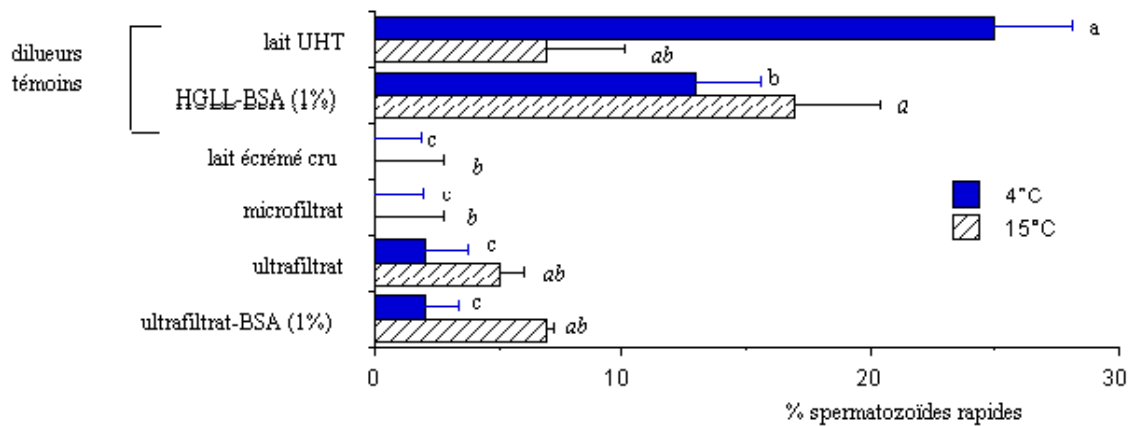


Figura 2: Porcentagem de espermatozoides rápidos após conservação durante 48 horas a 4°C ou a 15°C nas frações líquidas do leite.
Fonte: BATELLIER et al (1997b).

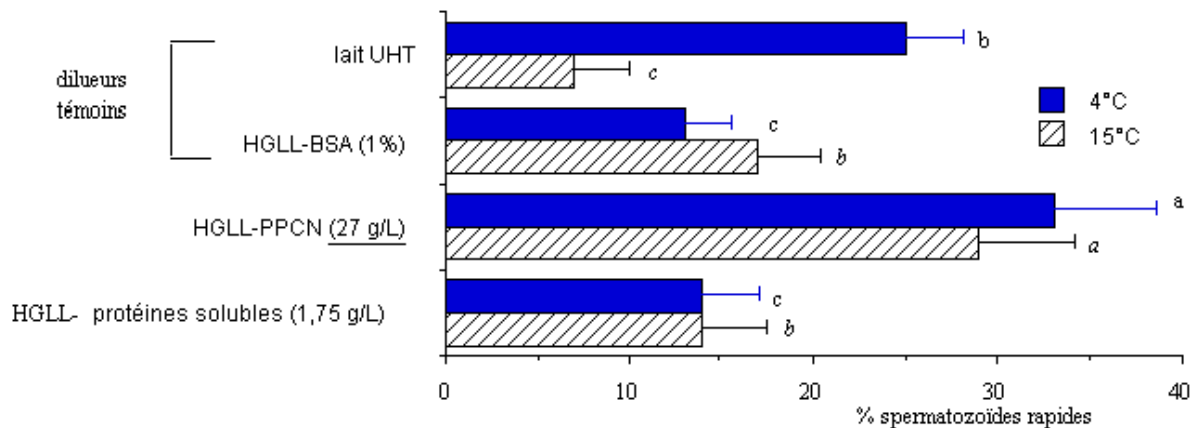


Figura 3: Porcentagem de espermatozoides rápidos após conservação durante 48 horas a 4°C ou a 15°C nas frações do leite PPCN e proteínas solúveis.
Fonte: BATELLIER et al (1997b).

