

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CAMPUS DE JABOTICABAL

**COMPARAÇÃO ENTRE DOIS MÉTODOS DE REMOÇÃO DE
PLASMA SEMINAL NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN
DE BÚFALOS (*Bubalus bubalis*)**

Rodrigo dos Santos Albuquerque

Médico Veterinário

2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CAMPUS DE JABOTICABAL

**COMPARAÇÃO ENTRE DOIS MÉTODOS DE REMOÇÃO DE
PLASMA SEMINAL NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN
DE BÚFALOS (*Bubalus bubalis*)**

Rodrigo dos Santos Albuquerque

Orientador: Profa. Dra. Lindsay Unno Gimenes

Coorientadores: Prof. Dr. Fabio Morato Monteiro

Prof. Dr. Moyses dos Santos Miranda

Prof. Dr. Rinaldo Batista Viana

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Reprodução Animal).

2016

Albuquerque, Rodrigo dos Santos
A345c Comparação entre dois métodos de remoção de plasma seminal na
criopreservação de sêmen de búfalos (*Bubalus bubalis*) / Rodrigo dos
Santos Albuquerque. – – Jaboticabal, 2016
ix, 68 p. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade
de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016
Orientadora: Lindsay Unno Gimenes
Coorientadores: Fabio Morato Monteiro, Moyses dos Santos Miranda,
Rinaldo Batista Viana
Banca examinadora: Rubens Paes de Arruda, Marcilio Nichi
Bibliografia

1. Bubalinos. 2. Ejaculado. 3. Centrifugação. 4. Filtragem. 5. Plasma
seminal. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias.

CDU 619:636.08:636.293.1



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal

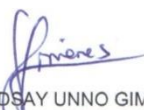


CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: COMPARAÇÃO ENTRE DOIS MÉTODOS DE REMOÇÃO DE PLASMA SEMINAL NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE BÚFALOS (*Bubalus bubalis*)

AUTOR: RODRIGO DOS SANTOS ALBUQUERQUE
ORIENTADORA: LINDSAY UNNO GIMENES
CO-ORIENTADOR: FABIO MORATO MONTEIRO
CO-ORIENTADOR: RINALDO BATISTA VIANA
CO-ORIENTADOR: MOYSES DOS SANTOS MIRANDA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em MEDICINA VETERINÁRIA, área: REPRODUÇÃO ANIMAL, pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. LINDSAY UNNO GIMENES
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Prof. Dr. MARCILIO NICHÍ
Departamento de Reprodução Animal / FMVZ - USP - São Paulo/SP


Prof. Dr. RUBENS PAES DE ARRUDA
Departamento de Reprodução Animal / FMVZ - USP - Pirassununga/SP

Jaboticabal, 04 de março de 2016

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

RODRIGO DOS SANTOS ALBUQUERQUE – nascido em 23 de Junho de 1989 no município de Belém, PA, filho de Luís Carlos de Souza Albuquerque e Graciete Maria dos Santos Albuquerque. Médico Veterinário formado pela Universidade Federal Rural da Amazônia (Ufra), Câmpus de Belém-PA em fevereiro de 2014. Bolsista do Programa de Educação Tutorial (PET) em Medicina Veterinária em 2009/2014. Em Março de 2014, ingressou no curso de Mestrado na área de Reprodução Animal do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Ciência Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), bolsista CAPES, sob orientação da Profa. Dra. Lindsay Unno Gimenes.

É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem a vitória, nem derrota.

Theodore Roosevelt

Às rainhas da minha vida, mãe Graciete e avó Lucy,
pelo apoio, incentivo, amor e compreensão e avô
Armindo (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

À Deus, que sempre me guiou e iluminou o meu caminho durante toda a minha vida e principalmente nesta trajetória. Obrigado, meu pai, pelo amparo e pelas bênçãos cedidas, sinto tua presença sempre comigo.

Às minhas queridas mulheres, minha mãe Graciete Maria Ferreira dos Santos e minha avó Maria Anunciada Souza da Silva Santos, pelo apoio incondicional, afeto, carinho e amor. Alguns meses distante de vocês me fez perceber que o meu amor é imensurável por cada uma, vocês são meu combustível pra vencer os obstáculos e as dificuldades da vida e o motivo pelo qual sigo em frente em busca dos meus sonhos.

À toda minha família, pai, irmãos, tios, tias, primos e primas que contribuíram direta e indiretamente para que eu alcançasse essa conquista, especialmente ao meu pai Luis Carlos de Souza Albuquerque pelo apoio e incentivo durante esta jornada, ao meu tio Luiziano Cavallero que sempre estendeu a mão quando eu precisava, minha prima Daniela Oliveira que sempre me abrigava em sua casa com todo carinho durante os dias de experimento, a Deocilo Carneiro e Iris Siqueira que me ajudaram muito nos momentos difíceis, permitindo que eu continuasse a realização desse sonho.

À minha orientadora Prof. Dra. Lindsay Unno Gimenes, por todos os ensinamentos repassados durante essa trajetória. Obrigado pela confiança que foi depositada em mim, pela compreensão especialmente na reta final e pelos momentos de alegria compartilhados. Sou muito sortudo e grato por ter encontrado uma orientadora tão competente e exemplar que me fez amadurecer muito. Tenha certeza que você contribuiu demasiadamente para minha formação profissional.

Aos meu orientadores Dr. Moyses dos Santos Miranda pelo comprometimento, apoio e ensinamentos durante a primeira etapa do experimento, o aprendizado foi intenso assim como a dedicação e interesse para que tudo desse certo. Agradeço da mesma forma por ter encontrado um profissional tão inteligente e comprometido com a pesquisa, que me fez enxergar o quanto a ciência é fascinante. Ao Dr. Rinaldo Batista Viana, pelas oportunidades oferecidas, pelas correções e ajustes no trabalho, pela ajuda para suprir falta de materiais e pelo comprometimento. Obrigado pelos ensinamentos e dedicação durante todos esses anos. Ao Dr Fabio Morato Monteiro,

pelo apoio, aprendizado, pelas correções no trabalho e por me oferecer subsídios para que eu pudesse concretizar o experimento da melhor forma possível. A ajuda de todos vocês foi extremamente importante para que eu finalizasse esta etapa com sucesso.

Aos meus queridos amigos paraenses e companheiros de jornada em Jaboticabal: Paulo Henrique Leal Bertolo, Ana Claudia Albuquerque, Maria Eduarda Moutinho, Marcela Moraes, Victor Santos, Priscila Del Aguila, Elaine Santos, Fausto Almeida, Victor Yunes, Vivian Tavares, Damazio Campos e Marina Brito, obrigado pela convivência diária, pelas risadas, pelos momentos felizes que compartilhamos juntos, vou levar essa experiência pro resto da minha vida. Vocês foram capazes de tornar esta jornada menos desgastante e mais prazerosa, longe de casa, muitas vezes, vocês foram a minha família e as únicas pessoas que eu podia contar quando as coisas apertavam. Se fui feliz nesta cidade foi por que vocês estavam presentes. Obrigado por me fazerem entender o verdadeiro valor da amizade.

Às colegas de pós-graduação: Cecília Silveira, Julia Pierucci, Amanda Lemes e Suzane Campanholi, muito obrigado pelo apoio, ajuda e companheirismo, vocês foram muito importante durante esta trajetória. Torço muito por cada uma de vocês!

Aos meus queridos companheiros do PETVet/Gaia André Mendonça, Gabriel Furtado, Carol Teixeira, Samantha Silva, Alef Rodrigo e Caio Mendes por me ajudarem na primeira etapa do experimento, tendo que faltar aula e arcar com os próprios custos as viagens. Meu muito obrigado a todos pela consideração, sou muito grato por ter feito parte desse grupo tão acolhedor e prestativo.

Aos funcionários da Central de Biotecnologia da Reprodução Animal (CEBRAN) que cuidavam diariamente dos animais e colhiam o sêmen dos touros toda semana, sempre me ajudavam quando eu precisava, meu muito obrigado! Aos diretores da Central, Prof. Aluizio Almeida Silva e Prof. José Sousa por abrirem as portas da instituição e me cederem tudo que eu precisava, agradeço pela acolhida e receptividade que eu tive no local. As técnicas de laboratório Helbilena Rodrigues e Lucilene Monteiro pelos ensinamentos e ajuda nos dias de colheita, aos residentes Fabio Trindade e Dani Barbosa, estagiários Tomaz Maia e Moises Lima muito obrigado pela contribuição durante todo o experimento.

À professora Adriana Novaes dos Reis e Lilian Ximenes pela ajuda, pela paciência e ensinamentos repassados durante o período inicial do experimento.

Ao meu grande amigo e parceiro de pós-graduação Rodrigo de Moraes, teu apoio foi essencial pra finalização desse trabalho. Obrigado por me acompanhar em todas as colheitas, sem faltar um único dia e me ajudar no laboratório, sem dúvida foi meu braço direito nesse experimento. Muito obrigado mesmo, serei eternamente grato!

Ao Centro APTA Bovinos de Corte, unidade de pesquisa do Instituto de Zootecnia em Sertãozinho/SP, especialmente a Erika Ribeiro pela ajuda nas análises do CASA. Da mesma forma agradeço a Dra Claudia Cristina Paro de Paz pela execução das análises estatísticas e por todas as dúvidas sanadas.

À Universidade do Estado de São Paulo, Departamento de Reprodução Animal, especialmente ao professor Marcilio Nichi pela colaboração e análise das amostras, muito obrigado pela receptividade e por ceder todo material que foi preciso para realização das análises. Estendo meus agradecimentos a sua equipe de trabalho, especialmente a técnica de laboratório Claudia Pereda e a pós-graduanda Giulia Kawaique me ajudaram na execução das análises em todas as etapas.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Unesp de Botucatu, Departamento de Radiologia Veterinária e Reprodução Animal, especialmente ao professor Dr. Frederico Ozanan Papa por conceder a permissão para que eu pudesse realizar as análises no laboratório e a Dra. Camila de Paula Freitas Della'Aqua pela colaboração e realização das análises no citômetro de fluxo, muito obrigado pelos ensinamento, correções no trabalho e por todas as dúvidas sanadas.

À minha banca de mestrado, Dr. Rubens Paes de Arruda e Dr. Marcilio Nichi, pela qual tenho profunda admiração por serem excelentes profissionais, muito obrigado por todas as considerações realizadas que enriqueceram o trabalho, foram muito proveitosos os ensinamentos. Sinto-me honrado ter sido avaliado por dois grandes profissionais.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Unesp de Jaboticabal, pela oportunidade de estudar em uma das maiores e mais conceituadas universidades do

país. Ao Departamento de Reprodução Animal, funcionários e docentes, pelo acolhimento, hospitalidade e ensinamentos ao longo dessa jornada.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

À Fundação para o Desenvolvimento da Unesp (FUNDUNESP), proc: 2523-002-14 PROPe-CDC, pelo suporte financeiro para execução do trabalho.

À Botupharma® pelo oferecimentos dos produtos utilizados no experimento.

Por fim, agradeço aos únicos seres ainda capazes de surpreender o homem: os animais, obrigado por me fazerem entender a minha verdadeira missão neste mundo.

