

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

**EFEITO DA ADIÇÃO DE CASEINATO DE SÓDIO SOBRE A
VIABILIDADE DO SÊMEN BUBALINO CRIOPRESERVADO**

FERNANDO EVARISTO DA SILVA

BOTUCATU-SP

SETEMBRO/2019

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

**EFEITO DA ADIÇÃO DE CASEINATO DE SÓDIO SOBRE A
VIABILIDADE DO SÊMEN BUBALINO CRIOPRESERVADO**

FERNANDO EVARISTO DA SILVA

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade Estadual Paulista - Unesp, Campus
de Botucatu, para obtenção do título de Mestre
no Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia Animal.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Pinheiro
Ferreira

BOTUCATU-SP

SETEMBRO/2019

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

Silva, Fernando Evaristo da.

Efeito da adição de caseinato de sódio sobre a
viabilidade do sêmen bubalino criopreservado / Fernando
Evaristo da Silva. - Botucatu, 2019

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

Orientador: João Carlos Pinheiro Ferreira

Capes: 50504002

1. Búfalo. 2. Criopreservação. 3. Preservação do sêmen.
4. Espermatozoides. 5. Caseína.

Palavras-chave: BSP; Búfalo; Caseína; Criopreservação;
Espermatozoide.

Nome do autor: Fernando Evaristo da Silva

Título: EFEITO DA ADIÇÃO DE CASEINATO DE SÓDIO SOBRE A VIABILIDADE DO SÊMEN BUBALINO CRIOPRESERVADO

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira

Presidente e Orientador

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária- FMVZ- UNESP, Botucatu/SP.

Profa. Dra. Eunice Oba

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária- FMVZ- UNESP, Botucatu/SP.

Profa. Dra. Priscilla Nascimento Guasti

Membro

Departamento de Reprodução Animal – FAEF, Garça/SP.

Data de defesa: 13 de setembro de 2019

Dedico essa dissertação aos meus pais Adão e Maria, que com muito esforço possibilitaram a realização desse trabalho.

Ao meu orientador, João Carlos Pinheiro Ferreira pela orientação, confiança e conhecimento transmitido.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que permitiu que tudo isso acontecesse e por ter colocado pessoas especiais no meu caminho.

Aos meus pais, Adão e Maria, por ser exemplo de honestidade e caráter, por todo amor, incentivo, e apoio incondicional. Amo vocês.

A minhas irmãs, que mesmo longe nunca deixaram de estar presente.

Ao meu orientador, João Carlos Pinheiro Ferreira, grande exemplo de professor, muito querido por todos que o conhecem, agradeço pela oportunidade e apoio na elaboração dessa dissertação.

Aos professores do Departamento de Reprodução Animal da Unesp – Botucatu, e especial a professora Eunice Oba por todo apoio e conversas desde o ingresso no mestrado e ao professor Frederico Ozanam Papa pelas dicas durante o experimento.

Ao professor Marc Henry, por ceder os animais para parte do projeto, pela atenção e por me acolher tão bem.

Ao José Antônio Dell’Aqua Junior pela preparação e fornecimento dos meios utilizados no projeto.

A Camila de Paula Freitas Dell’Aqua, pela realização da citometria de fluxo.

Aos funcionários do setor de Reprodução Animal da Unesp - Botucatu, do setor de Clínica e Cirurgia Veterinária da UFMG, e da central Bela Vista, pela amizade e auxílio.

Aos amigos que fiz durante esse período e espero manter por toda vida, em especial aos mais próximos Kelry, Jaqueline, Lucas, Laíza. Obrigado pela amizade, conversas e conselhos, que com certeza deixaram os momentos mais difíceis um pouco mais leves.

A Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu pela oportunidade concedida.

A Priscilla Nascimento Guasti, por todas as sugestões feitas durante as bancas de qualificação e de defesa; foram muito valiosas.

A todas as pessoas que ajudaram de alguma forma.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior –Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO	2
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
3.1. O espermatozoide	2
3.2. Membrana plasmática	3
3.3. Plasma seminal	4
3.4. Danos da criopreservação sobre a viabilidade espermática	5
3.5. Meios diluentes utilizados na criopreservação de sêmen	6
3.6. Funções do caseinato de sódio.....	7
REFERÊNCIAS	9
4. HIPÓTESE	14
CAPÍTULO 1.....	15
Resumo.....	16
Introdução.....	17
Material e métodos.....	18
Aspectos éticos.....	18
Animais	18
Experimento 1 (n=9 ejaculados)	18
Experimento 2 (n=12 ejaculados)	19
Análise seminal.....	20
1. Cinética espermática	20
2. Citometria de fluxo	21
2.1. Integridade de membranas plasmática e acrossomal.....	21
2.2. Potencial mitocondrial e superóxido	21
2.3. Peróxido de hidrogênio	22
2.4. Peroxidação lipídica.....	22
Análise estatística.....	22
Resultados.....	22
Experimento 1.....	22
Experimento 2.....	24

Discussão	27
Conclusão.....	29
Referências.....	30

RESUMO

SILVA, F. E. EFEITO DA ADIÇÃO DE CASEINATO DE SÓDIO SOBRE A VIABILIDADE DO SÊMEN BUBALINO CRIOPRESERVADO. Botucatu – SP. 2019. 42p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

O uso do sêmen refrigerado proporciona maiores taxas de prenhez se comparado ao do sêmen congelado. Essa diferença parece estar relacionada às lesões mais severas das membranas espermáticas desencadeadas pelo processo de congelação. Por sua habilidade de se ligar às proteínas ligadoras de espermatozoides e ao íon cálcio, o caseinato de sódio vem sendo estudado como uma substância capaz de inibir a capacitação espermática precoce, uma importante causa de diminuição da taxa de prenhez quando do uso de sêmen congelado. O primeiro objetivo deste estudo foi avaliar a possibilidade de um diluente comercial a base de gema de ovo, destinado à congelação de sêmen bovino, ser empregado para a criopreservação de sêmen bubalino; o segundo objetivo foi investigar o efeito do uso desse diluente, suplementado com caseinato de sódio, na criopreservação de espermatozoides bubalinos, por meio da avaliação dos espermatozoides, por citometria de fluxo, e da cinética espermática, empregando-se o sistema CASA. Na primeira parte do estudo, quando comparados os resultados das avaliações da cinética espermática e integridade das membranas plasmática e acrossomal, observou-se que o processo de congelação seminal promoveu mais danos celulares que o processo de refrigeração. Na segunda parte do estudo, não foram observados efeitos da adição do caseinato de sódio ao diluente a base de gema de ovo. A partir dos resultados do presente estudo foi possível concluir que o diluente a base de gema de ovo testado foi adequado para a criopreservação de sêmen bubalino e que a adição do caseinato de sódio não diminuiu os efeitos deletérios relacionados à criopreservação seminal.

Palavras-chave: Búfalo, Espermatozoide, BSP, Caseína, Criopreservação.

ABSTRACT

SILVA, F. E. EFFECT OF ADDITION THE SODIUM CASEINATE ON THE VIABILITY OF CRIOPRESERVED BUBALINE SEMEN. Botucatu – SP. 2019. 42. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

The use of cooled semen results in higher pregnancy rates compared than the use of frozen semen. This result seems to be related to the more severe damages triggered by the freezing process, when compared to those observed during the refrigeration. Due to its ability to bind to sperm-binding proteins and calcium ions, sodium caseinate has been studied as a substance capable to prevent early sperm capacitation, a major cause of decreased pregnancy rate after using frozen semen. The first objective of this study was to evaluate if a commercial egg yolk diluent developed for freezing bovine semen could be used for buffalo semen cryopreservation; the second objective was to investigate the effect of this diluent, added with sodium caseinate, during the procedures of buffalo sperm cryopreservation, using flow cytometry and computer-assisted sperm analysis. In the first part of the study, comparing the results of spermatocinetics and plasma and acrosomal membranes integrity, it was observed that the freezing process resulted in more cell damage than the cooling process. In the second part of the study, no effects of the addition of sodium caseinate to the egg yolk diluent were observed. From the results of the present study it was possible to conclude that the egg yolk-based diluent was suitable for buffalo semen cryopreservation and that the addition of sodium caseinate did not decrease the deleterious effects related to seminal cryopreservation.

Keywords: Buffalo, Sperm, BSP, Casein, Criopreservation.

1. INTRODUÇÃO

Há uma estimativa de que o rebanho brasileiro tenha em torno de 1,35 milhão de bubalinos; a maior parte do rebanho localiza-se na região Norte, sendo o Pará o estado com a maior população (491,290 mil), seguida pela região nordeste e sudeste (MAPA, 2017). Frente ao aumento da busca por produtos de origem bubalina, como carne, leite e seus derivados, as biotécnicas da reprodução eficientes são ferramentas importantes e que devem ser empregadas a fim de acelerar a qualidade genética e aumentar a eficiência reprodutiva do rebanho.

O manejo reprodutivo tradicional dos búfalos é a monta natural durante a estação de monta, que ocorre durante o período do ano que tem fotoperíodo negativo (estação favorável) (ZICARELLI, 1990), ou seja, quando há o decréscimo progressivo do número de horas de luz diárias. Esse fenômeno só é observado nos locais onde há essa variação na luminosidade, nas diferentes épocas do ano (regiões mais distantes da linha do Equador). A monta natural, contudo, proporciona uma baixa velocidade no melhoramento genético.

A inseminação artificial é a biotécnica de maior impacto no melhoramento genético para as espécies agropecuárias, apresentando como vantagens o controle da transmissão de doenças infectocontagiosas, controle zootécnico, racionalização do manejo reprodutivo, incremento do melhoramento genético e da produção animal, entre outras (GONÇALVES et al., 2008).