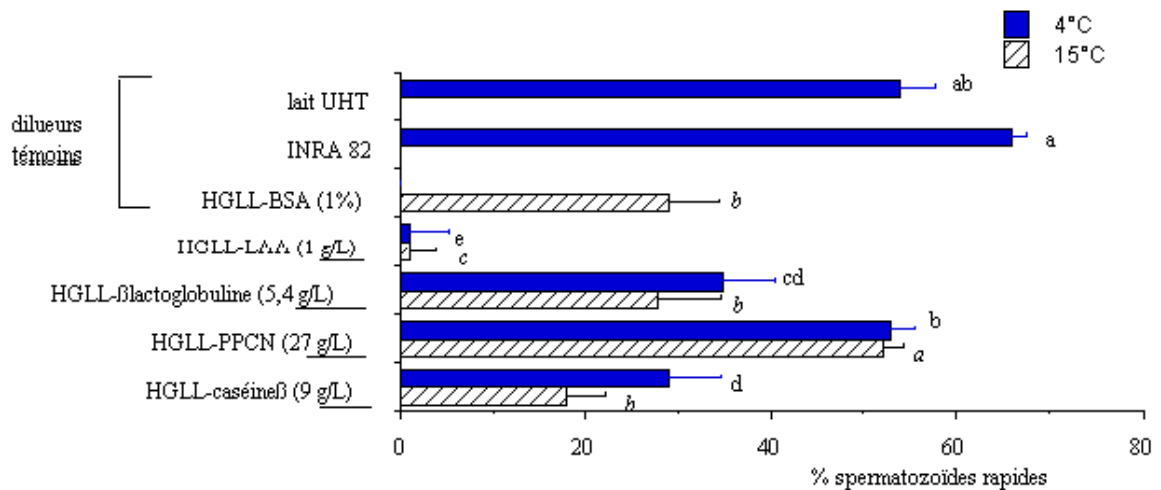


Figura 4: Porcentagem de espermatozoides rápidos após a conservação durante 48 horas a 4°C ou a 15°C nas frações do leite *alfa* lactalbumina, *beta* lactoglobulina, PPCN e caseína *beta*.
Fonte: BATELLIER et al (1997b).

As diferenças entre o leite desnatado cru (morte dos espermatozóides) e leite UHT levaram a estudos sobre os efeitos de diferentes tratamentos térmicos em relação as propriedades conservadoras do leite.

A presença de efeitos negativos de determinadas frações (*alfa* lactalbumina, microfiltrado e ultrafiltrado) conduziram a busca na determinação dos mecanismos de ação desses efeitos. Os efeitos positivos da fração PPCN possibilitaram a busca da otimização dessas propriedades.

E o efeito intermediário de duas frações, *beta* lactoglobulina e caseína *beta*, também permitiram a investigação da possibilidade de otimização desses efeitos.

3.2.2 Tratamento térmico

O experimento delineado para verificação de um adequado tratamento térmico para a utilização do leite como diluente seguiu um grau de temperatura no qual cada uma delas corresponde a inativação de determinadas enzimas. Foi verificado que é necessária uma temperatura de 90°C para se destruir os elementos termo-sensíveis tóxicos ao sêmen equino presentes no leite.

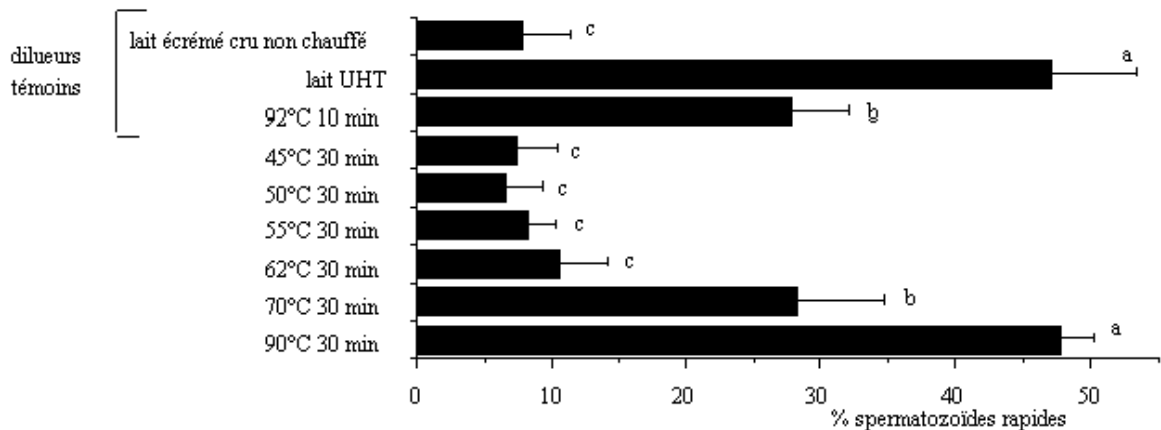


Figura 5: Porcentagem de espermatozoides rápidos após conservação durante 48 horas a 4°C no leite submetido a diferentes tratamentos térmicos.