SUMÁRIO

	Página
Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais	iii
Resumo	iv
Abstract	v
Lista de Abreviaturas.....	vi
Lista de Tabelas	ix
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
1.1INTRODUÇÃO	1
1.2 REVISÃO DE LITERATURA	3
1.2.1 Criopreservação do sêmen.....	3
1.2.2 Características reprodutivas de búfalos.....	5
1.2.3 Fatores que afetam a qualidade do sêmen criopreservado de búfalos	6
1.2.4 Plasma seminal	9
1.2.5 Remoção de plasma seminal por centrifugação	13
1.2.6 Remoção de plasma seminal por filtragem	16
1.2.7 Espécies reativas ao oxigênio (EROs) e seus impactos sobre a qualidade do sêmen	18
1.3. HIPÓTESES	21
1.4 OBJETIVOS	22
1.5 REFERÊNCIAS.....	23
CAPÍTULO 2 – COMPARAÇÃO ENTRE DOIS MÉTODOS DE REMOÇÃO DE PLASMA SEMINAL NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE BÚFALOS (<i>Bubalus bubalis</i>).....	38
Resumo.....	39
1. INTRODUÇÃO.....	40
2. MATERIAL E MÉTODOS	42

2.1 Colheita e processamento do sêmen.....	42
2.2 Criopreservação do sêmen	43
2.3 Avaliação computadorizada motilidade espermática	44
2.4 Análises funcionais espermáticas	45
2.4.1 Avaliação da integridade de membrana plasmática e acrossoma	46
2.4.2 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial	46
2.4.3 Espécies Reativas ao Oxigênio	47
2.5 Determinação da peroxidação lipídica induzida	47
2.6 Análise Estatística	48
3. RESULTADOS	49
4. DISCUSSÃO	50
5. CONCLUSÕES	55
REFERÊNCIAS.....	57
Tabelas	66
Apêndice.....	69



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 12072/14 do trabalho de pesquisa intitulado **"Remoção de plasma seminal na criopreservação de sêmen de búfalos (*Bubalus bubalis*)"**, sob a responsabilidade da Prof.^a Dr.^a Lindsay Unno Gimenes está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 07 de julho de 2014.

Jaboticabal, 07 de julho de 2014.


Prof.^a Dr.^a Paola Castro Moraes
Coordenadora – CEUA

COMPARAÇÃO ENTRE DOIS MÉTODOS DE REMOÇÃO DE PLASMA SEMINAL NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE BÚFALOS (*Bubalus bubalis*)

RESUMO- A criopreservação provoca injúrias aos espermatozoides e necessita de métodos que minimizem esses danos. Embora seja bastante discutida, a remoção do plasma seminal tornou-se uma alternativa para melhorar a qualidade e viabilidade espermática após a congelação e vem sendo utilizada em outras espécies na tentativa de obter bons resultados. O objetivo deste estudo foi comparar a remoção do plasma seminal de bubalinos tanto por filtragem (SpermFilter®) quanto por centrifugação sobre a qualidade do sêmen descongelado de búfalos. Foram utilizados sete touros da raça Murrah, os quais foram submetidos à colheita de sêmen por vagina artificial uma vez por semana. Os ejaculados foram diluídos com Botu-Bov® e fracionados em alíquotas para confrontar três técnicas antes da congelação: grupo C (Criopreservação convencional com plasma seminal), grupo CE (Criopreservação removendo o plasma seminal por centrifugação) e grupo F (Criopreservação removendo o plasma seminal por filtragem). O sêmen fresco foi analisado quanto ao volume, aspecto, cor, concentração (câmara de Neubauer), turbilhonamento, motilidade progressiva, vigor e morfologia espermática. No sêmen descongelado, foram avaliados a cinética espermática pelo CASA, a integridade de membrana plasmática, acrossoma, potencial de membrana mitocondrial e quantificação de EROs por citometria de fluxo e, adicionalmente, foi estimado o grau de peroxidação lipídica pela técnica de TBARS. Os resultados revelam que a remoção de plasma seminal não proporcionou aumento da velocidade espermática, alteração no potencial de membrana mitocondrial e nem modificou o grau de peroxidação lipídica. Entretanto, a presença do plasma seminal (grupo controle) e a centrifugação provocou maiores índices de lesões na membrana plasmática, quando estas apresentam o acrossoma intacto ($47,88 \pm 1,99\%$ vs. $41,30 \pm 1,96\%$, respectivamente) em comparação ao grupo F ($40,45 \pm 2,01\%$; $p < 0,07$). A lesão em ambas as membranas (acrossomal e plasmática) foi mais evidente na filtragem ($22,18 \pm 1,07$) em relação ao grupo controle ($15,23 \pm 1,06$), sendo que a centrifugação não diferiu entre os grupos ($17,43 \pm 1,04$; $p < 0,01$). A EROs foi mais evidente no grupo CE ($56,68 \pm 4,53\%$) em relação ao grupo C e F ($21,83 \pm 4,60\%$ vs. $20,96 \pm 4,7\%$, respectivamente; $p < 0,01$). Portanto, as hipóteses de que a remoção de plasma seminal melhoram a cinética espermática e proporcionam menores índices de lesões na membrana plasmática não foram confirmadas. Embora a filtragem tenha apresentado vantagem sobre a centrifugação gerando menor quantidade de EROs, não se justifica a remoção do plasma seminal em búfalos devido aos resultados serem muito semelhantes ao grupo controle.

Palavras-chave: Bubalinos, ejaculado, centrifugação, filtragem, plasma seminal.

COMPARISON OF TWO METHODS OF REMOVAL SEMINAL PLASMA ON THE CRYOPRESERVATION OF BUFFALO SPERM (*Bubalus bubalis*)

ABSTRACT - Cryopreservation promotes injury to sperm and methods to minimize such damage are necessary. Although much discussed, removal of seminal plasma that has been successfully used in other species has become an alternative for improving sperm quality and viability after freezing. The aim of the present study was compare to removal seminal plasma in buffalo both by filtering (SpermFilter®) and by centrifugation on the quality frozen thawed buffalo semen. For this purpose, semen of seven Murrah buffalo-bulls, which were submitted to semen collection by artificial vagina once a week. The samples were diluted with Botu-Bov® and were fractionated in aliquots to confront three techniques before freezing: C group (conventional cryopreservation with seminal plasma), CE group (cryopreservation removing the seminal plasma centrifuge) F group (Cryopreservation removing the seminal plasma with Sperm Filter®). Fresh semen was analyzed for volume, appearance, color, concentration (Neubauer chamber), gross motility, progressive motility, vigor and sperm morphology. In the thawed sperm, sperm kinetics was evaluated by CASA, plasma membrane and acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential and estimation of the levels of reactive oxygen species were assigned by flow cytometry and was estimated degree of lipid peroxidation by TBARS technique. The results show that the removal seminal plasma did not improve sperm kinetics, mitochondrial membrane potential and does not modify the degree of lipid peroxidation. However, the presence of seminal plasma (control group) and centrifugation resulted in higher rates of injury to the plasma membrane, where they have an intact acrosome ($47,88 \pm 1,99\%$ vs. $41,30 \pm 1,96\%$, respectively) compared to F group ($40,45 \pm 2,01\%$; $p < 0.07$). The damage in both membranes (acrosome and plasma) was more evident in filtering ($22,18 \pm 1,07$) compared to the control group ($15,23 \pm 1,06$), and centrifugation did not differ between groups ($17,43 \pm 1,04$; $p < 0.01$). ROS production was more evident in the CE group ($56,68 \pm 4,53\%$) compared to the C and F group ($21,83 \pm 4,60\%$ vs. $20,96 \pm 4,7\%$, respectively; $p < 0.01$). Therefore, removal seminal plasma is not beneficial to sperm, as did not alter the sperm kinetics nor provided lower lesions rates in the plasma membrane, although the filter has presented advantage over centrifugation as generated lower amount of ROS, not justifies the use both technique because the results are very similar to those with seminal plasma.

Keywords: Buffalo, semen, centrifugation, filtering, seminal plasma.

LISTA DE ABREVIATURAS

%: porcentagem

°C: graus Celsius

μL: microlitro

μm: micrometro

AGPI: ácidos graxos poli-insaturados

ALH: amplitude de deslocamento lateral da cabeça

ALT: Alanina Aminotransferase

AST: Aspartato Aminotransferase

ATP: Adenosina Trifosfato

BCF: frequência de batimento flagelar

BSP: proteínas do plasma seminal bovino

C: controle

CE: centrifugação

Cu: cobre

cm: centímetro

CASA: análise computadorizada da motilidade espermática

CFDA: diacetato de carboxifluoresceína

CI: células íntegras

CT: células totais

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

EROs: espécies reativas ao oxigênio

FITC: isotiocionato de fluoresceína

F: filtração

Fe: ferro

g: força centrífuga

GPx: Glutathione Peroxidase

GSH: Glutathione

GST: Glutathione S-Transferase

h: hora

Hz: hertz

H342: Hoechst 33342

H258: Hoechst 33258

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

HBP: proteínas ligadoras à heparina

HOS: teste hiposmótico

HPM: alto potencial mitocondrial

IA: inseminação artificial

JC-1: iodeto de 5, 5', 6, 6', tetracoloro-1, 1', 3, 3' – tetraetilbenzimidazolilcarbocianina

LIN: linearidade

LPM: baixo potencial mitocondrial

MDA: malondialdeído

mL: mililitro

MOT: motilidade

MPIAI: membranas plasmática íntegras e acrossoma íntegro

MPIAL: membranas plasmáticas íntegras e acrossoma lesado

MPLAI: membranas plasmáticas lesadas e acrossoma íntegro

MPLAL: membranas plasmáticas lesadas e acrossoma lesado

NaOH: hidróxido de sódio

NO[•]: óxido nítrico

O₂^{•-}: ânion superóxido

OH⁻: hidroxila

OONO[•]: peroxidonitrito

PBS: tampão fosfato salino

PI: iodeto de propídio

PROG: progressivo

PSA: *Pisum sativum*

RAP: espermatozoides rápidos

SOD: Superóxido Dismutase

STR: retilinearidade

TALP: tyrodes com albumina, lactato e piruvato

TBA: ácido 2-tiobarbitúrico

TBARS: substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico

TCA: ácido tricloroacético

TTR: teste de termo resistência

VAP: velocidade média da trajetória

VCL: velocidade curvilínea

VSL: velocidade linear progressiva

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Página

Tabela 1. Composição de fosfolípidios da membrana plasmática de espermatozoides de búfalos.....	8
--	---

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Características físicas e morfológicas do sêmen fresco de touros búfalos (<i>Bubalus bubalis</i>)	66
---	----

Tabela 2. Média $\pm$ erro padrão da análise computadorizada da cinética espermática (CASA) do sêmen de búfalos submetidos a duas distintas técnicas de remoção do plasma seminal (centrifugação x filtração)	67
--	----

Tabela 3. Média $\pm$ erro padrão da integridade de membrana plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial, produção de espécies reativas ao oxigênio analisadas por citometria de fluxo e peroxidação lipídica mensurada por TBARS do sêmen de búfalos submetido a duas distintas técnicas de remoção do plasma seminal (centrifugação x filtração)	68
---	----

CAPÍTULO 1- Considerações gerais

1.1 Introdução

A criação de búfalos tornou-se uma atividade importante e está se desenvolvendo no país como alternativa rentável, uma vez que o búfalo se adapta facilmente aos mais variados ecossistemas. Paralelamente a isso, a demanda por alimentos como queijos e manteiga proporcionou o crescimento da produção de leite de búfalo, visto que o rendimento na fabricação dos derivados é maior em virtude dos elevados teores de gordura e sólidos totais. A carne também é apreciada por conter mais proteínas e minerais que a dos bovinos, além de possuir menores teores de gordura, colesterol e calorias (MAPA, 2014).