Para que seja obtida uma boa taxa de gestação, pós-inseminação artificial, o sêmen deve possuir excelente capacidade fertilizante, independente do seu uso, a fresco, refrigerado ou congelado (BRITO, 2014).

No entanto, um dos objetivos do desenvolvimento da biotecnologia é aumentar a produtividade do rebanho, sendo assim, algumas biotécnicas utilizadas em bovinos também vêm sendo utilizadas em bubalinos (BRITO, 2014).

Ao utilizar o diluidor Botu-Bov[®], Almeida (2018) avaliou a taxa de concepção do sêmen bubalino refrigerado por 24 horas ou congelado. As inseminações foram realizadas em programas de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) durante as estações reprodutivas, favorável e desfavorável. Maiores taxas de prenhez foram obtidas, independente da estação, com o emprego do sêmen refrigerado.

Com base no exposto, nota-se a necessidade de pesquisas envolvendo substâncias que possuam a capacidade de manter a integridade das membranas celulares e altos valores de motilidade espermáticas na espécie bubalina.

2. OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi investigar se o diluente comercial de congelação desenvolvido para bovinos é eficaz para a criopreservação de sêmen bubalino, e investigar o efeito da adição de caseinato de sódio a esse diluente na resposta dos espermatozoides bubalinos aos processos de criopreservação seminal.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. O espermatozoide

A espermatogênese é um processo que ocorre no interior dos túbulos seminíferos e compreende 3 etapas: a proliferação (espermatocitogênese), multiplicação (meiose) e transformação de espermátides em espermatozoides (espermioogênese) (GARNER; HAFEZ, 2004).

Após esses processos, os espermatozoides são maturados e armazenados, na cabeça e cauda do epidídimo, respectivamente (SETCHELL, 1993). Os espermatozoides desenvolvidos possuem cabeça, contendo o núcleo, peça intermediária e cauda que é responsável pela motilidade (GARNER; HAFEZ, 2004).

A cabeça, recoberta por uma estrutura chamada acrossomo, tem função de armazenar o material genético; a cauda que possui função de propiciar motilidade ao espermatozoide, é dividida em colo, peça intermediária, peça principal e peça terminal, sendo essas estruturas recobertas pela membrana citoplasmática (REICHENBACH; MORAES, 2008).

O colo é a porção entre a cabeça e a peça intermediária; a peça intermediária, revestida por uma bainha mitocondrial, é responsável por fornecer

energia necessária para a movimentação; a peça principal armazena ATP (REICHENBACH; MORAES, 2008).

3.2. Membrana plasmática

O espermatozoide é envolto pela membrana plasmática, composta por lipídeos, proteínas e carboidratos (Figura 1); devido sua permeabilidade seletiva a membrana, além de outras funções, mantém a estabilidade da concentração de íons e outros elementos nos meios extracelular e intracelular (ALMEIDA, 2006; BRANDÃO, 2008).

A membrana é uma camada bilaminar de fosfolipídios que possuem sua extremidade hidrofílica voltada para o meio extracelular ou intracelular, e a extremidade hidrofóbica, voltada para o interior da bicamada (OLIVEIRA, 2007).

Presente na estrutura molecular da membrana, o colesterol auxilia na sua estabilização e quando removido leva a uma desestabilização dessa bicamada. A concentração de colesterol da membrana está relacionada à resistência ao choque frio; quanto maior a concentração de colesterol, maior a resistência ao choque (WALES; WHITE, 1959).

Espécies com níveis elevados de colesterol possuem maior resistência ao choque frio, podendo até mesmo evitar a fase de transição dos fosfolipídios de suas membranas celulares, limitando-as a um estado fluído intermediário (HARTWIG; PAPA; DELL'AQUA JR, 2012).

O transporte de substâncias entre o meio extra e intracelular pode ser realizado através de canais proteicos ou por meio de mecanismos transportadores presentes na membrana (HOOGEWIJS, 2010).

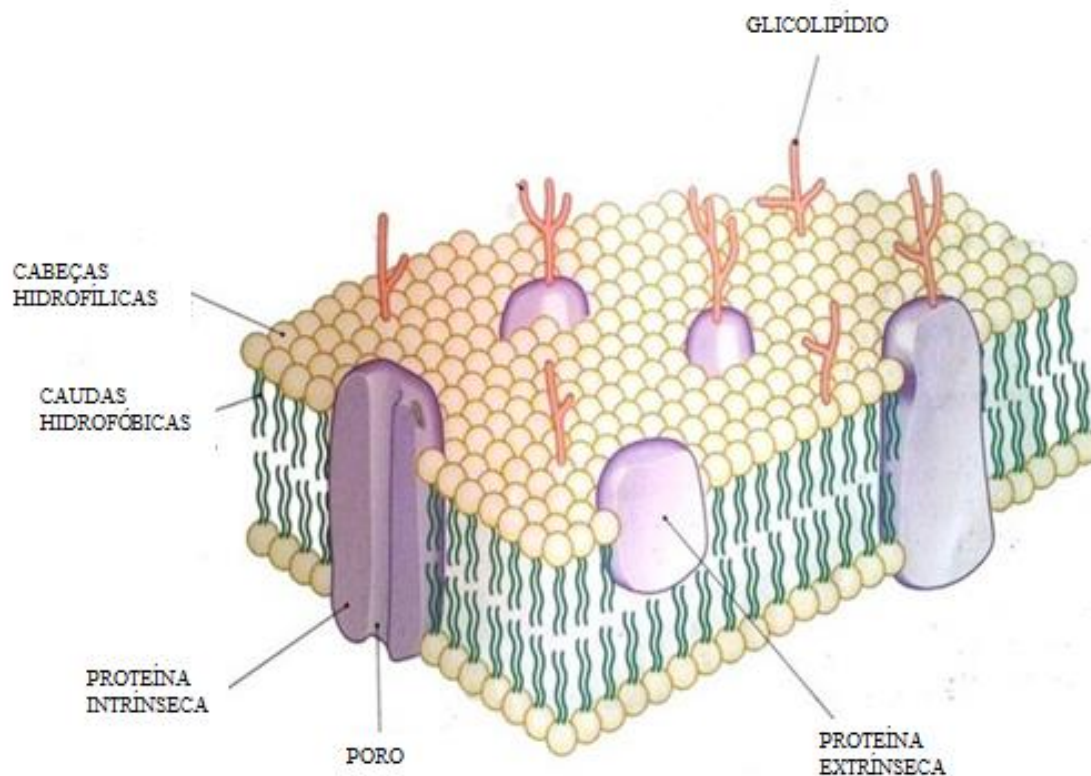


FIGURA 1. Esquema de membrana plasmática

Fonte: Adaptado de: <https://biology4isc.weebly.com/cell-membranes.html>

3.3. Plasma seminal

É um conjunto de fluidos secretados pelos testículos, epidídimos e glândulas sexuais acessórias, responsáveis por várias funções espermáticas até que ocorra a fecundação (KARESKOSKI e KATILA, 2008).

Essas funções relacionam-se ao controle do metabolismo espermático até o momento da fecundação, controle microbiológico, desencadeamento da motilidade espermática, neutralização de metabólitos tóxicos, capacitação espermática e inflamação uterina pós-cobertura (GUASTI; MONTEIRO; PAPA, 2012).

Os bovinos possuem maior quantidade de colesterol no plasma seminal (PS), quando comparados com búfalos, sendo assim, a criopreservação do sêmen bubalino pode ser afetada negativamente, considerando que o colesterol presente no plasma seminal atua como fonte de colesterol para a membrana plasmática, auxiliando na sua integridade (HENRY et al., 2017).

A remoção do PS por meio da centrifugação do sêmen ou pela sua filtração em búfalos não resultou em melhores resultados de cinética espermática e não reduziu a porcentagem de danos às membranas plasmática e acrossomal durante o processo de congelação, dessa forma, supõe-se, portanto, que nessa espécie não há necessidade da retirada do PS para congelação de sêmen (ALBUQUERQUE et al, 2017).

3.4. Danos da criopreservação sobre a viabilidade espermática

A criopreservação pode causar danos à membrana plasmática, que acarretam na perda da sua integridade, diminuindo dessa forma a capacidade da célula em realizar suas funções biológicas (PAPA et al, 2000).

Os processos de refrigeração e congelação devem ser realizados levando-se em consideração as particularidades da membrana espermática e dos constituintes do plasma seminal de cada espécie (BRITO, 2014). Para tanto se faz necessário o desenvolvimento de diluidores com osmolaridade e pH específicos, que possuam ação bacteriostática e que forneçam nutrição e proteção adequada ao espermatozoide durante a refrigeração ou congelação (HOLT, 2000)

Durante a congelação e descongelação, a célula passa por 2 temperaturas críticas, entre -15 e -60°C. Espera-se que pelo menos 50% dos espermatozoides sobrevivam durante esse processo. Entretanto, esse percentual é variável dependendo da qualidade do ejaculado, curva de congelação, diluente utilizado, envase e da curva de descongelação (OHASHI; BARUSELLLI, 2008).

O processo de criopreservação deve ser realizado sob uma determinada taxa de resfriamento, espécie específica, que evite a desidratação celular excessiva (taxa muito lenta) ou formação intracelular de cristais de gelo (taxa muito rápida) (MAZUR, 1972). O ideal para bubalinos é que inicialmente a temperatura diminua entre 0,3 a 0,5°C/min até atingir 4°C. Esse período é chamado de tempo de equilíbrio e tem duração de 4 horas (OHASHI; BARUSELLLI, 2008). Após o tempo de equilíbrio, o sêmen é colocado sobre vapor de nitrogênio líquido durante 20 minutos, sendo posteriormente submerso no nitrogênio e armazenado em container criogênico (OHASHI; BARUSELLLI, 2008).