Fonte: BATELLIER et al (1997b).

3.2.3 Ultrafiltrado

Quanto ao ultrafiltrado, três hipóteses são passíveis de serem consideradas QUANTO aos seus efeitos negativos: a presença de elementos danosos ao sêmen, ausência de elementos favoráveis a conservação ou ambos (BATELLIER et al., 1997b, p. 50).

Então, alguns experimentos foram realizados na tentativa de esclarecer um pouco os efeitos do ultrafiltrado sobre os espermatozoides. Através da formulação do meio ultrafiltrado-BSA (1%), ajuste do pH e da osmolaridade e suplementação com glicose, nada pode se constatar quanto aos possíveis efeitos do ultrafiltrado sobre os espermatozoides nas 48 horas a 15°C (BATELLIER et al., 1997b, p. 51).

Entretanto, quando o meio ultrafiltrado-BSA foi suplementado com PPCN, foi determinado que existe um componente tóxico aos espermatozoides na conservação a 15°C, pois as propriedades protetoras do PPCN não foram verificadas. Isso não ocorreu aos 4°C. Acredita-se que devido aos espermatozoides apresentarem um metabolismo mais lento aos 4°C, eles não sofrem os efeitos dessa toxicidade (BATELLIER et al., 1997b, p. 51-52).

3.2.4 Proteínas solúveis e *beta* lactoglobulina

O próximo passo na sequência de experimentos, visando um meio de conservação com elementos mais definidos, foi a verificação da ação das proteínas solúveis (**Tabela 5**) e da *beta* lactoglobulina no meio base HGLL conservando o sêmen nas temperaturas de 4°C e

15°C (BATELLIER et al., 1997b, p. 56).

Os comparações feitas entre diferentes concentrações de proteínas solúveis e *beta* lactoglobulina no meio base HGLL mostraram que as concentrações ideais para a conservação do sêmen a 4°C são, respectivamente: 20 g/L (4 vezes mais que a concentração encontrada no leite), 45 g/L (16 vezes a concentração presente no leite). Para uma conservação a 15°C, as concentrações ideais são: 6 g/L de proteínas solúveis (a mesma encontrada no leite) e 15 g/L de *beta* lactoglobulina (6 vezes a concentração original do leite). Apenas a concentração ideal de *beta* lactoglobulina pôde permitir a obtenção de resultados superiores aos encontrados no leite, as outras concentrações ideais não superaram os resultados obtidos com o leite (BATELLIER et al., 1997b, p. 59).

Tabela 5: Proteínas solúveis do leite.

Proteínas Solúveis	Concentração g/L
β-lactoglobulina	2,7
α-lactalbumina	1,2
BSA	0,25
Immunoglobulinas	0,65
Proteoses peptonas	0,6
TOTAL	5,4

Fonte: Adaptado de BATELLIER et al (1997b).

3.2.5 Alfa lactalbumina

A seguir procedeu-se a análise do efeito negativo encontrado com a fração *alfa* lactalbumina nos estudos preliminares. Como estes estudos revelaram uma possível toxicidade da *alfa* lactalbumina, buscou-se primeiro verificar se essa diminuição no parâmetro motilidade (*spermatozoïde rapides*) é acompanhada de algum prejuízo para a vitalidade da célula (BATELLIER et al., 1997b, p. 60).

Para tanto, através de uma coloração de eosina foi parcialmente elucidada a toxicidade da *alfa* lactalbumina. Essa toxicidade se traduz em uma diminuição dos espermatozóides rápidos associada a modificações de permeabilidade de membrana. A concentração da *alfa* lactalbumina no meio diluente influenciou a porcentagem de espermatozóides afetados pelo efeito tóxico (BATELLIER et al., 1997b, p. 61).