Esse crescimento na bubalinocultura provoca aumento da necessidade por animais selecionados e geneticamente capazes de alavancar a produtividade dos rebanhos. Todavia, para esse incremento se tornar viável, uma das alternativas mais promissoras é a utilização de biotécnicas aplicadas à reprodução animal, como meio disseminador de características genéticas desejáveis a fim de melhorar a eficiência reprodutiva e produtiva dos animais (OHASHI et al., 2003).

Entre essas biotécnicas, a Inseminação Artificial (IA) vem sendo empregada pelos produtores, pois apresenta resultados satisfatórios de produtividade e ganho genético, além da caracterização uniforme dos rebanhos (GARCIA et al., 2006). Esta biotécnica proporciona a maximização da utilização do sêmen, difundindo material genético de boa qualidade dos melhores reprodutores (NUNES, 2004).

Para realização da IA, torna-se necessário o domínio da congelação de sêmen. Por isso é imperativo para a conservação do ejaculado bubalino, amplos conhecimentos acerca da fisiologia das células espermáticas, bem como sobre os diferentes diluidores, crioprotetores e antimicrobianos usados durante as diferentes fases do processamento do sêmen, para que após a descongelação se obtenha uma boa taxa de sobrevivência dos espermatozoides (SILVA et al., 2002).

Em contraponto ao avanço dos estudos em prol do desenvolvimento no processo de congelação, ainda verificam-se alterações significativas que comprometem a estrutura e funcionamento das células, induzindo, também,

mudanças na capacitação espermática e na reação acrossomal (GARNER et al., 2001). Embora existam pesquisas sobre a criopreservação do sêmen bubalino, ainda existem lacunas do conhecimento sobre essa temática, bem como muita dúvida em relação aos melhores diluidores, crioprotetores e métodos de congelação e descongelação para o sêmen dessa espécie. Os espermatozoides geralmente sofrem lesões durante o processo de congelação, demonstrando a necessidade de alternativas que promovam maior proteção da célula durante esse processo, mantendo sua viabilidade e capacidade de fertilização (ZORZETTO, 2013).

Uma alternativa a ser estabelecida na tentativa de melhorar a qualidade dos ejaculados dos búfalos, é a remoção do plasma seminal. Apesar de controversa, esta metodologia vem sendo defendida por vários pesquisadores como forma de melhorar as variáveis e a capacidade fertilizante dos espermatozoides (SHIVAJI; BHARGAVA, 1987; KILLIAN et al., 1993; BELLIN et al., 1998; WAY et al., 2000; BERGERON et al., 2004; KARESKOSKI et al., 2008).

Por outro lado, existe outra vertente afirmando que a presença do plasma seminal é benéfica às células espermáticas, uma vez que os constituintes do plasma, principalmente os antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, protegem os espermatozoides contra a peroxidação lipídica provocada pela produção de espécies reativas ao oxigênio (EROs; MOORE et al., 2005; GUASTI et al., 2012) e, além disso, há ainda aqueles que adotam a readição desse composto após a descongelação (ANDRADE et al., 2011; MORRELL et al., 2014).

Geralmente a retirada do plasma seminal é feita pelo método de centrifugação. O uso deste método é rotineiramente empregado em garanhões e suínos, porém pouco estudado em bovinos e outras espécies. Todavia, pesquisas indicam que a centrifugação gera prejuízos na fertilização, uma vez que pode promover injúrias aos espermatozoides (ECOT et al., 2005; KNOP et al., 2005; SIEME et al., 2006).

Recentemente surgiu um dispositivo que pode ser um método alternativo à centrifugação. Este dispositivo, o SpermFilter® (BotuPharma, Botucatu, São Paulo, Brasil), retêm os espermatozoides separando-os do plasma seminal e de bactérias (SANCLER-SILVA et al., 2012; RAMIRES NETO et al., 2013b).

O fato é que em búfalos, os estudos referentes à viabilidade e funcionalidade espermática quanto à presença ou ausência do plasma seminal dos ejaculados submetidos à criopreservação são escassos. Destarte, apresenta-se a seguir uma revisão acerca de importantes aspectos inerentes a criopreservação do sêmen; características do sêmen de búfalos, fatores que afetam a qualidade do sêmen criopreservado de búfalos; plasma seminal; remoção de plasma seminal por centrifugação e filtragem com SpermFilter®; espécies reativas ao oxigênio e seus impactos sobre a qualidade do sêmen.

1.2. Revisão de literatura

1.2.1 Criopreservação do sêmen

O objetivo de criopreservar sêmen está atrelado a obtenção de um banco de células espermáticas destinadas ao uso de diversas biotécnicas de reprodução animal a fim de promover o melhoramento genético dos rebanhos (AMIRAT et al., 2004). Além disso, a criopreservação visa manter a funcionalidade dos espermatozoides para que a fecundação não seja comprometida, visto que as variações de temperatura e de osmolaridade provocam estresse significativo à estrutura das células espermáticas (WATSON 1992; KOMMISRUUD et al., 1996; HOLT, 2000; WATSON, 2000; RASUL et al., 2001).

A sensibilidade ao choque térmico varia entre os indivíduos e dependerá do grau de maturação dos espermatozoides, da espécie em questão e da composição e quantidade do plasma seminal, sendo determinada pelo conteúdo de colesterol e o grau de saturação dos ácidos graxos (WATSON, 1995).

Os danos espermáticos estão relacionados principalmente às lesões nas membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial alterando a viabilidade e as concentrações de Adenosina Trifosfato (ATP), afetando diretamente o potencial de fertilidade (PAPA et al., 2000; JANUSKAUSKAS et al., 2003; BLESBOIS, 2007).

Lesões provocadas pela variação de temperatura geralmente ocorrem entre 15°C a 5°C, reduzindo a motilidade e a atividade metabólica (WATSON, 2000; STORNELLI et al., 2005). Já a exposição dos espermatozoides às altas concentrações de solutos durante a criopreservação proporciona desidratação excessiva da célula e, conseqüentemente, alteração de funcionalidade (FAHY, 1980).

Isto ocorre devido ao desequilíbrio causado pelas mudanças no gradiente osmótico entre os meios intra e extracelular (SQUIRES, 1999). Neste contexto, Morris e Clarke (1987) descreveram efeitos e alterações como a formação de bolhas de gás que geram danos mecânicos às membranas e ao citoesqueleto, a viscosidade elevada da solução que implica em possíveis limitações no processo de difusão, as mudanças no pH que provocam desnaturação protéica e o contato direto entre células que proporcionam danos nas membranas.

Geralmente, os espermatozoides apresentam danos na membrana plasmática e citoesqueleto, além do aumento da quantidade de cálcio e potássio intracelular, diminuição do pH e principalmente redução da tolerância diante do estresse osmótico. Estas modificações além de provocar danos subletais, diminuem a vida útil dos espermatozoides e comprometem a interação dessas células com o ambiente uterino (PONS-REJRAJI; BAILEY; LECLERC, 2009).

Além disso, a criopreservação afeta a função espermática proporcionando aumento da permeabilidade da membrana e contribuindo com a elevação da quantidade de espécies reativas ao oxigênio. Os efeitos, muitas vezes, provocam mudanças irreversíveis na estrutura da célula uma vez que os espermatozoides são expostos a temperaturas muito baixas e ambientes com altas concentrações de soluto (MEDEIROS et al., 2002).

A redução da motilidade e vigor espermático é evidenciada nos ejaculados submetidos a congelamento. Watson et al. (1995) afirmam que os espermatozoides que foram criopreservados apresentavam grandes cristais de gelo nas mitocôndrias e perdas de conteúdo estrutural, possivelmente a produção de ATP fica comprometida com a criopreservação, visto que as mudanças drásticas deste processo alteram o transporte de prótons na membrana e fosforilação oxidativa.

Tanto a membrana plasmática quanto a acrossomal sofrem com as lesões provocadas pela rápida congelamento, visto que a mudança drástica de temperatura acarreta estresse sobre a membrana decorrente das modificações de fase dos lipídios da bicamada e alterações do estado funcional da membrana (AGCA; CRISTER, 2002).

As taxas de sobrevivência do sêmen de búfalos submetidos a criopreservação apresentam ampla variação, cerca de 32,5% a 58,8% de espermatozoides de

bubalinos tornam-se inviáveis para a fertilização (OBA et al., 1993). Resultados semelhantes já foram descritos por Silva et al. (2002), em que observaram 42,5% de espermatozoides de búfalos incapazes de fecundar após o processo de congelamento. Portanto, alternativas que amenizem os efeitos deletérios provocados pela congelamento são necessárias, além do mais, a aplicação de biotécnicas da reprodução em búfalos, muitas vezes segue a mesma metodologia desenvolvida para bovinos (OHASHI et al., 2003) e isto revela a necessidade de se determinar metodologias espécie-específicas, considerando as particularidades anatômicas e fisiológicas da espécie bubalina (OBA et al., 1993).

1.2.2 Características reprodutivas de touros bubalinos

Algumas características do sistema genital masculino do búfalo são semelhantes ao bovino, a exemplo do prepúcio que não é tão pendular, o que determina a ausência da dobra triangular de pele na região abdominal. Embora o pênis seja semelhante ao do bovino, apresenta tamanho inferior, assim como os testículos, glândulas vesiculares e ampolas (FISHER; BODHIPAKSHA, 1992).

Diferentemente dos bovinos, o búfalo possui bolsa escrotal menos pendular e destacada, apresentando o espaço inter-escrotal menor e limitado, o que remete a falsa aparência de assimetria do órgão uma vez que os testículos podem se locomover para o pólo proximal ou caudal (OHASHI, 2002).

O comportamento sexual é menos intenso que os dos bovinos e a libido é manifestada mais durante a noite, após o pôr do sol ou ainda de madrugada. O macho se aproxima da fêmea em busca do cheiro da vulva ou da urina, sendo que a monta dura alguns segundos, o impulso ejaculatório tem menos intensidade que o dos bovinos (HAFEZ; JAINUDEEN; ROSINHA, 2004).

Os búfalos assim como os zebuínos apresentam desenvolvimento testicular tardio quando comparados com raças taurinas. Até os 14 meses esse desenvolvimento reprodutivo acontece gradualmente, a partir dos 18 meses a atividade espermatogênica é acelerada e aos 24 meses os animais encontram-se capazes de iniciar a vida reprodutiva, mesmo não atingido o pleno desenvolvimento testicular e reprodutivo (OHASHI, 1993).

