

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 13/09/2021.

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 spermatid kinetics 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 (espermio gênese) (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 (HOOGHEWIJS, 2010).

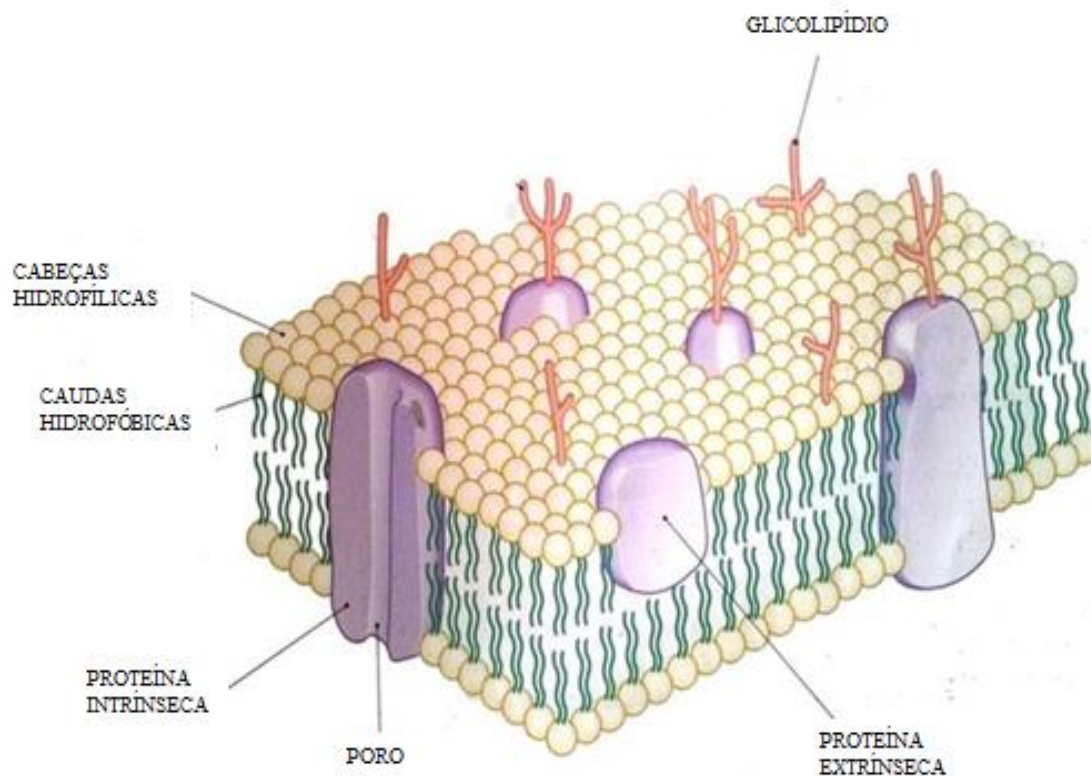


FIGURA 1. Esquema de membrana plasmática

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; BARUSELLI, 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; BARUSELLI, 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; BARUSELLI, 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).

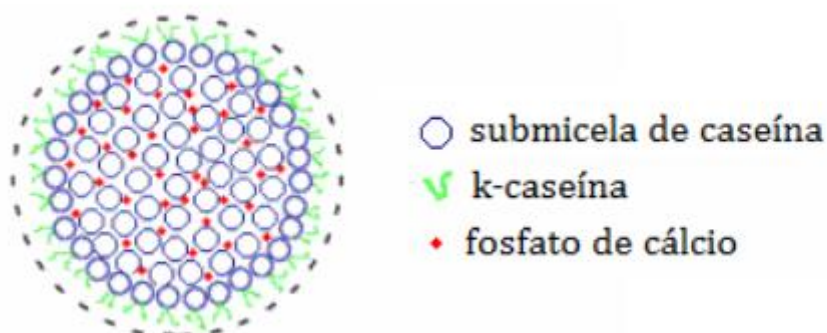


FIGURA 2. Micela de caseína

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.