Entretanto, quando testada a toxicidade da *alfa* lactalbumina nos meios diluentes HGLL-PPCN (27 g/L) e leite UHT, houve provavelmente uma inibição do efeito tóxico e não foram verificadas diferenças significativas entre as análises após a conservação aos 4°C e aos

15°C com ou sem *alfa* lactalbumina (BATELLIER et al., 1997b, p. 62).

A fração *alfa* lactalbumina (LAA) obtida através de coagulação enzimática das caseínas é susceptível a contaminação por macro peptídeo da caseína (*caséino macro peptide*). Dessa maneira, foi realizado um experimento para verificar a toxicidade da *alfa* lactalbumina independente do macro peptídeo da caseína. Os resultados apontaram que o macro peptídeo da caseína não possui efeito tóxico e nem tão pouco efeito protetor sobre a sobrevivência dos espermatozóides. (BATELLIER et al., 1997b, p. 63)

3.2.5.1 As *alfa* lactalbuminas de diferentes origens

Ainda na busca de elucidar o efeito tóxico da *alfa* lactalbumina, foram realizadas algumas comparações entre *alfa* lactalbuminas de diferentes origens. Como descrito anteriormente, uma *alfa* lactalbumina era proveniente do soro do leite cru desnatado através da coagulação enzimática das caseínas (LAA). A outra através da microfiltração e ultrafiltração do leite cru desnatado (LAB). E a terceira, testemunha ou controle, obtida da empresa Sigma (LAS).

O primeiro estudo comparativo mostrou que a LAB e a LAA são prejudiciais à sobrevivência dos espermatozóides proporcionalmente a suas concentrações no meio diluente base (HGLL), já a LAS não apresentou toxicidade em nenhuma das concentrações testadas (1 g/L e 10 g/L) (BATELLIER et al., 1997b, p. 64).

O segundo experimento foi conduzido no sentido de verificar as alterações de membrana nos espermatozoides após a incubação no meio HGLL suplementado com as diferentes *alfa* lactalbuminas. O método utilizado foi com a PSA (*Pisum Sativum Agglutinine*), no qual há a marcação da presença ou não do acrossoma. Assim se percebeu que as alterações de acrossoma foram significativamente superiores nos meios suplementados com LAA e LAB que no meio suplementado com LAS e no controle (BATELLIER et al., 1997b, p. 66).

Ainda foi realizada uma análise descritiva qualitativa por intermédio de microscopia eletrônica dos espermatozóides após 6 horas de incubação no meio HGLL-LAA confirmando as alterações de acrossoma verificadas no estudo anterior (BATELLIER et al., 1997b, p. 66).

Outra comparação realizada entre as *alfa* lactalbuminas foi quanto ao influxo de cálcio (*marquage à l'iodure de propidium*). A ocorrência do influxo de cálcio pode indicar uma morte celular por apoptose. Normalmente, o influxo de cálcio é uma etapa da capacitação espermática, o que quando não ocorre a fecundação leva a rápida morte espermática

(BATELLIER et al., 1997b, p. 67).

Nesse teste foi observado que, a partir de uma hora de conservação, o meio HGLL-LAA (1g/L) apresenta uma maior porcentagem de espermatozóides mortos em relação aos outros meios contendo as *alfa* lactalbuminas de diferentes origens. Essa diferença é acentuada quando se examina os resultados às 6 horas de conservação (BATELLIER et al., 1997b, p. 67).

Já estudos da concentração de cálcio intracelular mostraram haver uma menor presença de cálcio intracelular nos espermatozoides mortos do que naqueles que permaneciam vivos, de acordo com os testes realizados (IP – *l'iodure de propidium* - correlacionado com marcação pelo *Fluo3 – AM*) (BATELLIER et al., 1997b, p. 69).