O ciclo espermatogênico do búfalo dura em média 38 dias e a duração do ciclo do epitélio seminífero é de aproximadamente oito dias e com 4,4 ciclos consecutivos (SHARMA; GUPTA, 1980).

Ahmad et al. (2010) verificaram o estabelecimento da espermatogênese em búfalos com 1, 6, 12, 18 e 24 meses. Os autores notaram que no primeiro mês de idade os espaços intertubulares são mais largos que nos outros estágios de desenvolvimento; ao sexto mês ainda não havia formação do lúmen e os túbulos seminíferos continham poucas células; com um ano de idade o cordão espermático aumentou de tamanho consideravelmente, a formação do lúmen foi iniciada e as células de Leydig foram observadas em pequenos grupos nos espaços intertubulares. Aos 18 meses, espermátides longas e arredonadas são encontradas e a formação do lúmen é finalizada; aos dois anos de idade o processo de espermatogênese é ativado na maioria dos túbulos seminíferos e observa-se a presença de grandes quantidades de espermátides e espermatozoides maduros.

Em relação ao ejaculado, o sêmen de búfalos com boa qualidade caracteriza-se pela coloração branco-leitoso a acinzentada, o volume seminal varia de 1 a 3 mL para touros jovens e 1 a 6 mL para touros adultos, a concentração espermática entre 300 a 1.200×10^6 de células por mililitro, turbilhonamento e vigor mínimo de 3 (escala de 0 a 5), motilidade espermática entre 60% e 80% e pH entre 6,5 e 7,2, sendo que o método de colheita eleito é a vagina artificial (VALE, 2002).

Kiani et al. (2014) avaliaram as características físicas do sêmen de búfalos no Paquistão e observaram em touros adultos coloração branco-leitoso, volume seminal de 3,9 mL, pH de 6,87, motilidade espermática 76,5% e turbilhonamento de 3,83. Enquanto que Garcia et al. (2010) notaram que o ejaculado de touros bubalinos apresentavam 1,84 mL de volume seminal, 3,55 de turbilhonamento, 78,9% de espermatozoides móveis, 4,07 de vigor espermático e concentração espermática de 1.140×10^6 células/mL.

1.2.3 Fatores que afetam a qualidade do sêmen criopreservado de búfalos

Em bubalinos, os índices de sobrevivência espermática após a criopreservação são relativamente menores em comparação aos equinos e bovinos (SANSONE; NASTRI; FABBROCINI, 2000; ANDRABI et al., 2009). Segundo Ansari et al. (2012), o

sêmen de búfalo é formado por um sistema anti-estresse oxidativo composto por enzimas, vitaminas e antioxidantes e, durante o processo de criopreservação, a funcionalidade desse sistema torna-se incapaz de combater os danos provocados pela congelação e descongelação, uma vez que as concentrações de antioxidantes naturais presentes no sêmen são baixas e os níveis ainda diminuem durante a diluição e o processo de criopreservação (EL-SISY et al., 2007; KUMAR et al., 2011).

A queda do potencial fertilizante em búfalos pode ser atribuída a diversas causas, muitas das quais desconhecidas ainda, porém uma delas está atrelada aos compostos bioquímicos presentes na membrana plasmática, os quais influenciam diretamente na instabilidade das membranas durante a criopreservação (RAIZADA et al., 1990; ANDRABI et al., 2008).

Percebe-se que os espermatozoides bubalinos são mais susceptíveis aos prejuízos provocados durante a congelação do que os de bovinos, uma vez que a quantidade de fosfolipídios entre as espécies difere consideravelmente, como é o caso da fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina, substâncias que compõem boa parte dos lipídios da membrana plasmática e exercem papel fundamental na proteção dessas células. Para se ter uma ideia, a fosfatidilcolina compõe aproximadamente 66% dos fosfolipídeos encontrados na parte externa da membrana plasmática dos espermatozoides bubalinos e, em bovinos, essa quantidade reduz para 50%. Já no caso da fosfatidiletanolamina, a composição da parte interna da membrana plasmática gira em torno de 23% enquanto que nos espermatozoides bovinos diminui para 10% (PARKS; ARION; FOOTE, 1987; CHESHMEDJIEVA; DIMOV 1994).

Esses dois componentes abundantes na composição da membrana plasmática possuem grande influência no metabolismo celular, porém durante o processo de criopreservação estes fosfolipídios, que possuem cadeias de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), alteram a sua própria conformação devido à redução da temperatura, invertendo as extremidades, ou seja, a camada externa passa a ser hidrofóbica e camada interna hidrofílica. Este rearranjo estrutural é transitório para alguns fosfolipídios, entretanto, para a fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina, esta estrutura alterada permanece, ocasionando perdas irreparáveis devido ao aumento da permeabilidade, o que provoca a desestabilização da membrana por meio de canais estabelecidos que permitem a entrada de íons e pequenas moléculas (PARKS;

GRAHAM 1992; VISHWANATH; SHANNON, 1995; WATSON, 1995). A composição de fosfolipídios da membrana plasmática do sêmen de búfalos está ilustrada na Tabela 1.

Tabela 1. Composição de fosfolipídios da membrana plasmática de espermatozoides de búfalos.

Fosfolipídios	% Total de fosfolipídios
Fosfatidiletanolamina	22,9±1,6
Fosfatidilcolina	66,0±3,5
Fosfatidilserina	3,5±0,5
Fosfatidilinositol	2,5±0,4
Esfingomiélin	8,0±1,9
Fosfatidilglicerol	4,7±0,6
Difosfatidilglicerol	5,0±0,9

Adaptado de Andrabi et al. (2009) e Cheshmedjieva & Dimov (1994).

Além disso, em búfalos, o contato da membrana plasmática com AGPI é muito maior em comparação com os bovinos (CHESHMEDJIEVA; DIMOV 1994). O sêmen bubalino é rico em AGPI, como o ácido araquidônico e o ácido docosahexaenóico. Essa particularidade faz com que o sêmen de búfalos apresente menor resistência aos danos provocados pelo estresse oxidativo durante a criopreservação (NAIR et al, 2006), diminuindo a motilidade e afetando a integridade da membrana plasmática, acrossomal e cromatina dos espermatozoides bubalinos (RASUL et al 2001; ANZAR et al 2010).

Outro fator ligado à diminuição da capacidade fertilizante do sêmen congelado está relacionado ao desencadeamento do processo de criocapacitação, o qual está estritamente associado à redução da longevidade e da capacidade de sobrevivência dos espermatozoides criopreservados de búfalos no trato reprodutor feminino (KAUL et al., 2001; KADIRVEL et al., 2009). Esse processo assemelha-se ao que ocorre

durante a capacitação propriamente dita, e promove reorganização e aumento da fluidez da membrana plasmática e influxo de cálcio para o interior da célula (MAXWELL; JOHNSON, 1997; GREEN; WATSON, 2001; SCHEMBRI et al., 2002).

Segundo Cormier, Sirard e Bailey (1997), os espermatozoides criocapitados podem até sofrer a reação acrossômica e vir a fertilizar oócitos *in vitro*, porém estas células são incapazes de ligar ao epitélio da tuba uterina para que haja a formação do envoltório espermático. Desta forma, o tempo de sobrevivência do espermatozoide criocapitado no trato reprodutor feminino é reduzido drasticamente (ABAD et al., 2006).

Além disso, durante a criopreservação as células espermáticas podem sofrer apoptose devido a uma série de fatores tais como: mudanças na composição lipídica e na proporção de fosfolipídios da membrana plasmática, alteração da arquitetura da membrana mitocondrial, além da formação excessiva ou inadequada de EROs, devido à exposição a ambientes aeróbios durante a diluição, congelação e descongelação levando à peroxidação lipídica da membrana plasmática ou até mesmo à disfunção mitocondrial (KHAN et al., 2009; KADIRVEL et al., 2012).

Esses fatores são indicativos de que o sêmen congelado de búfalos apresenta menor congelabilidade quando comparado com bovinos, devido a maior susceptibilidade às mudanças (MUER et al., 1988; ANDRABI et al., 2001; AHMAD et al., 2003; SENATORE et al., 2004; KUMARESAN et al., 2005; KUMARESAN et al., 2006; SHUKLA; MISRA, 2007; KADIRVEL et al., 2009), o que pode potencialmente comprometer a fertilidade na espécie.

1.2.4 Plasma seminal

O plasma seminal é o produto das secreções produzidas pelo testículo e glândulas anexas, sendo liberado durante a ejaculação por meio das contrações uretrais e das glândulas sexuais acessórias (ampola do ducto deferente, próstata, vesícula seminal e glândula bulbouretral; RESENDE et al., 2013).

Aspectos positivos nas funções espermáticas são atribuídos ao plasma seminal, como o auxílio na motilidade, atuação como tampão, fornecimento de nutrientes e meio de transporte para os espermatozoides, além da capacitação espermática e função antioxidante (MILLER et al., 1990; KILLIAN et al., 1993; BELLIN et al., 1998).

O volume e a composição do fluido seminal apresenta variação quanto aos indivíduos, aos ejaculados e até mesmo a estação do ano, além da própria variabilidade evolutiva, o que determina as características espécie-específicas (JOBIM et al., 2004).

O plasma seminal bubalino contém frutose, ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido láctico, lipídeos, proteínas, minerais, antioxidantes, colesterol e outras substâncias que fornecem energia aos espermatozoides (AHMAD et al., 1996; ANDRABI et al., 2009). Por motivo da escassez de meio intracelular do espermatozoide, esta grande variedade de componentes do plasma seminal permite compensar a falta de componentes no interior da célula (AITKEN; BAKER 2004).

Diversos estudos afirmam que algumas proteínas do plasma seminal de búfalos, como é o caso das proteínas ligadoras à heparina, exercem um papel de modulação das propriedades espermáticas, sendo predominantes em touros de alta fertilidade, além de exercer um papel importante na proteção aos espermatozoides contra as crioinjúrias provocadas pela criopreservação (ARANGASAMY et al., 2005; KUMAR et al., 2008). As frações protéicas (24.5, 45 e 55 kDa) do plasma seminal de bubalinos foram altamente correlacionadas com motilidade progressiva no sêmen fresco ($r=0,50$), viabilidade espermática nos ejaculados descongelados ($r=0,43$) e morfologia espermática anormais ($r=0,61$), respectivamente (ASADPOUR et al., 2007).

Alguns pesquisadores defendem a presença do plasma seminal durante a congelação, uma vez que o cálcio e o magnésio presente no plasma seminal exercem papel fundamental na manutenção da motilidade e viabilidade espermática, melhorando a qualidade do ejaculado possibilitando maior fertilidade do sêmen bubalino (EGHBALI et al., 2010).