A inseminação artificial é realizada predominantemente empregando-se o sêmen congelado. Contudo, como a congelação envolve uma série de processos potencialmente deletérios ao sêmen, tais como a formação de radicais livres e a formação de cristais de gelo (SOUZA; FERREIRA, 2007; WATSON, 2000), uma nova alternativa ao uso do sêmen congelado em programas de IATF em bovinos é o emprego do sêmen refrigerado com ou sem glicerol. Em um estudo controlado, no qual se empregou o diluente Botu-Bov[®] para processar o sêmen de touros Nelore, observou-se que a taxa de concepção (TC) em vacas inseminadas foi significativamente maior com o emprego do sêmen refrigerado por 24 horas com Botu-Bov[®] com glicerol (TC= 51%), quando comparada com a do sêmen refrigerado sem glicerol (TC= 44%) ou congelado com glicerol (TC= 41%) (PAPA et al., 2015).

Um importante fenômeno observado durante a criopreservação é a criocapacitação, um processo semelhante a capacitação espermática, resultante das alterações ocorridas na membrana plasmática e que pode comprometer a fertilidade (WATSON, 1995). O fato do caseinato de sódio melhorar as taxas de prenhez do sêmen bovino pós-descongelação (DINIZ, 2017) sugere que essa substância interage com os espermatozoides, revertendo ou protegendo estes das consequências deletérias relacionadas à congelação, destacando-se entre elas a criocapacitação.

3.5. Meios diluentes utilizados na criopreservação de sêmen

Inicialmente, na década de 40, a criopreservação de sêmen era realizada com diluentes a base de gema de ovo, sendo que, logo após, na década de 50, foram realizados estudos com diluentes a base de leite (PHILLIPS; LARDY, 1940; THACKER; ALMQUIST, 1953).

Os diluidores possuem a função de manter a capacidade fecundante do ejaculado, por preservar os espermatozoides, além de aumentar o seu volume. Durante a criopreservação, o diluidor proteger as células dos possíveis danos relacionados a esse processo. Os principais constituintes dos diluidores são água, substância tampão, componentes orgânicos, energéticos, antibióticos e crioprotetores (MANJUNATH, et al, 2002, OHASHI; BARUSELLI, 2008).

Os crioprotetores são classificados como intracelulares ou extracelulares, sendo o glicerol um importante crioprotetor intracelular utilizado com bons resultados para criopreservação de sêmen bovino. Uma importante função do glicerol é diminuir a formação de cristais de gelo intracelulares (ALVARENGA et al, 2017; PAPA et al, 2015).

A concentração de glicerol nos diluentes para criopreservação de sêmen de búfalos já foi estudada por vários autores e os melhores resultados de motilidade pós-descongelação e integridade de membrana plasmática ou acrossomal são obtidos quando esta varia entre 5 e 7% (Jainedeen e Das, 1982; Ramakrishnan e ARiff, 1994; Nastri et al., 1994; Abbas e Andrabi, 2002)

Em bubalinos, na busca por melhores resultados pós-inseminação vários estudos vêm sendo realizados com o intuito de desenvolver novos diluidores de refrigeração e/ou congelação seminais (ALMEIDA, 2018).

3.6. Funções do caseinato de sódio

As caseínas, que constituem cerca de 80% das proteínas presentes no leite bovino, são encontradas agrupadas na forma de micelas (Figura 2); na parte externa da micela estão as k-caseína e na parte central estão as α_1 , α_2 , β e fosfato de cálcio coloidal (DE KRUIF; HOLT, 2003; DALGEISH, 2011; FOX; BRODKORB, 2008).

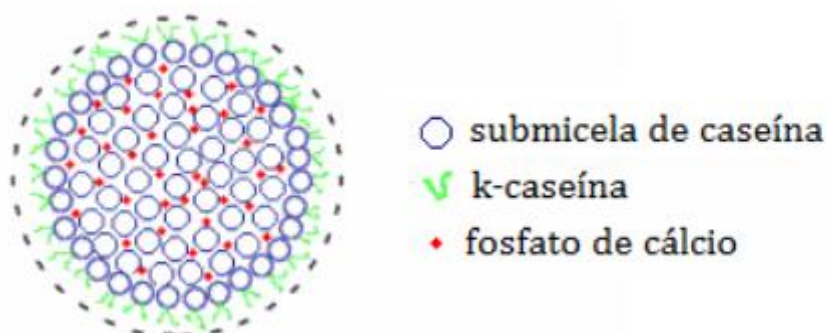


FIGURA 2. Micela de caseína

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

As proteínas ligadoras de espermatozoides (BSPs) são proteínas encontradas em várias espécies de mamíferos; após a puberdade, dependendo da espécie, as BSPs são secretadas pelas vesículas seminais, ampola dos túbulos seminíferos e/ou epidídimos (PLANTE *et al.*, 2016)

As BSPs presentes no plasma seminal são extremamente importantes para o processo de capacitação, uma vez que se ligam aos espermatozoides e auxiliam nas alterações lipídicas da membrana necessárias à capacitação (MANJUNATH, 2012). Além de participar da capacitação as BSPs também medeiam à formação dos reservatórios espermáticos no trato genital feminino, pois interagem com as células epiteliais da tuba auxiliando a ligação dos espermatozoides a esses sítios (GWATHMEY *et al.*, 2003, 2006). Contudo, quando as células espermáticas são expostas continuamente às BSP ocorrem também lesões de membrana devido à remoção excessiva de lipídios (MANJUNATH, 2012). Sendo assim parece existir um delicado equilíbrio entre o grau de interação das BSPs às células espermáticas e a capacidade fecundante do sêmen.

Assim como a lipoproteína de baixa densidade (LDL), o caseinato de sódio interage com as BSPs (FIGURA 2) e medeia a ligação destas com a membrana espermática, evitando, contudo que estas desencadeiem o processo de capacitação imediatamente após a inseminação sem, contudo, impedir que outros fatores desencadeiem esse processo quando da ocorrência da ovulação (BERGERON *et al.*, 2007).

Adicionalmente, o caseinato de sódio também sequestra íons de Ca^{+2} , o que também contribui para que a capacitação espermática seja retardada (BATELLIER, 1997; COUTINHO DA SILVA, *et al.*, 2012). Com a capacitação retardada o tempo de vida útil dos espermatozoides no trato genital feminino é maior, aumentando dessa forma a probabilidade de melhores taxas de gestação.

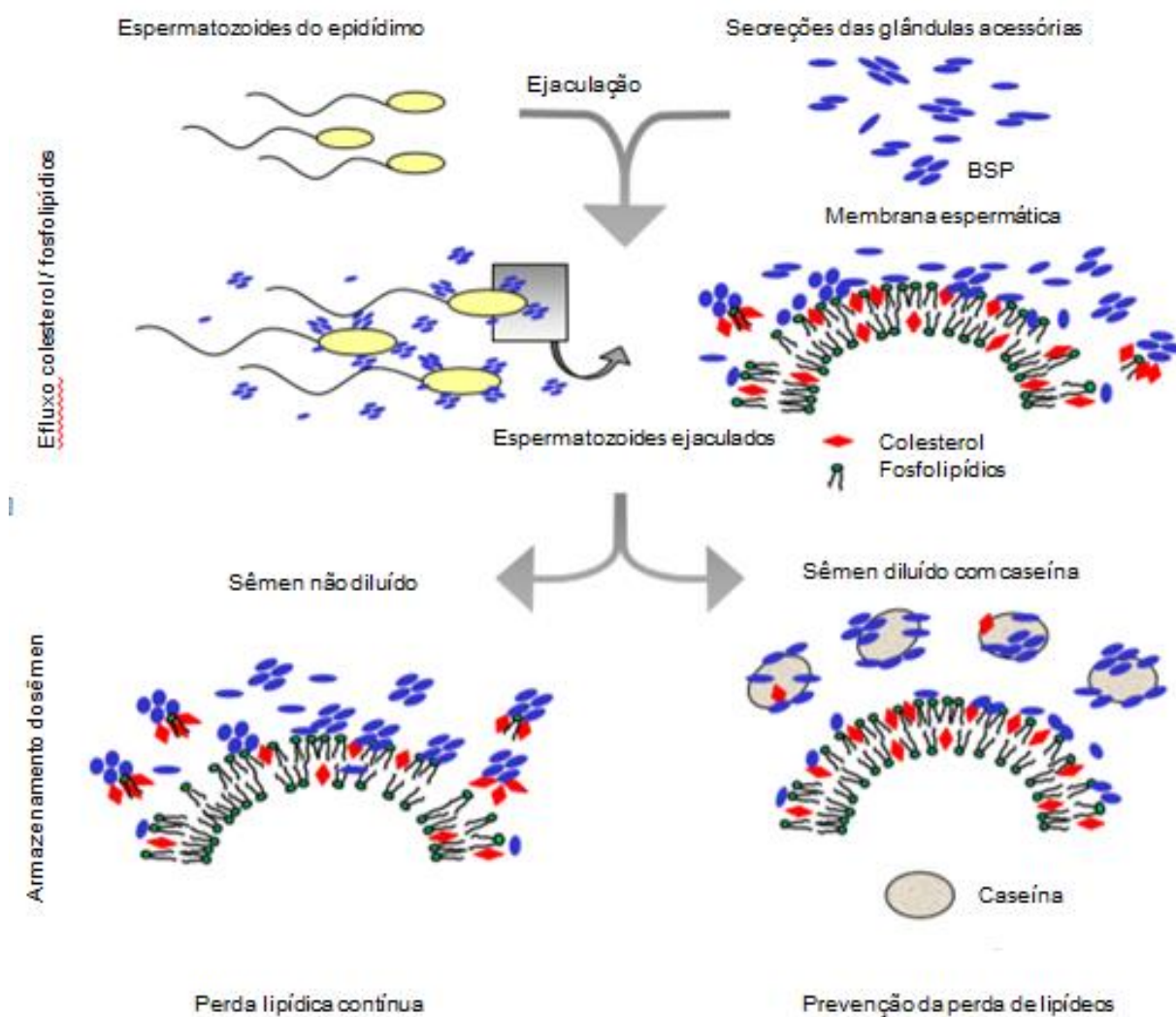


Figura 3. Mecanismo de proteção da caseína.