Considerando as evidências de que multímeros de *alfa* lactalbumina levam a apoptose celular, alguns experimentos foram conduzidos na busca de identificar esses multímeros nas diferentes *alfa* lactalbuminas. E foi verificado diferentes concentrações de multímeros nas *alfa* lactalbuminas de diferentes origens. E essas diferenças foram relacionadas a perda da fertilidade em espermatozoides conservados em meios com maior concentração de multímeros de *alfa* lactalbumina (BATELLIER et al., 1997b, p. 69-71).

Entretanto, através de estudos para detecção de alterações no DNA e, dessa maneira, caracterização da morte celular, não foi possível caracterizar a morte induzida por multímero de *alfa* lactalbumina como apoptose celular. Ou seja, a morte celular ocorre de outra forma, mas não através de apoptose (BATELLIER et al., 1997b, p. 72-73).

3.2.6 Fosfocaseinato nativo e caseína *beta*

Partindo dos resultados preliminares que indicaram um efeito positivo na conservação dos espermatozoides por parte da fração fosfocaseinato nativo (PPCN) e um efeito intermediário por parte da caseína *beta*, foram realizados experimentos no sentido de otimizar a utilização dessas frações (BATELLIER et al., 1997b, p. 74).

Foram testadas diferentes concentrações dessas frações no meio base (HGLL) e, segundo os resultados obtidos, foi verificado que a suplementação com PPCN a uma concentração 27 g/L mostrou-se como a mais eficaz (BATELLIER et al., 1997b, p. 74-77).

Já os testes realizados com a caseína *beta* não levaram a resultados satisfatórios (BATELLIER et al., 1997b, p. 79).

3.2.7 Mistura das três caseínas do leite

Como não houve um efeito positivo da *beta* caseína sozinha adicionada ao meio base, foi testado o efeito da mistura das três principais caseínas do leite na preservação dos espermatozoides (*alfa*, *beta* e *kapa*). Assim os resultados mostraram não haver uma melhora no meio de conservação com a adição da mistura das caseínas principais. Entretanto, há uma ressalva por parte dos autores destacando que as caseínas *alfa* e *kapa* são desnaturadas quando purificadas, o que pode afetar as suas funções como elementos componentes do diluente (BATELLIER et al., 1997b, p. 80).

3.2.8 Fração rica em fosfolipídeos

O próximo passo foi testar a adição da fração rica em fosfolipídeos do leite na mistura das três principais caseínas. O que foi realizado com o objetivo de examinar se essa mistura poderia restaurar a proteção presente no meio com PPCN. E conforme os testes realizados, a mistura das caseínas com a fração rica em fosfolipídeos não levou a proteção obtida com o meio HGLL-PPCN (BATELLIER et al., 1997b, p. 81).

Entretanto, devido a resultados indicando um incremento na motilidade a partir do acréscimo dos fosfolipídeos em relação ao controle, foram realizados experimentos no sentido de verificar o efeito da fração rica em fosfolipídeos quando adicionada aos meios base (HGLL e HGLL-BSA). Dessa maneira, o fração rica em fosfolipídeos se mostrou efetiva na proteção dos espermatozoides a temperatura de 4°C e com melhores resultados na concentração entre 5 e 10 g/L (BATELLIER et al., 1997b, p. 81-83).

3.3 Estrutura micelar nativa das caseínas

A seguir foram realizados tratamentos com quelantes para a destruição progressiva da estrutura micelar nativa das caseínas em diferentes meios propostos e medidos os pH's e as osmolaridades dos meios. Após essa medição, foi verificada a capacidade de preservação dos diferentes meios, excluindo os meios com pressão osmótica superior a 350 mosm e pH fora do intervalo 5,9 – 7,4. E os resultados obtidos indicam que a estrutura micelar nativa das caseínas não exerce um papel decisivo no efeito positivo da fração PPCN na conservação do sêmen (BATELLIER et al., 1997b, p. 87).