Eghbali et al. (2010b) ao determinarem a quantidade de ferro e chumbo do plasma seminal de bubalinos, perceberam que o ferro foi uma substância importante para a preservação espermática, sendo altamente associado com motilidade progressiva, turbilhonamento e viabilidade após a ejaculação, mantendo as funções espermáticas por mais tempo. Entretanto, o chumbo presente no plasma seminal apresentou efeitos deletérios sobre as variáveis espermáticas como o volume seminal,

motilidade, viabilidade, além de estar associado ao maior número de células morfológicamente anormais.

Da mesma forma, as enzimas presentes no plasma seminal de bubalinos também são fundamentais para os espermatozoides. Waheed et al. (2013) avaliaram a quantidade de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), glutathione (GSH), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione S-transferase (GST) e verificaram altas atividades dessas enzimas no sêmen que por sua vez influenciaram positivamente na motilidade espermática, diminuição do percentual de defeitos espermáticos de cauda, além de conferirem boa proteção aos espermatozoides contra o estresse oxidativo durante a congelação.

Para Ibrahim et al. (1981) a capacidade de conservação dos espermatozoides depende da presença do plasma seminal, uma vez que a viabilidade dos espermatozoides bubalinos foi melhorada utilizando metade do volume normal do plasma seminal. Segundo Sengupta, Singh e Rawal (1977), esta melhoria pode ser devido à redução dos fatores inibitórios presentes no plasma.

Em virtude disso, alguns autores recomendam manter pequenas concentrações do plasma seminal após a remoção para que haja a manutenção da qualidade espermática, visto que a remoção completa prejudica a longevidade do sêmen (JASKO et al., 1992; LOOMIS, 2006). Andrade et al. (2011) testaram o efeito da adição de plasma seminal autólogo e homólogo de garanhões (proveniente de outro animal com boa congelabilidade) e verificaram que a adição do plasma seminal tanto autólogo quanto homólogo implicaram em um número maior de células com a membrana plasmática e acrossomal íntegra avaliadas pela citometria de fluxo, além disso concluíram que o plasma seminal reintroduzido no ejaculado possibilita aumento na fertilidade espermática, sendo uma importante técnica a ser implementada antes da inseminação em virtude da maior população de células integras.

Morrell et al. (2012) em estudo conduzido em equinos, recomendaram adicionar 5 a 10% de plasma seminal para melhorar os resultados de fertilidade, porém essa reintrodução do plasma seminal deve ser feita momentos antes da inseminação artificial e não optar pelo armazenamento das amostras, pois desta forma aproveitaria os efeitos benéficos transitórios que foram evidenciados do plasma seminal relacionados a motilidade progressiva e evitaria que os efeitos adversos sobre a

integridade da cromatina (mostrados na pesquisa) prejudicasse as células espermáticas.

Em contrapartida, alguns estudos em outras espécies demonstram efeitos prejudiciais à viabilidade espermática devido à presença de plasma seminal (WAY et al., 2000). Nota-se diminuição da habilidade de fertilização (SHIVAJI; BHARGAVA 1987) e prejuízos no armazenamento do sêmen bovino (MARTINUS et al., 1991) além da ação de fatores inibidores de motilidade, como é o caso da proteína Dineína ATPase, relatada no plasma seminal humano (IWAMOTO; GAGNON 1988).

Zahn et al. (2006), em garanhões, atribuíram a diminuição na motilidade dos espermatozoides à presença de enzimas específicas, como a lipase contida no plasma seminal. Outro fator prejudicial é a presença de BSP's (Proteínas do Plasma Seminal Bovino), as quais estimulam o efluxo de lipídeos lesando a membrana dos espermatozoides, quando estes se expuserem continuamente ao fluido (BERGERON et al., 2004).

Harshan et al. (2009) detectaram pela primeira vez a presença da proteína PDC 109 no plasma seminal de búfalos. Esta proteína é constituinte da família das proteínas do grupo FN-2, o mesmo grupo das proteínas BSP A₁ e BSP A₂ do plasma seminal bovino, pois apresentam composição de aminoácidos muito semelhantes, diferindo apenas no grau de glicosilação (KUMAR et al., 2008). Singh et al. (2014) em sua pesquisa, afirmaram que a presença da proteína PDC 109 no sêmen bubalino foi responsável pela má congelabilidade devido aos danos causados durante a congelação.

Em outro estudo, Harshan et al. (2006) inseriram as proteínas de ligação à heparina (HBP), também chamadas de BSP's, no ejaculado de búfalos. Esta proteína é responsável pelo processo de capacitação espermática sendo produzida pelas glândulas sexuais acessórias e eliminada no fluido seminal. Contudo, nesta pesquisa os espermatozoides foram retirados da cauda do epidídimo, local onde a HBP não exerce ação. Os autores observaram queda na motilidade, viabilidade e na integridade do acrossoma para os espermatozoides que receberam esta proteína.

Kumar et al. (2016) ao quantificarem e investigarem o papel da leptina do plasma seminal de búfalos pela primeira vez, notaram que esta proteína revelou correlações altamente positivas com defeitos espermáticos ($r=0,38$) e graus de

peroxidação lipídica da membrana ($r=0,33$) e baixa correlação em relação a concentração espermática ($r=-0,34$), sugerindo que concentrações elevadas de leptina interferem no processo de espermatogênese porém o seu mecanismo ainda permanece desconhecido.

As alterações bioquímicas provocadas pelas ligações entre as proteínas do plasma seminal com as da membrana dos espermatozoides alteram a permeabilidade da membrana, causando injúria celular durante a congelação (KULKARNI et al., 1996). Além disso, a desestabilização da membrana plasmática impede a reação do acrossoma (KATSKA et al., 1996). Para Sahni et al. (1990), os efeitos da presença de fatores inibitórios no plasma seminal são mais acentuados no sêmen de búfalos do que no sêmen de bovinos.

1.2.5 Remoção de plasma seminal por centrifugação

Uma estratégia para minimizar os efeitos danosos da congelação é a remoção do plasma seminal antes da criopreservação, uma vez que grandes quantidades de plasma seminal no ejaculado causam vulnerabilidade ao choque frio, devido ao aumento da permeabilidade da membrana celular espermática (TIBARY et al., 1990).

A retirada de plasma seminal do ejaculado geralmente é feita por centrifugação. Esta técnica tornou-se um método adequado em equinos e vem sendo estudada em outras espécies, como forma de nivelar a variação de qualidade e quantidade dos ejaculados (PAPA et al., 1998), além de concentrar amostras antes da criopreservação (RIJSSELAERE et al., 2002).

A centrifugação do sêmen para remoção do plasma seminal na espécie equina tornou-se um procedimento complementar para a refrigeração dos ejaculados de garanhões, sendo implementada em programas de melhoramento genético nas centrais de inseminação (WAITE et al., 2008)

O conhecimento a respeito da força de rotação e o tempo da centrifugação devem ser levados em consideração para que bons resultados de congelabilidade do sêmen sejam mantidos, a fim de proporcionar aos espermatozoides maiores taxas de sobrevivência com danos funcionais e estruturais reduzidos (DELLA'AQUA JÚNIOR et al., 2001). Velocidades de rotação elevadas induzem aderência dos espermatozoides durante a formação do sedimento, por outro lado velocidades de

rotação baixas resultam em taxas de recuperação espermática reduzida e espermatozoides de boa qualidade acabam passando para o sobrenadante sendo descartados (WAITE et al., 2008; HOOGEWIJS et al., 2010).

Della'Aqua Júnior et al. (2001) testaram diferentes protocolos de centrifugação e concluíram que a velocidade e tempo ideais para submeter o sêmen de equinos era de 600× g durante 10 minutos, que por sua vez conferiram melhor qualidade ao ejaculado com perdas minimizadas.

Embora seja aplicado o uso correto da centrifugação, as perdas nas taxas de recuperação espermática são inevitáveis, atingindo cerca de 25% de espermatozoides presentes no sobrenadante, além disso o pellet é constituído de um número significativo de espermatozoides mortos e com defeitos morfológicos (LOOMIS, 2006).

Em bubalinos, Ahmad et al. (1996) relataram sobrevivência espermática mais prolongada quando as amostras foram submetidas à remoção de plasma seminal por centrifugação, em comparação àquelas com o plasma seminal presente. Por outro lado, nos resultados de Avenell (1982) não foi demonstrada melhoria na motilidade após a descongelação, utilizando a retirada de plasma seminal por centrifugação em búfalos.

Um dos poucos estudos que avaliaram o efeito da remoção de plasma seminal por centrifugação sobre a taxa de prenhez em búfalas, Ahmad et al. (2000) concluíram que a técnica permitiu resultados superiores nas taxas de concepção (69.3%) em comparação com o grupo controle com plasma seminal (53.8%; $p < 0,05$). Ainda neste estudo, um outro grupo foi criado para determinar os efeitos da centrifugação sobre a qualidade do sêmen. As amostras do grupo eram centrifugadas e o plasma seminal não era descartado, os autores observaram que a taxa de concepção foi reduzida drasticamente (38.2%) em relação aos outros grupos. Segundo os autores, isto foi decorrente do efeito tóxico provocado pelas enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartatoaminotransferase (AST), substâncias que já foram relacionadas como causa de efeitos adversos nos espermatozoides, influenciando negativamente a fertilidade e a taxa de sobrevivência espermática (DHAMI, SHANI, 1993).

Já no estudo de Goyal et al. (1996), ao promover a retirada do plasma seminal de bubalinos por meio de centrifugação (800× g por 10 minutos), observou-se que a

centrifugação não promoveu melhoria no sêmen e os resultados foram semelhantes ao grupo controle.

Em caprinos, a centrifugação (600× g por 10 minutos) ocasionou redução significativa da motilidade e vigor espermático, patologias do acrossoma e defeitos de cauda (VIANA et al., 2006). Todavia, em ovinos, a técnica não resultou em efeitos deletérios sobre a qualidade dos espermatozoides após a criopreservação (AHMED et al., 2016).

Já em suínos, a retirada do plasma seminal por centrifugação (800× g por 10 minutos) possibilitou aos espermatozoides redução significativa da motilidade, do percentual de acrossoma íntegro após o teste de termo resistência (TTR) e percentual de membrana plasmática íntegra após a descongelação (OHATA et al., 2001).

Campanholi (2016) centrifugou o sêmen de touros bovinos e não observou diferença na maioria das características de cinética espermática analisadas no CASA. Além disso, a técnica provocou alto percentual de células com a membrana plasmática e acrossoma lesados (38,46%) em relação ao grupo controle (30,61%; $p < 0,0001$), porém não foi eficiente nas taxas de desenvolvimento da produção *in vitro* de embriões.

Em equinos, outra técnica está sendo realizada e consiste na utilização da centrifugação com fluido cushion, o qual permite por meio de suas propriedades físicas, elevar a taxa de sobrevivência dos espermatozoides permitindo melhor proteção contra o choque mecânico produzido pela centrifugação (BLISS et al., 2012).

Waite et al. (2008) relataram que o método foi útil, pois a colheita do sêmen foi maximizada, recuperando maior número de células, mantendo a qualidade espermática pós-centrifugação. Roach et al. (2016) utilizaram a centrifugação com cushion em garanhões e notaram que a técnica possibilitou valores superiores de velocidade progressiva, maior taxa de recuperação e menor descarte de fluidos.

