

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo deste trabalho será disponibilizado somente a partir de 30/06/2019.

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^a Dr^a 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^a. **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^a **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[®] 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

ALH	Movimento lateral de cabeça
AMPc	3-5-Adenosina monofosfato cíclica
ATP	Adenosina trifosfato
BCF	Frequência de batimento de cauda
BSP	Plasma seminal bovino
Ca⁺⁺	Cálcio
CASA	“Computer Assisted Semen Analysis”
CAT	Catalase
CCO	Citocromo C-oxidase
CFDA	Diacetato de carboxifluoresceína
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
DAB	Diaminobenzidina
DMSO	Dimetilsulfoxido
eCG	Gonadotrofina coriônica equina
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FITC	Isotiocionato de fluoresceína
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FSH	Hormônio folículo estimulante
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
GPx	Glutathione peroxidase
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
HPM	Potencial mitocondrial
IA	Inseminação artificial
IATF	Inseminação artificial em tempo fixo
IMP	Integridade de membrana plasmática
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LH	Hormônio luteinizante

LIN	Linearidade
LPO	Peroxidação lipídica
MDA	Malondialdeído
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
mM	Milimolar
MP	Motilidade progressiva
MT	Motilidade espermática total
NaOH	Hidróxido de sódio
O₂⁻	Superóxido
OH⁻	Radical hidroxila
OH[•]	Radical hidroxila
<i>p</i>	Nível de significância
P4	Progesterona
pH	Potencial de hidrogeniônico
PI	Iodeto de propídeo
PIV	Produção <i>in vitro</i>
PSA	Psium sativum
RAP	Porcentagem de espermatozoides com movimentos rápidos
RCA	Ricinus communis
SCSA	“Sperm Chromatin Structure Assay”
SOD	superóxido dismutase
STR	Retilinearidade
VAP	Velocidade de trajeto
VCL	Velocidade curvilínea
VSL	Velocidade retilínea
ZP	Zona pelúcida

Lista de Símbolos

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

Lista de Tabela

Capítulo 01

	Página
Tabela 1: Ajuste do equipamento de análise computadorizada dos espermatozoides bovinos.50
Tabela 2: Médias \pm erro padrão das características da cinética espermática do sêmen de 30 touros no T0 e no T90 dos grupos G e GC.54
Tabela 3: 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.55
Tabela 4: Taxa de clivagem no dia 3 do cultivo (n° total de óocitos = 1.129) e de embriões no dia 8 do cultivo (n° total de embriões = 433) no teste de fertilização <i>in vitro</i> com sêmen bovino criopreservado em diluentes dos grupos G e GC.56
Tabela 5: Taxa e valores absolutos de prenhez resultantes de IATF ($n = 907$) com sêmen congelado dos grupos G e GC.56

Lista de Figuras

Capítulo 01

	Página
Figura 1: 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
Figura 2: 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
Resumo	01
Abstrac	02
1.Introdução	03
2.Revisão bibliográfica	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
3.0 Referência	27
4.0 Hipótese	42
5.0 Objetivos	43
Capítulo 01	44
Artigo científico (Utilização do caseinato de sódio na congelamento de sêmen bovino)	45
CONSIDERAÇÕES FINAIS	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 (O₂⁻) 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 F. 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.

3 – Referências¹

- 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.

¹ 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>. 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-descongelção 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 processo 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. Espermatozóides 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.; MARTÍNES-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 congelação 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.; TAINURIER, 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 α 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>. 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.

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