Ainda com relação à participação das caseínas na preservação do sêmen, foi realizado um estudo comparando o efeito da suplementação do meio HGLL com uma caseína comercial

(sociedade sigma, C7078), caseinato de sódio e PPCN. Assim não foram observadas diferenças significativas na conservação às temperaturas de 4°C e 15°C durante 96 horas, entre as suplementações com caseinato de sódio e PPCN, porém o meio contendo a caseína C7078 apresentou sêmen com motilidade inferior aos outros dois. Já nas 168 horas a temperatura de 15°C, o meio suplementado com PPCN foi mais eficaz na preservação dos espermatozoides em relação ao meio com caseinato de sódio, o que revela uma participação da estrutura micelar nativa das caseínas nesta temperatura (BATELLIER et al., 1997b, p. 88-89).

3.4 Conservação do sêmen equino pela fração PPCN

No sentido de verificar se a conservação do sêmen pela fração PPCN se dá pelo contato dos elementos da fração com o sêmen, foi realizado um experimento com dois compartimentos separados por uma membrana de diálise. Em um deles foi inserido sêmen e nos meios de referência (HGLL, HGLL-BSA..., além do controle - HGLL-PPCN 27g/L) e no outro o mesmo meio base suplementado com PPCN (HGLL-PPCN 27g/L). Os resultados mostraram que para a ação da fração PPCN, há necessidade do contato entre o meio e os espermatozoides (BATELLIER et al., 1997b, p. 90).

Com relação à conservação do sêmen no meio HGLL-PPCN (27 g/L) na presença ou ausência de plasma seminal, pode se ver que a ausência total de plasma seminal é prejudicial para a sobrevivência dos espermatozoides (BATELLIER et al., 1997b, p. 92). Também não houve a identificação de caseínas ligadas às membranas da célula espermática. Ainda foi verificado que não há o influxo de cálcio induzido pela preservação do sêmen no meio contendo PPCN, apesar das caseínas serem ricas em cálcio, o que é positivo, pois não há a indução da reação acrossômica. E, por fim, quanto a estrutura micelar nativa, pode se dizer que ela não é determinante, mas possui efeito benéfico aos espermatozoides.

Os experimentos sobre a participação da fração PPCN na preservação do sêmen equino resfriado comprovaram o seu efeito positivo na conservação *in vitro*.

3.5 Experimentos *in vivo*

Uma série de experimentos de fertilidade *in vivo* foram realizados com o meio HGLL suplementado com PPCN tendo como controle os meios diluente de Kenney e INRA82 comprovando os achados *in vitro*. Os resultados mostraram ainda uma melhora na fertilidade

in vivo quando conservado o sêmen no meio HGLL-PPCN à 15°C em relação a preservação à 4°C (BATELLIER et al., 1997b, p. 94-99).

3.6 Um diluente para resfriamento de sêmen equino

Esses experimentos envolvendo as frações do leite levaram a criação de um novo meio de preservação do sêmen equino resfriado, o INRA96. O uso de uma fração do leite e não do leite UHT foi um importante passo na evolução dos diluentes INRA. Observe e compare a composição dos diluentes: INRA82 e o INRA96.

INRA82 é composto pelos seguintes elementos: 0,5 g/L de solução salina de glicose; 0,5 g/L de leite desnatado UHT; o pH é ajustado em 6,8; e ainda contém 50.000 UI de penicilina e 50mL de gentamicina por litro (PILLET et al., 2007).

O INRA96 é composto pelos seguintes elementos: solução de HGLL contendo sais de Hank, glicose, lactose, tamponada por 4,76 g/L de tampão de Hepes (*Hepes buffer*) e suplementada com uma fração purificada de caseínas (*native phosphocaseinate*); o pH é ajustado para 7,1; e ainda contém 50 000 UI de penicilina, 50 mg de gentamicina e 0,25 mg de amfotericina B por litro (PILLET et al., 2007).

4 UM DILUENTE PARA CONGELAMENTO DE SÊMEN EQUINO

4.1 Comparação INRA82 x INRA96

O primeiros experimentos delineados no sentido de produzir um meio de conservação para o sêmen equino congelado foram com o objetivo de avaliar a eficácia da congelação do sêmen equino no meio INRA96 enriquecido com glicerol e gema de ovo, tendo como controle o meio INRA82 também com adição de gema de ovo e glicerol (PILLET et al., 2007).