Apesar destes relatos, outros estudos são indicativos de que a centrifugação provoca perdas irreversíveis aos espermatozoides devido ao choque mecânico, tanto na estrutura quanto na funcionalidade, influenciando nas taxas de fecundação (KNOP et al., 2005; SIEME et al., 2006).

1.2.6 Remoção de plasma seminal por filtração

Outra alternativa de separação do plasma seminal é a filtração com o uso do dispositivo SpermFilter® (BotuPharma, Botucatu, São Paulo, Brasil). Este dispositivo caracteriza-se por um filtro de membrana hidrofílica sintética com diâmetro de 12 cm e poros medindo 2 μ m, os quais retêm os espermatozoides, e possibilita a passagem do plasma seminal e possíveis bactérias presentes no ejaculado. O filtro elimina a necessidade do uso de centrífuga, tornando o processo menos lesivo aos espermatozoides quando comparado com a centrifugação (ALVARENGA et al., 2012).

O dispositivo é composto por um anel de plástico e pode receber até 50 mL de sêmen em seu interior para realização da filtração. O sêmen diluído é depositado na membrana do filtro; em seguida movimentos rotacionais suaves são realizados a fim de separar o plasma seminal do ejaculado por meio de uma placa de petri medindo em torno de 15 cm. O atrito entre a placa de petri e os poros da membrana permitem a passagem de 90 a 95% do plasma seminal, enquanto os espermatozoides retidos são ressuspensos com diluidor na concentração espermática pretendida. Dependendo do volume a ser filtrado, esse processo de filtração dura em torno de cinco minutos (RAMIRES NETO et al., 2013b).

Alvarenga et al. (2010) mostraram pela primeira vez a eficácia do filtro e relataram que não houve nenhum comprometimento da motilidade e viabilidade espermática em garanhões de boa congelabilidade, mostrando que a técnica é útil, especialmente em animais com pobre qualidade seminal.

Sancler-Silva et al., (2012) concluíram que a utilização do SpermFilter® associado com a administração de antibióticos em diluidores de sêmen controla o crescimento bacteriano, reduzindo o risco de induzir endometrites em éguas. Outros resultados recentes foram descritos por Ramires Neto et al. (2013b), os quais obtiveram através do dispositivo, resultados de motilidade progressiva e integridade de membrana plasmática pós-descongelação semelhantes ao do plasma submetido à centrifugação, ainda com discreta vantagem devido à menor taxa de perda de espermatozoides.

Em outra pesquisa, Ramires Neto et al. (2013) perceberam que o plasma seminal exerce efeito deletério aos espermatozoides provenientes de garanhões com

má congelabilidade e sensíveis ao processo de refrigeração, portanto, a retirada desse composto melhorou a qualidade e viabilidade do sêmen desses animais.

Roach et al. (2016) submeteram o sêmen de garanhões à remoção de plasma com SpermFilter® e verificaram que a filtração não proporcionou aumento na motilidade total e motilidade progressiva, sendo semelhante ao grupo controle com plasma seminal, além disso o percentual de células morfolologicamente normais e a taxa de recuperação não diferiram em comparação aos outros grupos.

CAMPANHOLI et al., (2013) em estudo conduzido em bovinos, não encontraram diferenças entre os métodos de centrifugação e filtração. Porém, em relação ao sêmen do grupo controle (com plasma seminal) relataram menor comprometimento das variáveis espermáticas.

Em outro estudo, Campanholi (2016) utilizaram o SpermFilter® para remoção de plasma seminal em bovinos. Os resultados do grupo filtração foram superiores ao grupo controle em relação às características de cinética espermática (VAP, VSL, BCF, STR e LIN) avaliados no CASA, porém a filtração conferiu aumento no percentual de células com a membrana plasmática e acrossoma lesados (39,34%) em comparação com o controle (30,61%), além de proporcionar maior redução da população com membranas integras (18,04%) em comparação ao grupo com plasma seminal (23,88%; $p < 0,0001$). Por outro lado, a filtração possibilitou menor produção de espécies reativas ao oxigênio (EROs) e na análise do potencial de fertilidade revelou-se uma alternativa eficiente na produção *in vitro* de embriões.

Em búfalos, nenhum estudo foi descrito até o momento utilizando o dispositivo de filtração, porém já foram realizadas técnicas de remoção de plasma seminal por meio da filtração com gel Sephadex. Goyal et al. (1996) observaram aumento na qualidade do sêmen bubalino, elevando a taxa de sobrevivência dos espermatozoides, além da motilidade progressiva e do número de espermatozoides com o acrossoma intacto.

Outro estudo semelhante foi descrito por Ahmad et al. (2003), que por sua vez utilizaram além da filtração com gel Sephadex, troca iônica na tentativa de descontaminar e purificar ainda mais o processo, e obtiveram bons resultados em relação ao grupo controle, sendo que a motilidade, a porcentagem de acrossoma normal e a integridade de membrana plasmática foi maior nos grupos filtrados, assim

como as anormalidades da cabeça, peça intermediária e cauda foram mais presentes no grupo não filtrado.

1.2.7 Espécies reativas ao oxigênio (EROs) e seus impactos sobre a qualidade do sêmen

São formadas como subprodutos durante as reações enzimáticas de sinalização intra e extracelular. Consideradas como radicais livres, visto que apresentam desemparelhamento de elétrons na sua última camada, as EROs incluem todos os radicais derivados do oxigênio presentes em todos os sistemas biológicos. As que recebem maior importância são o radical ânion superóxido (O_2^-), a hidroxila ($OH^\cdot$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o óxido nítrico ($NO^\cdot$; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

O radical ânion superóxido (O_2^-) é formado pela adição de um elétron a partir da molécula de oxigênio, caracterizado por não apresentar alta reatividade uma vez que não é capaz de penetrar em membranas lipídicas. Considerado um produto primário de formação de EROs, o O_2^- é responsável pela produção de H_2O_2 após uma reação de dismutase (NORDBERG; ARNER, 2001).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) embora não seja considerado um radical livre merece destaque, pois é capaz de penetrar as membranas biológicas, sendo altamente prejudicial visto que apresenta longa ação, alterando as concentrações intracelulares de ATP, influenciando na queda de motilidade espermática (ARMSTRONG et al., 1999).

O radical hidroxila ($OH^\cdot$) é formado a partir de uma reação catalisadora entre os íons metais Fe^{2+} e Cu^+ , caracterizado por apresentar alta reatividade, tornando-se grande responsável pelos danos causados aos sistemas biológicos (HALLIWELL, 1991).

Já o ânion óxido nítrico ($NO^\cdot$) não é considerado prejudicial, já que não reage com a maioria das moléculas biológicas. Porém, caso seja produzido em larga escala associado com o ânion superóxido, ocorre a formação do peroxidonitrito ($OONO^\cdot$), molécula altamente citotóxica (NORDBERG; ARNER, 2001).

O desequilíbrio na proporção entre esses radicais livres e antioxidantes resulta no estresse oxidativo provocado durante a criopreservação de sêmen, que por sua vez é um dos fatores que contribuem significativamente para a redução da fertilidade. Este desbalanço altera a fisiologia do espermatozoide, podendo gerar danos espermáticos irreversíveis, deformidades estruturais e infertilidade (BANSAL; BILASPURI, 2011).

Altas concentrações de EROs são prejudiciais às células espermáticas pois ocasionam diversos danos tais como fosforilação axonemal insuficiente, peroxidação lipídica, além da redução de motilidade e da viabilidade espermática. Entretanto, algumas evidências já foram comprovadas que baixas e controladas concentrações de EROs podem ser benéficas ao espermatozoide, uma vez que essas estruturas exercem papel fundamental durante os processos fisiológicos de capacitação, reação acrossomal e fertilização, influenciando positivamente na capacidade fertilizante (BANSAL; BILASPURI, 2011).

Kumar et al. (2011) detectaram no sêmen de búfalos diminuição de motilidade, viabilidade e integridade de membrana plasmática associadas a produção de EROs, além disso verificaram redução na quantidade de antioxidantes totais e perda considerável da integridade do DNA, ressaltando que danos ao DNA estão altamente associados ao estresse oxidativo provocado durante a criopreservação.

As células espermáticas são altamente sensíveis aos danos provocados pelas EROs, uma vez que as concentrações elevadas de ácidos graxos poli-insaturados presentes na membrana plasmática e a baixa quantidade de antioxidantes naturais são fatores que contribuem para menor proteção contra a peroxidação lipídica (SANSONE et al., 2000; ANDRABI et al., 2009).

A peroxidação lipídica que ocorre nos AGPI por conta da excessiva produção de EROs causa diminuição da fluidez e aumento da rigidez da membrana plasmática, gerando produtos de degradação decorrentes deste processo, a exemplo do malondialdeído (MDA). Estes metabólitos são responsáveis pela inibição de várias enzimas, diminuição de motilidade e viabilidade espermática, incluindo a função mitocondrial (OLIVEIRA, 2003).

Os espermatozoides mortos e com morfologia alterada são fontes de produção de EROs por meio de uma reação catalisadora do aminoácido oxidase

(SARIOZKAN et al., 2009), assim como leucócitos, mais especificamente macrófagos e neutrófilos, que tem sido associados com a produção excessiva de EROs (SALEH et al., 2002). Segundo Rhemrev et al. (2001), a formação de EROs pelos espermatozoides mortos e anormais morfologicamente é decorrente da inativação dos sistemas antioxidantes das células.

Outro aspecto relacionado à produção excessiva de EROs por espermatozoide morfologicamente anormais está atrelada aos defeitos de gota citoplasmática (AITKEN, WST, BUCKINGHAM, 1994). Nichi et al. (2007) verificaram que espermatozoides provenientes do epidídimo, os quais apresentavam gota citoplasmática proximal possuíam maior susceptibilidade ao estresse oxidativo quando comparados com os espermatozoides com gota citoplasmática distal (característica física considerada normal em células do epidídimo).

1.3 Hipóteses

1. A remoção de plasma seminal melhora as características de movimento espermático.
2. Os métodos de centrifugação e filtração conferem menores índices de lesões na membrana plasmática e no acrossoma, além de influenciar positivamente o potencial de membrana mitocondrial.
3. A filtração é menos lesiva aos espermatozoides de búfalos do que a centrifugação, reduz a geração de espécies reativas ao oxigênio, causa menos estresse oxidativo às células espermáticas e diminui o grau de peroxidação lipídica no sêmen de bubalino criopreservado.

1.4. Objetivos

1.4.1 Objetivo geral

Objetiva-se com o presente trabalho comparar a eficácia de duas técnicas de remoção do plasma seminal (centrifugação e filtração) frente à criopreservação convencional (com plasma seminal), sobre as características funcionais e de cinética dos espermatozoides de búfalos.

1.4.2 Objetivos específicos

- Verificar se a remoção do plasma seminal provoca menos danos aos espermatozoides e melhora a qualidade do sêmen de búfalos.
- Comparar os métodos de remoção do plasma seminal por filtração e centrifugação sobre:
 - As características de cinética espermática após a descongelamento por análise computadorizada (CASA); a integridade da membrana plasmática e acrossomal; potencial de membrana mitocondrial; produção de EROs por citometria de fluxo; e sobre o grau de peroxidação lipídica pela técnica de TBARS após a descongelamento do sêmen.