Fonte: Adaptado de MANJUNATH, 2002.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, R. S. *et al.* Comparison of two methods of seminal plasma removal on buffalo (*Bubalus bubalis*) sperm cryopreservation. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 52, p. 905-910, 2017.

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.

ALMEIDA, J. **Sêmen refrigerado e seu potencial de uso na inseminação artificial na búfala (*Bubalus bubalis*)**, Tese doutorado, UFMG – Escola de Veterinária, Belo Horizonte, 2018.

ALVARENGA, M. A.; PAPA, F. O.; NETO, C. R. Técnicas para incremento da qualidade do sêmen de garanhões. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 41, n. 1, p. 81-85. 2017.

BATELLIER, F. **Identification, purification et mécanisme d'action d'éléments contenus dans le lait, agissant sur les spermatozoides équins**. 1997. Tese (Doutorado) – Université François Rabelais de Tours, UFR, Sciences et Techniques, Tours, 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. **Biology of Reproduction**, 77, p120-126, 2007.

Bovinos e Bubalinos. Ministério da agricultura. Disponível em: < http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/febre-aftosa/documentos-febre-aftosa/DadosderebanhobovinoebubalinodoBrasil_2017pdf >. Acesso em: 10 set 2019.

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

BRITO, M. F. **Criopreservação do sêmen de búfalos (*Bubalus bubalis*) em diluidores contendo lipoproteínas de baixa densidade, em substituição a gema de ovo**. 2014 Biblioteca digital UFMG. Disponível em: < <http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/handle/1843/SMOC-9RNH3R> >. Acesso em: 19 out 2016.

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**, 143, p 577-85, 2012.

DE KRUIF, 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.

DINIZ, J. V. A.. **Utilização do caseinato de sódio na congelação de sêmen bovino**, Tese doutorado, FMVZ – Unesp Botucatu, 2017.

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

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

GONÇALVES, P. B. D., et al. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**, 2 ed. São Paulo. Editora Roca, 2008.

GUASTI, P. N.; MONTEIRO, G. A.; PAPA, F.O. Componentes do plasma seminal e sua influência sobre a criopreservação e fertilidade de espermatozoides equinos. **Veterinária e Zootecnia**, v. 19, p. 169-180, 2012.

GWATHMEY, T. M.; IGNOTZ, G. G.; SUAREZ, S.S. PDC-109 (BSP-A1/A2) Promotes Bull sperm binding to oviductal epithelium in vitro and may be involved in forming the oviductal sperm reservoir. **Biology of Reproduction**, v.69, p.809-815, 2003.

GWATHMEY, T.M.; IGNOTZ, G.G.; MUELLER, J.L. et al. Bovine seminal plasma proteins PDC-109, BSP-A3, and BSP-30-kDa share functional roles in storing sperm in the oviduct. **Biology of Reproduction**, v.75, p.501-507, 2006.

HARTWIG, F. P.; PAPA, F. O.; DELL'AQUA JUNIOR, J. Utilização do colesterol na criopreservação de espermatozoides na espécie equina: Uma revisão. **Veterinária e Zootecnia**, v. 19, p. 157-168, 2012.

HENRY, M. et al. Exame andrológico de bubalinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 41, p. 188-194, 2017.

HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, n. 1–3, p. 3–22, 2000.

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

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. **Biology of Reproduction**, v. 67, n. 4, p. 1250-1258, 2002.

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

MAZUR, P.; LEIBO, S. P.; CHU, E. H. A two-factor hypothesis of freezing injury. Evidence from Chinese hamster tissue-culture cells. **Experimental Cell Research**, v. 71, p. 345-355, 1972.

OHASHI, M. O.; BARUSELLI, P. S. Biotécnicas da reprodução animal aplicadas a bubalinos. In: GONÇALVES, P. B. D., et al. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**, 2 ed. São Paulo. Editora Roca, 2008. Cap. 6. p. 105-124.

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

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. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 24, p. 39-44, 2000.

PAPA, P. M., et al. Effect of glycerol on the viability and fertility of cooled bovine sêmen. **Theriogenology**, 83.1, p. 107-113, 2015.

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

PLANTE, G. et al. Evolution and function of mammalian binder of sperm proteins. **Cell and Tissue Research**. v. 363, p. 105-127, 2016.

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

REICHENBACH, H. D, MORAES, J. C. F. Tecnologia do sêmen e inseminação artificial em bovinos. In: GONÇALVES, P. B. D et al. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**, 2 ed. São Paulo. Editora Roca, 2008. Cap. 4. p. 57-82.

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

SOUZA, J. D. S.; FERREIRA, W. M. O papel da vitamina E na nutrição e reprodução animal - meios de defesa contra os radicais livres. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 4, n. 3, p. 456–461, 2007.

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

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

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, 60-61, p. 481-492, 2000

WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction, Fertility and Development**. v. 7, p. 871-891, 1995.

ZICARELLI, L. **Considerazioni sull' allevamento bufalino**, Salerno: Ente Regionale sviluppo Agricolo in Campânia, 1990.

4. HIPÓTESE

A hipótese deste estudo é que o emprego do diluente de congelação a base de gema de ovo contendo 2% de caseinato de sódio nos procedimentos de refrigeração e congelação irá propiciar o incremento das variáveis relacionadas à motilidade espermática no sêmen bubalino pós-refrigeração ou pós-descongelação.

CAPÍTULO 1

ARTIGO

Artigo redigido de acordo com as normas da Semina: Ciências Agrárias , ISSN: 1679-0359,
ranqueada como B1 pelo Qualis-Capes de 2016

<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/index>

**EFEITO DA ADIÇÃO DE CASEINATO DE SÓDIO SOBRE A VIABILIDADE DO SÊMEN
BUBALINO CRIOPRESERVADO**

Department of Animal Reproduction and Veterinary Radiology, School of Veterinary Medicine and
Animal Science, São Paulo State University, Botucatu, São Paulo, Brazil.

Autor correspondente Tel: +55 14 996043273

E-mail: fernandoevaristo15@hotmail.com

Resumo

O objetivo do estudo foi investigar o efeito da adição do caseinato de sódio ao diluente de congelamento na resposta dos espermatozoides bubalinos aos processos de refrigeração ou congelamento. As amostras seminais foram obtidas por meio de vagina artificial e avaliadas quanto à motilidade total, vigor, concentração e morfologia espermática. À seguir o ejaculado foi fracionado, dividido e submetido aos seguintes tratamentos: controle, controle refrigerado 24 horas e 48 horas, controle congelado (todos diluídos com diluente de congelamento a base de gema de ovo); tratamento caseinato controle, caseinato refrigerado por 24 e 48 horas, e caseinato congelado (todos diluídos com diluente de congelamento a base de gema de ovo com 2% de caseinato de sódio). As amostras dos tratamentos controle refrigerado e caseinato refrigerado foram refrigeradas passivamente durante 24 e 48 h até 5°C em uma taxa de 0,5°C/min. As amostras dos tratamentos controle congelado e caseinato congelado foram congeladas de modo convencional para bovinos. Após descongelamento foram realizadas análises utilizando o CASA para análise da cinética espermática (motilidade total, motilidade progressiva e porcentagem de espermatozoides com movimentos rápidos), e citometria de fluxo para análise das características morfofuncionais. No experimento 1, as amostras congeladas apresentaram resultados de cinética e integridade de membrana plasmática e acrossomal inferiores em relação aos momentos fresco e refrigerado. Não houve diferença estatística entre os tratamentos do experimento 2 nos diferentes momentos para cinética espermática características

33 morfofuncionais. Exceto na avaliação pós TTL. A partir dos resultados do presente estudo foi
34 possível concluir que o diluente a base de gema de ovo foi adequado para a criopreservação de
35 sêmen bubalino e que a adição do caseinato de sódio não diminuiu os efeitos deletérios relacionados
36 à criopreservação seminal.

37 Palavras-chave: Búfalo, Espermatozoide, BSP, Caseína, Criopreservação.

38

39 **Introdução**

40

41 A inseminação artificial é realizada predominantemente utilizando sêmen congelado;
42 contudo, a congelação envolve uma série de processos potencialmente deletérios ao sêmen, tais
43 como a formação de radicais livres e de cristais de gelo (SOUZA; FERREIRA, 2007; WATSON,
44 2000).