Os primeiros resultados deram origem ao INRA Freeze, produto comercial lançado no ano de 2009. Entretanto, ainda se busca a formulação de um produto que contenha elementos mais bem definidos e que não sejam de origem animal. Isto porque o INRA Freeze contém o plasma da gema do ovo esterilizado, um elemento de origem animal e que pode sofrer variações.

4.2 Glicerol e o plasma da gema do ovo esterilizado

Quanto ao glicerol, as principais investigações são quanto à concentração ideal desse elemento nos diluentes. Em 1949, um grupo de pesquisadores ingleses descobriu a capacidade crioprotetora do glicerol. Suas tentativas na época estavam direcionadas para o uso de açúcares como crioprotetores e por um descuido realizaram esta descoberta. Os benefícios para o desenvolvimento da inseminação artificial foram muito significativos (FOOTE, 2002).

Já com relação ao plasma da gema do ovo esterilizado, os estudos estão direcionados no momento para a substituição por fosfolipídeos arranjados na forma de lipossomos.

4.3 Membrana plasmática e fosfolipídeos exógenos

As membranas são estruturas celulares particularmente vulneráveis a criopreservação. O modelo básico de uma membrana biológica é o mosaico fluido, o que se aplica a membrana do espermatozóide. Este modelo consiste em uma bicamada fosfolipídica com algumas proteínas integrais que interagem com oligossacarídeos e lipídeos formando glicoproteínas e glicolipídeos anexados na superfície celular (SINGER e NICHOLSON, 1972).

Estudos comprovam que as mudanças na temperatura modificam as estruturas da membrana celular através de alterações no estado físico dos lipídeos de membrana. Mudanças na fase lipídica de estado líquido cristalino para estado gel (e *vice-versa*) são reconhecidas como responsáveis por profundas mudanças nas propriedades das membranas (HOLT e NORTH, 1986).

A presença de fosfolipídeos exógenos previne os danos do congelamento causados a membrana plasmática dos espermatozoides. Em 1980 já se estudava essa prevenção associando-se a presença dos fosfolipídeos na superfície da membrana plasmática a diminuição dos danos às membranas (QUINN et al., 1980).

4.4 Dos fosfolipídeos exógenos aos lipossomos

A participação de fosfolipídeos exógenos na proteção dos espermatozoides levou a hipótese da utilização de lipossomos nos meios de preservação do sêmen equino congelado.

Os lipossomos fazem parte de uma área de pesquisa que vem se desenvolvendo muito nos últimos anos, a nanotecnologia. Eles são formados por lipídeos anfifílicos que, normalmente, são fosfolipídeos que são arranjados em uma ou mais bicamada(s) lipídica(s) concêntrica(s) e que guardam em seu interior um meio aquoso (PILLET et al., 2009).

Os lipossomos têm a característica de formarem mais de um tipo de vesícula

(diferentes em tamanho, estrutura e capacidade de encapsulamento), o que possibilita também haver mais de um método de preparação deles. Esta característica possibilita basicamente três formas de apresentação dos lipossomos: *MLV (Multi Lamellar Vesicles)* vesículas com mais de uma lamela e diâmetro acima de 200 nm, *SUV (Small Unilamellar Vesicles)* vesículas com apenas uma lamela e com diâmetro entre 20 e 200 nm e *LUV (Large Unilamellar Vesicles)* vesículas com apenas uma lamela, mas com diâmetro acima de 200 nm (PILLET et al., 2009).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A inseminação artificial é fundamental para a produção animal. A necessidade de preservação do sêmen para uso posterior é uma exigência para o progresso desta técnica. Isso faz com que o desenvolvimento da tecnologia dos diluentes tenha uma importância significativa nesse contexto.

Sabe-se que algumas associações de raça equina não permitem o uso da inseminação artificial. Entretanto, o conhecimento originário do uso de tecnologias da reprodução beneficia a equinocultura como um todo. Ademais, quando é permitida a utilização desses processos, eles se tornam de extrema importância para a seleção animal e melhoramento genético da raça.

O direcionamento das investigações do INRA segue dois objetivos: produzir um diluente composto por elementos que não sejam de origem animal e conseqüentemente obter uma formulação de diluente com elementos que sofram a menor variação possível em sua composição.