Referências

- ABAD, M; SPRECHER, D. J.; ROSS, P; FRIENDSHIP, R. M.; KIRKWOOD, R. N. Effect of sperm cryopreservation and supplementing semen doses with seminal plasma on the establishment of a sperm reservoir in gilts. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, p. 149-152, 2006.
- AGCA, Y.; CRISTER, J. K. Cryopreservation of spermatozoa in assisted reproduction. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 20, n. 1, p. 15–23, 2002.
- AHMAD, M; KHAN, A; SHAH, Z. A.; AHMAD, K. M. Effects of removal of seminal plasma on the survival rate of buffalo bull spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 41, p.193-199, 1996.
- AHMAD, M. K. M.; AHMAD, S. R.; SHAH, Z. A. Washing of Buffalo bull semen affects conception rate under field conditions. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 20, n. 4, p. 180–182, 2000.
- AHMAD, Z; ANZAR, M; SHAHAB, M; AHMAD, N; ANDRABI, S. M. H. Sephadex and sephadex ion-exchange filtration improves the quality and freezability of low-grade buffalo semen ejaculates. **Theriogenology**, v. 59, p. 1189–1202, 2003.
- AHMAD, N.; UMAIR, S.; SHAHAB, M.; ARSLAN, M. Testicular development and establishment of spermatogenesis in Nili-Ravi buffalo bulls. **Theriogenology**, v. 73, n. 1, p. 20–25, 2010.
- AHMED, T.; ISLAM, R.; LONE, F. A.; MALIK, A. A. Effect of washing on the post-thaw quality of cryopreserved ram epididymal spermatozoa. **Veterinary World**, v. 9, n. 5, p. 519–523, 2016.
- AITKEN, R. J.; WST, K; BUCKINGHAM, D. Leukocytic infiltration into the human ejaculate and its association with semen quality, oxidative stress and sperm function. **Journal of Andrology**, v. 15, p. 343-352, 1994.
- AITKEN, R. J.; BAKER, M. Oxidative stress and male reproductive biology. **Reproduction, Fertility and Development**, v.16, p. 581-588, 2004.

ALVARENGA, M. A.; MELO, C. M.; MAGALHÃES, L. C. O.; PAPA, F. O. A new method to concentrate equine sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 121, p. 186–187, 2010.

ALVARENGA, M. A.; PAPA, F. O.; CARMO, M. T.; IEVITSBOSCH, T. K.; CHAVES, M. M. B. C.; RAMIRES NETO, C. Methods of Concentrating Stallion Semen. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 32, p. 424-429, 2012.

AMIRAT, L.; TAINURIER, D.; JEANNEAU, L.; THORIN, C.; GERARD, O.; COURTENS, L. J.; ANTON, M. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with OptidylÒ, a commercial egg yolk extender. **Theriogenology**, v. 61, p. 895–907, 2004.

ANDRABI, S. M. H. Factors Affecting the Quality of Cryopreserved Buffalo (*Bubalus bubalis*) Bull Spermatozoa. **Reproduction Domestic Animals**, v. 44, p. 552–569, 2009.

ANDRABI, S. M. H.; AHMAD, N.; ABBAS, A.; ANZAR, M. Effect of two different antibiotic combinations on fertility of frozen buffalo and Sahiwal bull semen. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 21, p. 166–169, 2001.

ANDRABI, S. M. H.; ANSARI, M.S.; ULLAH, N.; ANWAR, M.; MEHMOOD, A.; AKHTER, S. Duck egg yolk in extender improves the freezability of buffalo bull spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 104, p.427–433, 2008.

ANDRADE, A. F. C.; ZAFFALON, F. G.; CELEGHINI, E. C. C.; NASCIMENTO, J; TARRAGÓ, O. F. B.; MARTINS, S. M. M. K.; ALONSO, M. A.; ARRUDA, R. P. Addition of Seminal Plasma to Post-thawing Equine Semen: What is the Effect on Sperm Cell Viability? **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, p. 682–686, 2011.

ANSARI, M. S.; RAKHAB, B. A.; ANDRABI, S. M. H.; ULLAHB, N.; IQBAL, R.; HOLT, W. V.; AKHTER, S. Glutathione-supplemented tris-citric acid extender improves the post-thaw quality and in vivo fertility of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. **Theriogenology**, v. 79, p. 1120–1123, 2012.

ANZAR, M; RASUL, Z; AHMED, T. A.; AHMAD, N. Response of buffalo spermatozoa to low temperatures during cryopreservation. **Reproduction Fertility and Development**, v. 22, p. 871–880, 2010.

ARANGASAMY, A; SINGH, L. P.; AHMED, N; ANSARI, M. R.; RAM, G. C. Isolation and characterization of heparin and gelatina binding buffalo seminal plasma proteins and their effect on cauda epididymal spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.90, p.243–254, 2005.

ARMSTRONG, J. S.; RAJASEKARAN, M; CHAMULITRAT, W; GATTI, P; HELLSTROM, W. J.; SIKKS, S. C. Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. **Free Radicals Biology & Medicine**, v. 26, p. 869-880, 1999.

ASADPOUR, R; ALAVI-SHOUSHTARI, S. M.; REZAI, S. A.; ANSAR, M. H. K. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of buffalo bulls seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. **Animal Reproduction Science**, v. 102, p. 308–313, 2007.

AVENELL, J. A. Freezing of swamp buffalo semen. **Animal Reproduction Science**, v.5, p.141—145, 1982.

BANSAL, A. K.; BILASPURI, G. S. Impacts of Oxidative Stress and Antioxidants on Semen Functions. **Veterinary Medicine International**, v. 2011, p. 1–7, 2011.

BELLIN, M. E.; OYARZO, J. N.; HAWKINS, H. E.; ZHANG, H.; SMITH, R. G.; FORREST, D. W.; SPROTT, L. R.; AX, R. L. Fertility-associated antigen on bull sperm indicates fertility potential. **Journal Animal Science**, v. 76, p. 2032-2039, 1998.

BERGERON, A; CRÊTE, M. H.; BRINDLE, Y; MANJUNATH, P. Low density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. **Biology Reproduction**, v. 70, p. 708–717, 2004.

BLESBOIS, E. Current status in avian semen cryopreservation. **World's Poultry Science Journal**, v. 63, p. 213–222, 2007.

BLISS, S. B.; VOGEL, J. L.; HAYDEN, S. S.; TEAGUE, S. R.; BRINSKO, S. P.; LOVE, C. C.; BLANCHARD, T. L.; VARNER, D. D. The impact of cushioned centrifugation protocols on semen quality of stallions. **Theriogenology**, v. 77, p. 1232–1239, 2012.

CAMPANHOLI, S. P. **Efeito da centrifugação e filtragem do sêmen bovino sobre a criopreservação espermática**. 2016. 78f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2016.

CAMPANHOLI, S. P.; MONTEIRO, F. M.; MERCADANTE, M. E. Z.; RIBEIRO, E. G. Efeito da remoção de plasma seminal na criopreservação de sêmen de touros *bos indicus* coletados por eletroejaculador utilizando diferentes métodos de separação. In: VII CONGRESSO INTERINSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2013, Campinas. **Resumos...**Campinas: CIIC, 2013.

CHESHMEDJIEVA, S. B.; DIMOV, V. N. Effect of freezing on phospholipid distribution of buffalo spermatozoa plasma membranes. In: VALE, W.G; BARNABE, V.H; MATTOS, J.C.A. Proceedings of 4th World Buffalo Congress, Sao Paulo, Brasil. International Buffalo Federation, Roma, Italy, p. 519–521, 1994.

CORMIER, N; SIRARD, M. A.; BAILEY, J. L. Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. **Journal of Andrology**, v. 18, p. 461-468, 1997.

DELLA'AQUA JR, J. A.; PAPA, F. O.; ALVARENGA, M. A.; ZAHN, F. S. Effect of centrifugation and packing system on sperm parameters of equine frozen semen. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 324–5, 2001.

DHAMI, A. J.; SHANI, K. Z. Effects of extenders, additives and deep freezing on leakage of transaminases from Murrah buffalo spermatozoa. **Buffalo Journal**, v. 9, p. 55–64, 1993.

ECOT, P.; DECUADRO-HANSEN, G.; DELHOMME, G.; VIDAMENT, M. Evaluation of a cushioned centrifugation technique for processing equine semen for freezing. **Animal Reproduction Science**, v. 89, p. 245-248, 2005.

EGHBALI, M; ALAVI-SHOUSHTARI, S. M.; ASRI-REZAEI, S; ANSARI, M. H. K. Calcium, Magnesium and Total Antioxidant Capacity (TAC) in Seminal Plasma of Water Buffalo (*Bubalus bubalis*) Bulls and their Relationships with Semen Characteristics. **Veterinary Research Forum**, v. 1, p. 12-20, 2010.

EGHBALI, M.; ALAVI-SHOUSHTARI, S. M.; ASRI-REZAEI, S.; ANSARI, M. H. K. Effects of the seminal plasma zinc content and catalase activity on the semen quality of water buffalo (*Bubalus bubalis*) bulls. **Veterinary Research Forum**, v. 1, n. 3, p. 142–148, 2010b.

EL-SISY, G. A.; EL-NATTAT, W. S.; EL-SHESHTAWY, R. I. Buffalo semen quality, antioxidants and peroxidation during chilling and cryopreservation. **Journal of Veterinary Research**, v. 11, p. 55–61, 2007.

FAHY, G. M. Analysis of “solution effects” injury. Equations for calculating phase diagram information of the ternary system NaCl-dimethylsulfoxide-water and NaCl-glycerol-water. **Biophysical Journal**, v. 32, p. 837-850, 1980.

FISHER, H.; BODHIPAKSHA, P. Reproduction in swampbuffaloes. In: Tulloh, NM (Ed.). **Buffalo production**. Amsterdam, Netherlands: Elsevier Science Publishers, p.153-169, 1992.

GARCIA, A. R.; GONÇALVES, K. S.; NAHÚM, B. S.; MATOS, L. B.; BARBOSA, D. L. M.; SIMÕES, A. R.; MONTEIRO, P. J. C. Eficiência da detecção de estros em fêmeas bubalinas (*Bubalus bubalis*) criadas na Amazônia. In: Congresso Estadual de Medicina Veterinária, 2006, Gramado. **Anais...** Gramado: SOVERGS, 2006, p. 3051-3056.

GARCIA, O.; VALE, W. G.; GARCIA, A. R.; RIBEIRO, H. F. L.; FERRO, R.; ROLIM FILHO, S. T.; SOUSA, E. M. Experimental study of testicular insulation In: BUFFALO. CONGRESS WORD BUFFALOES, Argentina. **Revista Veterinaria**, v. 21, 2010, p. 889-891. Sup. 1.

GARNER, D. L.; THOMAS, C. A.; GRAVANCE, C. G.; MARSHALLB, C. E.; DEJARNETTE, J. M.; ALLENC, C. H. Seminal plasma addition attenuates the dilution effect in bovine sperm. **Theriogenology**, v.56, p.31-40, 2001.