45 Uma nova alternativa ao uso do sêmen congelado em programas de inseminação artificial
46 em tempo fixo (IATF) em bovinos é o uso deste apenas refrigerado com ou sem glicerol. Em estudo
47 utilizando apenas o diluente Botu-Bov[®] para processar sêmen de touros Nelore, observou-se que a
48 taxa de concepção em vacas inseminadas foi significativamente maior com o uso do sêmen
49 refrigerado por 24 horas com o diluidor contendo glicerol, quando comparado com o refrigerado
50 igual tempo com diluído sem glicerol ou congelado com glicerol (respectivamente 51%, 44%, 41%)
51 (PAPA et al, 2015). Semelhante ao observado em bovinos, em bubalinos, maiores taxas de prenhez
52 são obtidas quando se utiliza o sêmen refrigerado com Botu-Bov[®] contendo glicerol, quando
53 comparado com as taxas obtidas como o sêmen congelado com esse mesmo diluente (ALMEIDA,
54 2018).

55 A razão do sêmen criopreservado apresentar menor taxa de fertilidade quando comparado
56 ao sêmen refrigerado, relaciona-se a maior taxa de danos e alterações celulares infligida aos
57 espermatozoides pelo processo de congelação (WATSON, 2000).

58 A adição de caseinato de sódio ao diluidor de congelação seminal melhora a taxa de
59 prenhez do sêmen bovino pós-descongelação, sugerindo que essa substância interage com os
60 espermatozoides, revertendo ou protegendo estes das consequências deletérias relacionadas à
61 congelação. Uma importante ação do caseinato de sódio é sequestrar íons Ca^{+2} e interagir com as
62 proteínas ligadoras de espermatozoide (BSPs) impedindo a capacitação espermática precoce, uma
63 consequência deletéria relacionada à congelação (DINIZ, 2017). Contudo, por não impedir
64 totalmente que as BSP sejam incorporadas à membrana espermática, a adição do caseinato de sódio

possibilita também que os espermatozoides se liguem de modo eficiente às células do oviduto, formando assim um bom reservatório espermático.

Em um estudo de campo obteve-se maior taxa de prenhez pós-IATF empregando-se sêmen congelado com diluidor Botu-Bov[®] quando este continha 2% de caseinato de sódio (50,10% x 43,33%); também foram observados maiores valores de motilidade espermática, taxa de recuperação embrionária e taxa de prenhez (DINIZ, 2017).

Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar se o diluente de congelação bovino a base de gema de ovo é eficaz para a criopreservação de sêmen bubalino. Adicionalmente, investigou-se também o efeito da adição do caseinato de sódio a esse diluidor, quando este foi empregado nos processos de criopreservação espermática.

Material e métodos

Aspectos éticos

O projeto foi realizado de acordo com os preceitos éticos recomendados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Instituição (protocolo 0166/2018).

Animais

Foram utilizados 9 animais, da raça Murrah (*Bubalus bubalis*) com idade entre 2 e 10 anos. Após a coleta, o sêmen, obtido por meio de vagina artificial, foi avaliado quanto a motilidade total, vigor e concentração espermáticas. Adicionalmente, foi realizada avaliação morfológica utilizando-se preparações espermáticas úmidas avaliadas sob microscopia de contraste de fase. Foram considerados aceitos ejaculados com no mínimo 80% de motilidade, vigor 3 (escala 0-5), concentração espermática acima 2 bilhões/ejaculado, defeitos maiores abaixo de 20% e menores abaixo de 10%.

Experimento 1 (n=9 ejaculados)

As amostras seminais foram inicialmente diluídas com meio comercial de congelação de sêmen bovino a base de gema de ovo (Botu-Bov[®], Botupharma, Botucatu/Brasil), envasadas em palhetas de 0,25 mL (IMV Tecnologias, L'Aigle Cedex, França), na concentração de 30×10^6

98 espermatozoides/mL e mantidas em caixa térmica de poliestireno na temperatura de 12°C durante 3
99 horas. Após esse período, uma palheta era aquecida a 37°C durante 5 min e avaliada, sendo os
100 resultados dessas avaliações considerados como o controle do estudo.

101 Após as avaliações iniciais as palhetas restantes foram destinadas a um dos seguintes
102 tratamentos:

103 Refrigerado 24 horas: Palhetas refrigeradas por 24 horas a 5°C;

104 Refrigerado 48 horas: Palhetas refrigeradas por 48 horas a 5°C;

105 Congelado: Palhetas congeladas.

106

107 *Experimento 2 (n=12 ejaculados)*

108

109 As amostras seminais foram divididas em duas alíquotas, sendo uma delas diluída com
110 meio comercial de congelação de sêmen bovino a base de gema de ovo (Botu-Bov[®], Botupharmam,
111 Botucatu/Brasil) e a outra diluída com o mesmo meio adicionado com 2% de caseinato de sódio. A
112 seguir foram envasadas em palhetas de 0,25 mL (IMV Tecnologias, L'Aigle Cedex, França), na
113 concentração de 30×10^6 espermatozoides/mL e mantidas em caixa térmica de poliestireno na
114 temperatura de 12°C durante 3 horas. Após esse período, uma palheta de cada meio diluidor era
115 aquecida a 37°C durante 5 min e avaliada, sendo os resultados dessas avaliações considerados como
116 os controles do estudo.

117 Refrigerado 24 horas: Palhetas refrigeradas por 24 horas;

118 Refrigerado 48 horas: Palhetas refrigeradas por 48 horas;

119 Congelado: Palhetas congeladas;

120 Caseinato refrigerado 24 horas: Palhetas refrigeradas por 24 horas;

121 Caseinato refrigerado 48 horas: Palhetas refrigeradas por 48 horas;

122 Caseinato congelado: Palhetas congeladas.

123 Nos dois experimentos as amostras seminais dos tratamentos controle, refrigerado e
124 caseinato refrigerado foram resfriadas em caixa de resfriamento passivo (Botu-Flex[®] - Botupharma
125 Ltda., Botucatu, São Paulo, Brasil), a uma taxa de refrigeração de 0,5°C/min até 5°C.

126 As amostras dos tratamentos, congelado e caseinato congelado foram processada da
127 seguinte forma: após serem envasadas em palhetas francesas de 0,25 mL, foi realizado o
128 resfriamento inicial automatizado (MiniTub[®]: Minitub do Brasil Ltda., Porto Alegre, Rio Grande do
129 Sul, Brasil) a uma taxa de 3°C/min até 5°C, permanecendo nesse ambiente por quatro horas.
130 Posteriormente as palhetas foram transferidas para uma caixa isotérmica de poliestireno com
131 capacidade para 45 litros contendo uma lâmina de 3,5 cm de nitrogênio líquido no seu fundo, onde
132 permaneceram a 3 cm acima do nível da superfície do nitrogênio líquido durante 20 min; após esse
133 período as palhetas foram imersas no nitrogênio líquido e armazenadas em container criogênico a -
134 196°C (ZORZETTO, 2013).

135 Para realização do teste de termo resistência lento (TTL), as amostras dos tratamentos
136 controle congelado e caseinato congelado após descongeladas, permaneceram por 2 horas no
137 banho-maria 37°C.

138

139 *Análise seminal*

140 *1. Cinética espermática*

141 Para a avaliação dos efeitos dos tratamentos controle refrigerado e caseinato refrigerado, as
142 amostras foram depositadas em um tubo plástico de 1,5 mL pré-aquecido a 37°C, onde
143 permaneceram por 10 minutos, sendo em seguida avaliadas quanto à cinética espermática em 5
144 campos aleatórios, análise espermática computadorizada (CASA - Computer-assisted Sperm
145 Analysis, HTM-IVOS 12, Hamilton Thorne Research, Beverly, MA, USA)].

146 Para avaliação dos efeitos dos tratamentos controle congelado e caseinato congelado, as
147 amostras foram descongeladas a 37°C/30 seg, sendo a seguir avaliadas do mesmo modo descrito
148 para as amostras refrigeradas.

149 As amostras do tratamento TTL, depois de descongeladas, as amostras permaneceram
150 durante 2 horas no banho-maria e foram analisadas após esse período da mesma forma descrita
151 anteriormente.

152 As variáveis analisadas pelo CASA foram: motilidade total (MT, %), motilidade
153 progressiva (MP, %), espermatozoides com movimentos rápidos (RAP, %).

154 Para todos os tratamentos a concentração espermática final foi fixada em 30×10^6
155 espermatozoides/mL; as amostras foram envasadas em palhetas de 0,25 mL (IMV Tecnologias,
156 L'Aigle Cedex, França).

157

158 2. Citometria de fluxo

159 As avaliações foram realizadas nos mesmos momentos das avaliações de cinética
160 espermática para todos os tratamentos, exceto para os tratamentos controle e refrigerados do
161 experimento 2.

162

163 2.1. Integridade de membranas plasmática e acrossomal

164 A avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal das células, realizadas
165 nas amostras dos tratamentos controle, refrigerado e congelado do experimento 1, e nas amostras do
166 tratamento congelado do experimento 2, foi realizada por citometria de fluxo utilizando-se o
167 equipamento BD LSR Fortessa (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) equipado com
168 lasers de excitação: azul 488-nm, 100 mW e filtros de emissão 530/30 nm e 695/40 nm; vermelho
169 640 nm, 40 mW com filtro 660/20 nm; e o violeta 405 nm, 100 mW, com o filtro 450/50 nm.

170 No mínimo 10.000 células por amostra foram analisadas e os dados avaliados pelo software
171 BD FACSDiva™ software v 6.1. Assim as amostras foram diluídas em TALP-PVA (Parrish et
172 al.,1988) modificado: 100 mM NaCl, 3,1 mM KCl, 25,0 mM NaHCO₃, 0,3 mM NaH₂PO₄, 21,6 mM
173 DL-lactato de sódio 60%,2,0 mM CaCl₂, 0,4 mM MgCl₂, 10,0 mM Hepes-livre de ácido, 1,0 mM
174 piruvato de sódio, 1,0 mg/mL álcool polivinil-PVA e 25µg/mL gentamicina) na concentração de 5 x
175 10⁶ espermatozoides/mL.