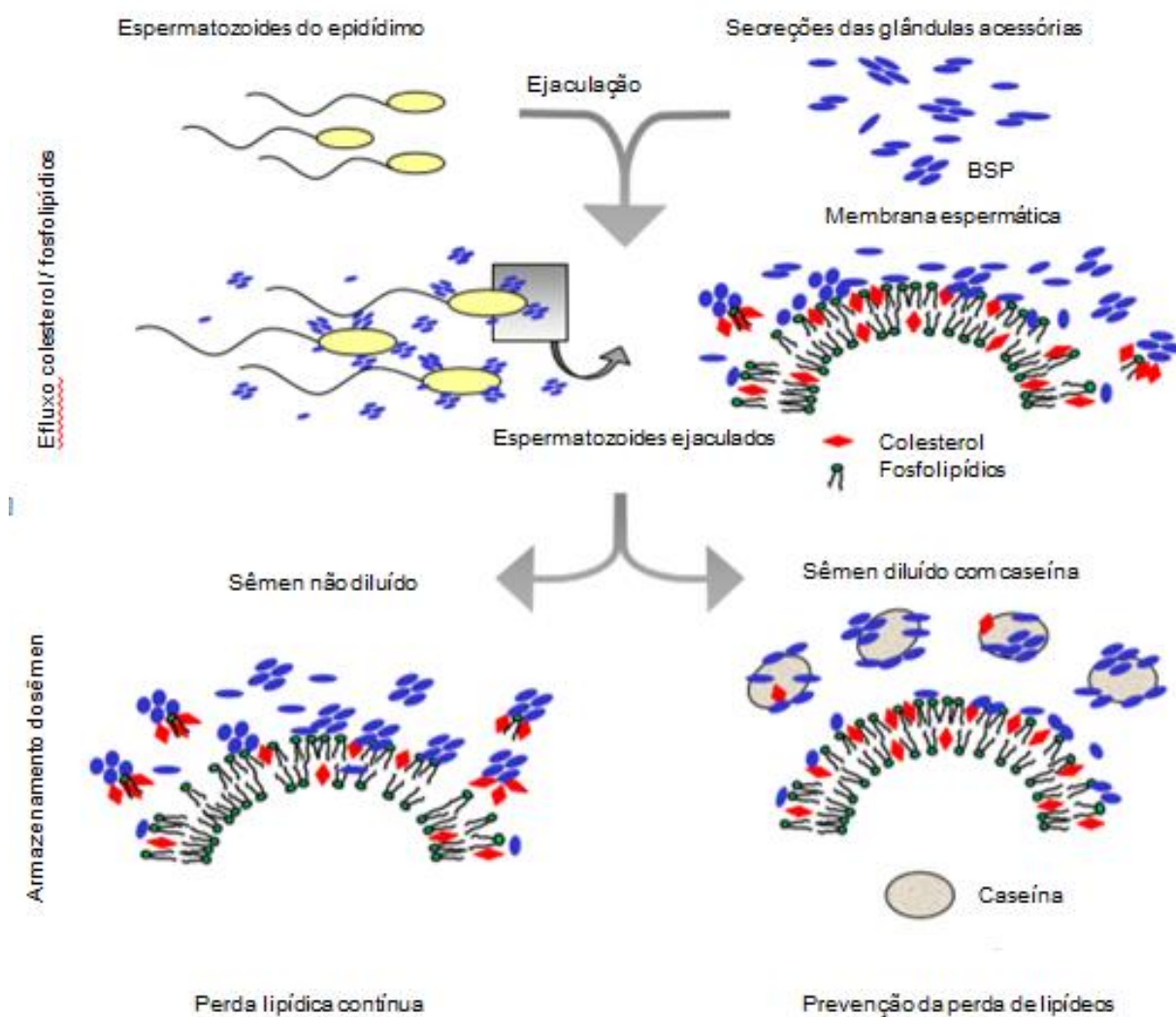


Figura 3. Mecanismo de proteção da caseína.

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.