Esses objetivos levaram ao estudo aprofundado principalmente de dois produtos de origem animal usados na composição de diluentes na preservação do sêmen: o leite e a gema do ovo. As investigações nesse sentido trouxeram e trazem importantes benefícios para o desenvolvimento dos diluentes. Segurança no produto final; a possibilidade de se eliminar elementos danosos aos espermatozoides, assim como otimizar a utilização de meios que beneficiam a preservação do sêmen; a possibilidade de obtenção de elementos para a preservação do sêmen de outras origens e não a animal.

Enfim, significativas contribuições vêm sendo dadas a inseminação artificial equina por esta linha de pesquisa desenvolvida pelo INRA.

REFERÊNCIAS

- ALLEN, W. R. The Development and Application of the Modern Reproductive Technologies to Horse Breeding. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 40, p. 310–329, 2005.
- ALMQUIST, J. O.; GLANTZ, P. J.; SHAFFER, H. E. The effect of a combination of penicillin and streptomycin upon the livability and bacterial content of bovine semen. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 32, p. 183–190, 1949.
- ALMQUIST, J. O.; FLIPSE, R. J.; THACKER, D. L. Fertility of bovine spermatozoa in heated homogenized milk and skim milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 37, p. 1303–1307, 1954.
- BATELLIER, F.; MAGISTRINI, M.; FAUQUANT, J.; PALMER, E. Effect of milk fractions on survival of equine spermatozoa. **Theriogenology**, New York, v. 48, p. 391–417, 1997.
- BATELLIER, F. **Identification, purification et mécanisme d'action d'éléments contenus dans le lait, agissant sur les spermatozoïdes équiens**. Tese (para obter o título de Docteur de l'Université de Tours, mention Sciences de la Vie) - Université François Rabelais de Tours, UFR, Sciences et Techniques, Tours, 1997. Disponível em: <<http://.tours.inra.fr>>. Acesso em: 10 abr. 2010.
- BERGERON, A.; MANJUNATH, P. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. **Molecular Reproduction and Development**, Montreal, v. 73, p. 1338-1344, 2006.
- CNA defende crescimento do agronegócio cavalo. **Comunicação: notícias CNA**. Disponível em: <www.canaldoprodutor.com.br>. Acesso em: 20 jun. 2010.
- FOOTE, R. H. and BRATTON, R. W. The fertility of bovine semen cooled with and without the addition of citrate-sulfanilamide-yolk extender. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 32, p. 856–861, 1949.
- FOOTE, R. H. The history of artificial insemination: Selected notes and notables. **Journal of Animal Science**. Champaign, v. 80, p. 1-10, 2002.
- HOLT, W. V.; NORTH, R. D. Thermotropic phase transitions in the plasma membrane of ram spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, London, v. 78, p. 447–457, 1986.
- PHILLIPS, P. H.; LARDY, H. A. A yolk-buffer pabulum for the preservation of bull semen. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 23, p. 399–404, 1940.
- PIERRE, A.; FAUQUANT, J.; LE GRAET, Y.; PIOT, M.; MAUBOIS, J.L. Preparation de phosphocaseinate natif par microfiltration sur membrane. **Lait**, Paris, v. 72, p. 461-474, 1992.
- PILLET, E. *et al.* Development of a new extender for cryopreservation of stallion semen and mechanisms of cryoprotection involved. Tese (*abstract*) – Agrocampus Ouest, Rennes, France, 2009. Disponível em: <www.inra.fr> Acesso em: 15 abr. 2010.

PILLET, E. *et al.* Freezing stallion semen in INRA96-based extender improves fertility rates in comparison with INRA82. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 88, p. 257–265, 2008.

QUINN, P. J.; CHOW, P. Y. W.; WHITE, I. G. Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. **Journal of Reproduction and Fertility**, London, v. 60, p. 403–407, 1980.

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

SINGER S. J.; NICHOLSON G. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. **Science**, v. 175, p. 720–731, 1972.

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

VANDEMARK, N. L.; FOOTE, R. H.; BRATTON, R. W. The fertility of bovine semen in citrate-yolk extenders containing added catalase. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 33, p. 661–665, 1950.