176 Para a avaliação da integridade da membrana plasmática e acrossomal foi utilizada a
177 associação de Hoechst 33342 (H342), iodeto de propídio (PI) e FITC-PSA (aglutinina de *Pisum*
178 *sativum* conjugada ao isotiocianato de fluoresceína) de acordo com Freitas-Dell'Aqua (2012). Para
179 tanto, em uma amostra de 200 µL de sêmen diluído foram adicionados 7 µM de H342, 1,5 µM de PI
180 e 2 ng de FITC-PSA, sendo esta incubada durante 5 min à 37°C ao abrigo da luz.

181

182 2.2. Potencial mitocondrial e superóxido

183 Para avaliação do potencial mitocondrial e produção de superóxido (O₂) na matriz
184 mitocondrial, foi utilizada a associação de Hoechst 33342, Yopro (YP; marcação para célula com
185 membrana plasmática desestabilizada), MitoStatus Red (MST; potencial mitocondrial) e
186 MitoSOXTM Red (MSR; geração de ânion superóxido na matriz mitocondrial) de acordo com
187 protocolo já descrito (DINIZ, 2017). Para tanto, em uma amostra de 500 µL de sêmen diluído foram
188 adicionados 7 µM Hoechst 33342, 25 nM YP, 20 µM de MST e 2 µM de MSR, sendo esta incubada
189 a 37°C por 20 minutos.

190 2.3. *Peróxido de hidrogênio*

191 Para a avaliação da produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) intracelular utilizou-se CM-
192 H2DCFDA (C6827, Life Technologies) associado a iodeto de propídio. Para tanto, em 500 µL de
193 sêmen diluído foram adicionados 1,5 µM de iodeto de propídio e 1 µM de CM-H2DCFDA, a
194 incubação foi realizada por 20 min a 37°C.

195

196 2.4. *Peroxidação lipídica*

197 Para avaliação de peroxidação lipídica foi utilizada a probe C11-BODYPY (D-3861;
198 Molecular Probes). Para tanto, em uma amostra de 500 µL de sêmen diluído foram adicionados 0,5
199 µL de C11BODIPY581/591 (1mg/mL), 5µL de IP (50µg/mL), 5 µL de H342 (100µg/mL) e
200 incubadas por 30 minutos à 37° C. Após a incubação, foram realizadas 2 lavagens consecutivas por
201 centrifugação a 300g por 5 minutos com TALP-PVA e o pellet ressuspendido em 300µL de TALP-
202 PVA (GUASTI et al., 2012).

203

204 *Análise estatística*

205

206 Em todas as análises foi empregado o programa SigmaPlot 11.0. Quando foram comparados
207 dois tratamentos, dados com distribuição normal foram avaliados pelo teste T. Quando os dados não
208 apresentavam distribuição normal foi empregado o teste não paramétrico Mann Whitney. Para a
209 comparação de três ou mais tratamentos empregou-se ANOVA, para dados de distribuição normal,
210 e o teste de Kruskal Wallis, quando a normalidade não foi observada.

211 Para a expressão dos resultados foi empregada a média e o EPM (erro padrão da média),
212 sendo consideradas diferenças estatísticas quando P<0,05.

213 **Resultados**

214

215 *Experimento 1*

216

217 Os resultados relacionados à cinética espermática estão apresentados na tabela 1. Quando
218 considerado os valores de MT, MP e RAP, não houve diferença entre os tratamentos controle e
219 refrigerado 24h, contudo, o congelado apresentou resultados inferiores para todos os parâmetros de

cinética em relação aos tratamentos controle e refrigerado 24h. O tratamento refrigerado 48h apresentou valores similares ao refrigerado 24h em todos os parâmetros, enquanto que em relação ao congelado houve similaridade entre MT e RAP.

Tabela 1. Valores médios $\pm$ EPM da cinética espermática de ejaculados de touros bubalinos da raça Murrah (*Bubalus bubalis*) diluídos em meio de congelação a base de gema de ovo e submetidos a refrigeração por 24 ou 48 horas, ou a congelação (n= 9).

	CONTROLE	24horas	48horas	CONGELADO
MT (%)	85 $\pm$ 1,7 ^a	83 $\pm$ 3,0 ^a	74 $\pm$ 5,0 ^{ab}	43 $\pm$ 7,0 ^b
MP (%)	71 $\pm$ 1,9 ^a	66 $\pm$ 3,3 ^{ab}	56 $\pm$ 4,1 ^b	35 $\pm$ 5,6 ^c
RAP (%)	84 $\pm$ 1,8 ^a	81 $\pm$ 2,6 ^a	72 $\pm$ 5,3 ^{ab}	40 $\pm$ 6,7 ^b

MT= motilidade Total, MP= motilidade progressiva, RAP= porcentagem de espermatozoides com movimento rápido. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística (P<0,05).

Os resultados relacionados às características morfofuncionais estão apresentados nas tabelas 2 e 3.

Em relação à concentração de ânion superóxido (O_2^-) nos tratamentos controle e 24h, os valores foram menores quando comparados com os observados no tratamento congelado. Os valores de peroxidação lipídica (PERO) não diferiram entre os tratamentos controle e refrigerado, e entre os tratamentos refrigerado e congelado, porém, diferiram quando comparado os tratamentos controle e congelado. Houve diferença nas concentrações de H_2O_2 entre os tratamentos 48H e congelado.

Tabela 2. Valores médios $\pm$ EPM das variáveis espermáticas morfofuncionais relacionadas ao estresse oxidativo avaliadas por citometria de fluxo de ejaculados de touros bubalinos da raça Murrah (*Bubalus bubalis*) diluídos em meio de congelação a base de gema de ovo e submetidos a refrigeração por 24 ou 48 horas, ou a congelação (n = 9).

	CONTROLE	24horas	48horas	CONGELADO
O_2^- (%)	21,8 $\pm$ 2,10 ^a	28,3 $\pm$ 3,20 ^{ab}	39,1 $\pm$ 5,80 ^{bc}	70,1 $\pm$ 6,50 ^c
O_2^- (UA)	106 $\pm$ 22,00 ^a	181 $\pm$ 49,00 ^a	356 $\pm$ 123,00 ^{ab}	940 $\pm$ 209,50 ^b
PERO (%)	2,5 $\pm$ 0,7 ^a	7,4 $\pm$ 2,29 ^{ab}	5,9 $\pm$ 1,66 ^{ab}	19,6 $\pm$ 4,63 ^b
H_2O_2 (UA)	65 $\pm$ 17,0 ^{ab}	60 $\pm$ 8,90 ^{ab}	70,1 $\pm$ 9,30 ^a	39,1 $\pm$ 3,60 ^b

O_2^- (%)= Porcentagem de células com alta concentração de ânion superóxido, O_2^- (UA)= concentração de ânion superóxido na amostra total, PERO (%)= Porcentagem de células com

243 peroxidação lipídica, H_2O_2 (UA)= concentração de peróxido de hidrogênio nas células totais. Letras
244 diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ($P<0,05$).

245 As variáveis, membranas plasmática e acrossomal integras (MPAI) e células sem
246 desestabilização de membrana (CSDM) apresentaram-se superiores nos tratamento controle e
247 refrigerado 24, enquanto que a variável alto potencial mitocondrial (APM) foi superior no
248 tratamento controle em relação aos demais tratamentos. O tratamento congelado apresentou valores
249 inferiores de MPAI, CSDM e alto potencial mitocondrial (APM) quando comparado com os
250 demais.

251 **Tabela 3.** Valores médios $\pm$ EPM das variáveis espermáticas morfofuncionais relacionadas às
252 membranas espermática e ao potencial mitocondrial avaliados por citometria de fluxo de ejaculados
253 de touros bubalinos da raça Murrah (*Bubalus bubalis*) diluídos em meio de congelação a base de
254 gema de ovo e submetidos a refrigeração por 24 ou 48 horas, ou a congelação (n= 9).

	CONTROLE	24 horas	48 horas	CONGELADO
APM (%)	78,2 $\pm$ 2,1 ^a	75,7 $\pm$ 2,2 ^a	69,2 $\pm$ 3,3 ^b	29,5 $\pm$ 5,6 ^c
MPAI (%)	80,4 $\pm$ 2,3 ^a	78,9 $\pm$ 2,2 ^a	72 $\pm$ 3,2 ^a	34,3 $\pm$ 6,3 ^b
CSDM (%)	78,9 $\pm$ 1,9 ^a	76,7 $\pm$ 2,3 ^a	70,7 $\pm$ 3,4 ^b	30,8 $\pm$ 5,7 ^b
PM (UA)	12128 $\pm$ 2025 ^a	9775 $\pm$ 1905 ^a	6784 $\pm$ 1701 ^{aA}	1689 $\pm$ 542 ^{bA}

255 APM (%)= Porcentagem de células com alto potencial mitocondrial, MPAI (%)= Porcentagem de
256 células com membrana plasmática e acrossomal íntegras, CSDM (%)= Porcentagem de células sem
257 desestabilização de membrana. PM (UA)= Avaliação qualitativa do potencial mitocondrial das
258 células sem desestabilização de membrana. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença
259 estatística ($P<0,05$).

260

261 *Experimento 2*

262

263 Na tabela 4 estão apresentados os valores relacionados à motilidade total (MT), motilidade
264 progressiva (MP) e percentual de espermatozoides rápidos (RAP) dos tratamentos, controle,
265 refrigerado 24h e refrigerado 48h. Não houve efeito de tratamentos em nenhuma das variáveis.

266

267

268

269

270

271

272 **Tabela 4.** Valores médios $\pm$ EPM da cinética espermática de ejaculados de touros bubalinos da raça
 273 Murrah (*Bubalus bubalis*) diluídos em meio de congelação a base de gema de ovo (BB) ou diluídos
 274 em meio de congelação a base de gema de ovo com 2% de caseinato de sódio (CA) e submetidos a
 275 refrigeração por 24 ou 48 horas (n = 12).

	CONTROLE		24h		48h	
	CA	BB	CA	BB	CA	BB
MT (%)	89,2 $\pm$ 8,1	89,3 $\pm$ 8,1	87 $\pm$ 4,1	86 $\pm$ 5,1	70,9 $\pm$ 9,9	84 $\pm$ 5,3
MP (%)	40,6 $\pm$ 4,1	45,2 $\pm$ 5,2	49 $\pm$ 4,6	52 $\pm$ 5,5	36,8 $\pm$ 7,2	45 $\pm$ 5,8
RAP (%)	63 $\pm$ 6,9	69,1 $\pm$ 7,2	60 $\pm$ 8	64 $\pm$ 8,2	46 $\pm$ 10	54 $\pm$ 8,0

276 MT= motilidade Total, MP= motilidade progressiva, RAP= porcentagem de espermatozoides com
 277 movimento rápido. CONTROLE= sêmen diluído com diluente para congelação, 24H= 24 horas de
 278 refrigeração, 48H= 48 horas de refrigeração.

279

280 Houve efeito de tratamento para as variáveis de cinética espermática após a descongelação e
 281 após teste de termorresistência lento. (TTL).

282 **Tabela 5.** Valores médios $\pm$ EPM da cinética espermática de ejaculados de touros bubalinos da
 283 raça Murrah (*Bubalus bubalis*) diluídos em meio de congelação a base de gema de ovo (BB) ou
 284 diluídos em meio de congelação a base de gema de ovo com 2% de caseinato de sódio (CA) e
 285 submetidos a congelação e TTL (n = 12).

	MT		MP		RAP	
	DESCONG	TTL	DESCONG	TTL	DESCONG	TTL
CA	45,7 $\pm$ 6,5 ^{aA}	11 $\pm$ 5,2 ^{aB}	37,5 $\pm$ 5,5 ^{aA}	7 $\pm$ 3,8 ^{aB}	42,5 $\pm$ 6,3 ^{aA}	9 $\pm$ 5 ^{aB}
BB	42,9 $\pm$ 7 ^{aA}	8 $\pm$ 4,8 ^{aB}	36,6 $\pm$ 5,8 ^{aA}	6 $\pm$ 4 ^{aB}	41,4 $\pm$ 6,9 ^{aA}	6,8 $\pm$ 4 ^{aB}

286 MT= motilidade total, MP motilidade progressiva, RAP= porcentagem de espermatozoides com
 287 movimento rápido. TTL= descongelado e mantido durante 2 horas a 37°C. Letras minúsculas
 288 diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística, letras maiúsculas diferentes na mesma
 289 linha indicam diferença estatística (P<0,05).

290

291 Não houve efeito de tratamento para variáveis morfofuncionais relacionados ao estresse
 292 oxidativo entre os momentos, descongelado e TTL, exceto para O2⁻ % total que foi diferente entre
 293 os tratamentos CA e BB no TTL.

294

Tabela 6. Valores médios $\pm$ EPM das variáveis espermáticas morfofuncionais relacionadas ao estresse oxidativo avaliadas por citometria de fluxo de ejaculados de touros bubalinos da raça Murrah (*Bubalus bubalis*) diluídos em meio de congelação a base de gema de ovo (BB) ou diluídos em meio de congelação a base de gema de ovo com 2% de caseinato de sódio (CA) e submetidos a congelação e TTL(n = 12).

	DESCONGELADO		TTL	
	CA	BB	CA	BB
O ₂ ⁻ (%)	77,7 $\pm$ 4,8 ^a	70,1 $\pm$ 6,1 ^a	79,8 $\pm$ 4 ^a	75,7 $\pm$ 5,1 ^a
O ₂ ⁻ (UA)	651,5 $\pm$ 54,7 ^a	801,7 $\pm$ 97,3 ^a	649,5 $\pm$ 47,5 ^a	920,1 $\pm$ 85,8 ^b
H ₂ O ₂ (UA)	333,3 $\pm$ 167,7 ^a	342 $\pm$ 254,7 ^a	89,4 $\pm$ 8,3 ^a	86,7 $\pm$ 13,6 ^a
PERO (%)	24,5 $\pm$ 5,6 ^a	21,3 $\pm$ 5,4 ^a	12,2 $\pm$ 3,3 ^a	24,5 $\pm$ 8,4 ^a

O₂⁻ (%)= Porcentagem de células com alta concentração de ânion superóxido, O₂⁻ (UA)= concentração de ânion superóxido na amostra total, PERO (%)= Porcentagem de células com peroxidação lipídica, H₂O₂ (UA)= concentração de peróxido de hidrogênio nas células totais. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística (P<0,05).

304

Na tabela 7 mostram-se os valores relacionados às variáveis de relacionadas a avaliação das membrana espermáticas. Não houve efeito de tratamento, exceto para PM (UA) no momento TTL.

Tabela 7. Valores médios $\pm$ EPM das variáveis espermáticas morfofuncionais relacionadas à membrana espermática e ao potencial mitocondrial avaliadas por citometria de fluxo em ejaculados de touros bubalinos da raça Murrah (*Bubalus bubalis*) diluídos em meio de congelação a base de gema de ovo (BB) ou diluídos em meio de congelação a base de gema de ovo com 2% de caseinato de sódio (CA) e submetidos a congelação e TTL(n = 12).

	DESCONGELADO		TTL	
	CA	BB	CA	BB
APM (%)	19,9 $\pm$ 5,1 ^a	28,5 $\pm$ 5,9 ^a	17,3 $\pm$ 3,4 ^a	23,1 $\pm$ 5,2 ^a
MPAI (%)	24 $\pm$ 5,6 ^a	33,9 $\pm$ 6,7 ^a	20,1 $\pm$ 3,6 ^a	26 $\pm$ 5,7 ^a
CSDM (%)	91,4 $\pm$ 2,86 ^a	87,8 $\pm$ 3,5 ^a	91 $\pm$ 3,3 ^a	88,1 $\pm$ 3,7 ^a
PM (UA)	1257,7 $\pm$ 702,2 ^a	1222,7 $\pm$ 542,4 ^a	509,6 $\pm$ 26,8 ^a	549,6 $\pm$ 27,5 ^b

APM (%)= Porcentagem de células com alto potencial mitocondrial, MPAI (%)= Porcentagem de células com membrana plasmática e acrossomal íntegras, CSDM (%)= Porcentagem de células sem desestabilização de membrana. PM (UA)= Avaliação qualitativa do potencial mitocondrial das células sem desestabilização de membrana. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística (P<0,05).

317 **Discussão**

318

319 De maneira geral, os valores de motilidade total, motilidade progressiva e porcentagem de
320 espermatozoides com movimentos rápidos foram superiores nos tratamentos controle e refrigerado
321 quando comparados aos tratamento congelado, independentemente do diluente utilizado. Essa
322 observação pode estar relacionada ao fato de que o sêmen criopreservado apresentar menor taxa de
323 fertilidade, devido danos e alterações causados durante o processo de congelação (WATSON,
324 2000).

325 Os diluentes devem possuir osmolaridade e pH específicos (HOLT, 2000) para a espécie em
326 que serão utilizados, para que realizem suas funções. Neste estudo, apesar de ter sido empregado
327 diluente para congelação de sêmen bovino previamente utilizado em outros estudos com resultados
328 satisfatórios (ALMEIDA, 2018), os baixos resultados de motilidade observados principalmente
329 após o TTL, podem estar relacionados a esse fator de especificidade.

330 Sabe-se que a criopreservação induz a formação de espécies reativas do oxigênio
331 (WATSON, 2000). Esse fenômeno pode ter sido o responsável pela alta concentração de O_2^- após o
332 TTL, no tratamento em que não foi utilizado caseinato de sódio. Esse resultado sugere que o
333 caseinato de sódio auxilia na proteção contra o estresse oxidativo durante a criopreservação.

334 Os resultados para MT, MP e RAP não apresentaram diferenças entre os tratamentos CA e
335 BB nos momentos 0h, 24h e 48h, corroborando com os resultados obtidos em experimento prévio
336 que utilizou o caseinato de sódio em diluente de refrigeração de sêmen equino (GARCIA, 2016).

337 Os valores observados para MT, MP e RAP em todos os tratamentos empregados nos
338 momentos pós-descongelação e pós-TTL, apresentaram-se semelhantes aos resultados observados
339 em estudo com sêmen bovino congelado. Observou-se valores inferiores no momento T90 em
340 relação ao momento T0 no tratamento onde foi utilizado o caseinato. Entretanto, os resultados dos
341 tratamentos congelados não foram diferentes, assemelhando-se aos valores encontrados no
342 momento T0 (DINIZ, 2017).

343 Utilizando-se o diluente Botu-Bov[®] em sêmen bovino, comparando as variáveis do sêmen
344 fresco, refrigerado por 24 horas e congelado, não se observou diferenças para MT, MP e RAP entre
345 os tratamentos fresco e refrigerado; contudo, houve diferença entre os resultados desses tratamentos
346 e os observados após a congelação (PAPA et al., 2015). Esses dados corroboram com os
347 encontrados no tratamento controle, em que os valores para MT, MP e RAP não diferiram entre os
348 momentos T0 e T24, entre T24 e T48, mas diferem entre fresco, refrigerado e congelado.

349 O TTL não elevou os valores de MPAI, diferente do observado por Diniz (2017) que
350 verificou que 90 minutos após o início do teste os resultados desta variável eram superiores no
351 tratamento com caseinato.

352 Quando utilizado Botu-Bov[®] sem a adição do caseinato de sódio, para a MPAI, o único
353 tratamento que apresentou diferença foi o congelado. Resultados similares foram observados em
354 bovinos (PAPA et al., 2015).

355 Os valores observados para peroxidação lipídica quando utilizou-se Botu-Bov[®] sem a
356 adição do caseinato de sódio foram semelhantes quando comparados os tratamentos controle,
357 refrigerado 24h e refrigerado 48h, resultados similares aos observados por Garcia (2016) que
358 empregando o diluído Botu-Sêmen[®] adicionado com caseinato de sódio, também não se observou
359 diferenças entre os momentos 0 (zero) e 24 horas após o início da refrigeração.

360 A quantidade de células sem desestabilização de membrana não diferiu entre os
361 tratamentos, congelado CA e congelado BB em nenhum dos momentos de avaliação, diferentes do
362 observado por Diniz (2017), que ao congelar sêmen bovino como o diluidor Botu-Bov[®], com ou
363 sem caseinato de sódio, verificou menor porcentagem de espermatozoide sem desestabilização de
364 membrana empregando o Botu-Bov[®] sem caseinato.

365 O glicerol é utilizado nos diluentes devido seu efeito crioprotetor. Foi observado que 6 ou
366 7% de glicerol são concentrações ótimas para a proteção da célula espermática durante o processo
367 de criopreservação, quando comparadas a outras concentrações (ABBAS & ANDRABI, 2012); por
368 conseguinte, foi empregado diluentes contendo 7% de glicerol no presente estudo.

369 Empregando o diluidor Botu-Bov[®], Almeida (2018) avaliou a taxa de concepção do sêmen
370 bubalino refrigerado por 24 horas ou congelado. As inseminações foram realizadas em programas
371 de IATF durante as estações reprodutivas, favorável e desfavorável. Os maiores resultados de taxa
372 de prenhez foram obtidos, independente da estação, com o emprego do sêmen refrigerado. No
373 período favorável a taxa de concepção foi de 57,8% e 31,1% para o sêmen refrigerado e congelado,
374 respectivamente. No período desfavorável a taxa de concepção para sêmen refrigerado foi de 48,2%
375 e para o congelado foi de 34,6%.

376 Tanto em bovinos (PAPA et al., 2015) quanto em bubalinos (ALMEIDA, 2018), as maiores
377 taxas de prenhez são obtidas quando se emprega o sêmen refrigerado com Botu-Bov[®] contendo
378 glicerol, quando comparado com as taxas obtidas como o sêmen congelado com esse mesmo
379 diluente.

380 Em um estudo de campo, Diniz (2017) obteve maior taxa de prenhez pós-IATF empregando
381 sêmen congelado com diluidor Botu-Bov[®] adicionado com 2% de caseinato de sódio (caseinato=

382 50,10% x controle= 43,33%), e observou melhores resultados de cinética espermática, taxa de
383 recuperação de embrionária e taxa de prenhez quando o caseinato foi adicionado ao diluidor.

384 A quantidade de células com membranas plasmática e acrossomal integras e células sem
385 desestabilização de membrana foi menor no tratamento congelado, esse fato pode ser devido ao
386 efluxo de colesterol da membrana que depende do tempo de exposição do espermatozoide à BSP
387 e da concentração desta, quanto maior o tempo de processamento, maior o tempo de exposição
388 causando maiores danos nas membranas e menor quantidade de células sem desestabilização de
389 membrana (MANJUNATH, 2002).

390 O uso do caseinato de sódio, durante o TTL não resultou em maiores valores das
391 variáveis relacionadas a estabilização de membrana; no tratamento onde não foi adicionado
392 caseinato de sódio observou-se maior quantidade de células sem desestabilização de membrana.

393 As amostras dos tratamentos congelado apresentaram maior quantidade de células com
394 maiores concentrações de O_2^- e peroxidação lipídica do que os outros tratamentos. Sabe-se que o
395 espermatozoide de búfalos não apresenta resultados pós-descongelção tão bons quanto os
396 bovinos e esse valores referentes ao estresse oxidativo podem estar relacionados a menor
397 quantidade de ácido ascórbico, que atua com antioxidante, no sêmen do búfalo em relação aos
398 bovinos (0,091 mol/mL versus 0,131 mol/mL, respectivamente) (JAIN, 1987).

399 O sêmen congelado apresentou valores inferiores para motilidade quando comparado com
400 os outros tratamentos, essa dificuldade em apresentar bons resultados pós-congelção pode ser
401 devido ao colesterol estar presente em menor quantidade no sêmen dos búfalos (91,84 a 141,88
402 mg/100mL) do que em bovinos (104 a 412 mg/mL) (MOHAN et al., 1979; ROYCHOUDHURY,
403 1970).

404 O colesterol é um dos lipídios presentes na membrana e auxilia na estabilização da
405 mesma.

406 **Conclusão**

407

408 A adição de caseinato de sódio ao diluidor Botu-Bov[®] não resultou e maiores valores de
409 motilidade total, progressiva e porcentagem de espermatozoides rápidos após a refrigeração e
410 congelção do sêmen bubalino com esse diluidor.

411 A adição de caseinato de sódio ao diluidor Botu-Bov[®] também não proporcionou maior
412 preservação das membranas nas espermáticas durante o processo de congelção.

413 **Referências**

414

415 ABBAS A, ANDRABI SMH. Effect of different glycerol concentrations on motility before and
416 after freezing, recovery rate, longevity and plasma membrane integrity of Nili-Buffalo bull
417 spermatozoa. Pakistan Veterinary Journal. 2002, 22: 1-4.

418 ALMEIDA J. Sêmen refrigerado e seu potencial de uso na inseminação artificial na búfala (*Bubalus*
419 *bubalis*), Tese doutorado, UFMG – Escola de Veterinária, Belo Horizonte, 2018.

420 DINIZ JVA. Utilização do caseinato de sódio na congelação de sêmen bovino, Tese doutorado,
421 FMVZ – Unesp Botucatu, 2017.

422 FREITAS-DELL'AQUA CP. *et al.* Flow cytometric analysis of fertile and subfertile frozen stallion
423 spermatozoa. Animal Reproduction 2012; 9: 941.

424 GARCIA VFC. Efeitos da adição de caseinato de sódio no diluente de refrigeração de sêmen
425 equino. Dissertação mestrado, FMVZ – Unesp Botucatu, 2016.

426 GUASTI, P.N.; FREITAS-DELL'AQUA, C. P. MAZIERO, R. R. D.; HARTWIG, F. P.;
427 MONTEIRO, G. A.; LISBOA, F. P.; PAPA, F. O. Validation of flow cytometry for assessment of
428 membrane lipid peroxidation of equine spermatozoa. IV International Symposium on Animal
429 Biology of Reproduction, October 17-20, 2012.

430 HENRY, M. *et al.* Exame andrológico de bubalinos. Revista Brasileira de Reprodução Animal,
431 2017, 41, 188-194.

432 HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. Animal Reproduction Science, 2000, 62, 3–
433 22.

434 JAIN, M.C., Ascorbic acid concentration in bovine and bubaline semen. Archiv Experimentelle
435 Veterinarmedizin. v. 41, p. 550-555, 1987.

436 MANJUNATH, P.; NAUC, V.; BERGERON, A.; MÉNARD, M. Major proteins of bovine seminal
437 plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. Biology of Reproduction, v.
438 67, n. 4, p. 1250-1258, 2002.

439 MOHAN G.; MADAN, M.L.; RAZDAN, M.N. Composition of Murrah buffalo bull semen during
440 winter and summer months in India. Tropical Agriculture (Trinidad) v. 54, p. 21-28, 1979.

441 PAPA PM. *et al.* Effect of glycerol on the viability and fertility of cooled bovine
442 sêmen. Theriogenology 2015; 83.1: 107-113.

- 443 PARRISH JJ, SUSKO-PARRISH J, WINER MA, FIRST NL. Capacitation of bovine sperm by
444 heparin. *Biology of Reproduction*. 1988, 38: 1171-1180.
- 445 ROYCHOUDHURY, P.N.; Total cholesterol content in bull semen. *Indian Veterinary Journal*. v.
446 47, p. 146-150, 1970.
- 447 SINGH AK, SINGH VK, NARWADE BM, MOHANTY TK, ATREJA SK. Comparative quality
448 assessment of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen chilled (5 degrees C) in egg yolk- and soya milk-
449 based extenders. *Reprod Domest Anim* 2012; 47:596-600
- 450 SOUZA JDS, FERREIRA WM. O papel da vitamina E na nutrição e reprodução animal - meios de
451 defesa contra os radicais livres. *Revista Eletrônica Nutritime*, 2007, 4,3:456–461.
- 452 WATSON PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction*
453 *Science* 2000, 60-61: 481-492.
- 454 ZORZETTO MF. Avaliação do sêmen de búfalos em três meios de criopreservação, 77, Dissertação
455 – Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ – Unesp, Botucatu, 2013.