GOYAL, R. L.; TULI, R. K.; GEORGIE, G. C.; CHAND, D. Comparison of quality a kid freezability of water buffalo semen after washing or sephadex filtration. **Theriogenology**, v. 16, p. 679 -686, 1996.

GREEN, C. E.; WATSON, P. F. Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. **Reproduction**, v. 22, p. 889-898, 2001.

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

HAFEZ, E. S. E; JAINUDEEN, M. R; ROSINHA, Y. Hormônios, fatores de crescimento e reprodução. In: HAFEZ, E. S. E; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**, 7. ed. Barueri, SP: Manole, 2004. 513p.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. **American Journal of Medicine**, v. 91, p. 14-22, 1991.

HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 3 Ed. New York: Oxford University Press, 1999. 936 p.

HARSHAN, H. M.; SANKAR, S; SINGH, L. P.; SINGH, M. K.; SUDHARANI, S; ANSARI, M. R.; SINGH, S. K.; MAJUMDAR, A. C.; JOSHI, P. Identification of PDC-109-like protein(s) in buffalo seminal plasma. **Animal Reproduction Science**, v. 115, p. 306–311, 2009.

HARSHAN, H. M.; SINGH, L. P.; ARANGASAMY, A; ANSARI, M. R.; KUMAR, S. Effect of buffalo seminal plasma heparin binding protein (HBP) on freezability and in vitro fertility of buffalo cauda spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 93, p. 124–133, 2006.

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

IBRAHIM, S. S.; RAKHA, A. M.; EL-CHAHIDI, A. A.; EL-AZAB, A. L. Preservation of buffalo semen. 2. The role of seminal plasma. **Egyptian Journal Veterinary Science**, v. 18, p. 67-76, 1981.

IWAMOTO, T.; GAGNON, C. Purification and characterization of a sperm motility inhibitor in human seminal plasma. **Journal of Andrology**, v. 9, p. 377-383, 1988.

JANUSKAUSKAS, A; JOHANNISSON, A; MARTINEZ, R. H. Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. **Theriogenology**, v. 60, p. 743-758, 2003.

JASKO, D. J.; MATIN, J. M.; SQUIRES, E. L. Effect of insemination volume and concentration of spermatozoa on embryo recovery in mares. **Theriogenology**, v. 37, p. 1233- 1239, 1992.

JOBIM, M. I.; OBERST, E. R.; SALBEGO, C. G.; SOUZA, D. O.; WALD, V. B.; TRAMONTINA, F.; MATTOS, R. C. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. **Theriogenology**, v. 61, p. 255-266, 2004.

KADIRVEL, G; KUMAR, S; KUMARESAN, A; KATHIRAVAN, P. Capacitation status of fresh and frozen-thawed buffalo spermatozoa in relation to cholesterol level, membrane fluidity and intracellular calcium. **Animal Reproduction Science**, v. 116, p. 244–253, 2009.

KADIRVEL, G; PERIASAMY, S; KUMAR, S. Effect of Cryopreservation on Apoptotic-like Events and its Relationship with Cryocapacitation of Buffalo (*Bubalus bubalis*) Sperm. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, p. 143–150, 2012.

KARESKOSKI, M; KATILA, T. Components of stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity. **Animal Reproduction Science**, v. 107, p. 249-56, 2008.

KATSKA, L.; RYNSKA, B.; SMORAG, Z. Effect of seminal plasma on the in vitro fertilizability of bull spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 44, p. 23-31, 1996.

KAUL, G; SHARMA, G. S.; SINGH, B; GANDI, K. K. Capacitation and acrosome reaction in buffalo spermatozoa assessed by chlortetracycline and *Pisum sativum* agglutinin fluorescence assay. **Theriogenology**, v. 55, p. 1457–1468, 2001.

KHAN, D. R.; AHMAD, N; ANZAR, M; CHANNA, A. A. Apoptosis in fresh and cryopreserved sperm. **Theriogenology**, v. 71, p. 872–876, 2009.

KIANI, F. A.; YOUSAF, A.; ZAFAR, M. A.; NAWAZ, M. Effect of age on Physical Characteristics of Kundhi Buffalo Bull Semen. **Int J Curr Microbiol App Sci**, v. 3, n. 11, p. 445–453, 2014.

KILLIAN, G. J.; CHAPMAN, D. A.; ROGOWSKI, L. A. Fertility-associated proteins in Holstein bulls seminal plasma. **Biology of Reproduction**, v. 49, p. 1202-1207, 1993.

KNOP, K; HOFFMANN, N; RATH, D; SIEME, H. Effects of cushioned centrifugation technique on sperm recovery and sperm quality in stallions with good and poor freezability. **Animal Reproduction Science**, v. 89, p. 294-297, 2005.

KOMMISRUDE, E.; GRAFFER, T.; STEINE, T. Comparison of two processing systems for bull semen with regard to post thaw motility and nonreturn rates. **Theriogenology**, v. 45, n. 8, p. 1515-1521, 1996.

KULKARNI, B. A.; FERNANDES, J. E.; DHANDE, S. G.; HEDGE, U. C. Characterization of seminal plasma proteins of the Indian buffalo and cattle bulls by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. **Buffalo Journal**, v. 2, p. 147–156, 1996.

KUMAR, R.; JAGAN-MOHANARAO, G.; ARVIND; ATREJA, S. K. Freeze–thaw induced genotoxicity in buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa in relation to total antioxidant status. **Molecular Biology and Reports**, v. 38, p. 1499–506, 2011.

KUMAR, A.; SINGH, L. P.; HARSHAN, H. M.; MAJUMDAR, A. C. Seminal plasma non-heparin binding proteins (NHBP) reduce the cryoinjury to buffalo cauda epididymal spermatozoa induced by heparin binding proteins (HBP). **Animal Reproduction Science**, v. 104, p. 220–226, 2008.

KUMAR, P.; SAINI, M.; KUMAR, D.; JAN, M. H.; SWAMI, D. S.; SHARMA, R. K. Quantification of leptin in seminal plasma of buffalo bulls and its correlation with antioxidant status, conventional and computer-assisted sperm analysis (CASA) semen variables. **Animal Reproduction Science**, v. 166, p. 122–127, 2016.

KUMARESAN, A.; ANSARI, M. R.; ABHISHEK, G. Modulation of post-thaw sperm functions with oviductal proteins in buffaloes. **Animal Reproduction Science**, v. 90, p. 73–84, 2005.

KUMARESAN, A.; ANSARI, M. R.; GARG, A.; KATARIA, M. Effect of oviductal proteins on sperm functions and lipid peroxidation levels during cryopreservation in buffaloes. **Animal Reproduction Science**, v. 93, p. 246–257, 2006.

LOOMIS, P. R. Advanced methods for handling and preparation of stallion semen. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 22, p. 663-676, 2006.

MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos>>. Acesso em: 23 jan. 2014.

MARTINUS, R. D.; MOLAN, P. C.; SHANNON, P. Deleterious effect of seminal plasma in the cryopreservation of bovine spermatozoa. **New Zealand Journal Agricultural Research**, v. 34, p. 281-285, 1991.

MAXWELL, W. M.; JOHNSON, L. A. Chlortetracycline analysis of boar spermatozoa after incubation, flow cytometry sorting, cooling, or cryopreservation. **Molecular Reproduction and Development**, v. 11, p. 123-126, 1997.

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

MILLER, D. J.; WINER, M. A.; AX, R. L. Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. **Biology of Reproduction**, v. 42, p. 899-915, 1990.

MOORE, A. I.; SQUIRES, E. L.; GRAHAM, J. K. Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 63, p. 2372-2381, 2005.

MORRELL, J. M.; PIHL, J.; DALIN, A. M.; JOHANNISSON, A. Restoration of seminal plasma to stallion spermatozoa selected by colloid centrifugation increases sperm progressive motility but is detrimental to chromatin integrity. **Theriogenology**, v. 78, n. 2, p. 345–352, 2012.

MORRELL, J. M.; GEORGAKAS, A.; LUNDEHEIM, N.; NASH, D.; DAVIES MOREL, M. C. G.; JOHANNISSON, A. Effect of heterologous and homologous seminal plasma on stallion sperm quality. **Theriogenology**, v. 82 p. 176–183, 2014.

MORRIS, G. J.; CLARKE, A. G. Cells at low temperatures. In: GROUT, B. W. W.; MORRIS, G. J (eds), **The Effects of Low Temperatures on Biological Systems**. London: Edward Arnold, 1987. p. 72–119.

MUER, S. K.; ROY, S. B.; MOHAN, G; DHOBLE, R. L. Cryogenic changes in seminal protein of cattle and buffalo. **Theriogenology**, v. 30, p. 1005–1010, 1988.

NAIR, S. J.; BRAR, A. S.; AHUJA, C. S.; SANGHA, S. P.; CHAUDHARY, K. C. A comparative study on lipid peroxidation, activities of antioxidant enzymes and viability of cattle and buffalo bull spermatozoa during storage at refrigeration temperature. **Animal Reproduction Science**, v. 96, p. 21–29, 2006.

NICHI, M; GOOVAERTS, I. G. F.; CORTADA, C. N. M.; BARNABE, V. H.; DE CLERCQ, J. B. P.; BOLS, P. E. J. Roles of lipid peroxidation and cytoplasmatic droplets on *in vitro* fertilization capacity of sperm collected from bovine epididymides stored at 4 and 34°C. **Theriogenology**, v. 67, p. 334-340, 2007.

NORBERG, J.; ÁRNER, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thiredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, v.31, p.1287-1312, 2001.

NUNES, J. F. 2004. Utilização da água de coco em pó (ACP) em processos biotecnológicos. Disponível em: <<http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visualizacv>>. Acesso em: 22 dez. 2014.

OBA, E.; FUCK, E. J.; BICUDO, S. D.; PAPA, F. O.; OHASHI, O. M. Estudo preliminar de diferentes meios para congelamento de sêmen de búfalo. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, Belo Horizonte. **Anais...**Belo Horizonte: CBRA, 1993, p. 337.

OHASHI, O.M. **Estudos morfofisiológico do testículo de bubalinos mestiços (*Bubalus bubalis*) em diferentes idades**. 1993. 111 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1993.

OHASHI, O. M. Inseminação Artificial em Bubalinos. In: GONÇALVES, P. B.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas Aplicadas a Reprodução Animal**. São Paulo: Varela, 2002. p.103-123.

OHASHI, O. M.; MIRANDA, M. S.; SOUSA, J. S.; SOUSA, A. J. O.; CORDEIRO, M. S.; BIONDI, F. C. Produção *in vitro* de embrião bubalino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, 2003.

OLIVEIRA, G. M. **Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e teste hiposmótico como métodos auxiliares ao exame de motilidade retilínea e progressiva para avaliação de sêmen de touros Nelore PO, antes do congelamento**. 2003. 46 f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2003.

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, F. O.; NEVES NETO, J. R.; LEME, D. P.; FERREIRA, J. C. P. A comparative study between the freezability and fertility of stallion semen using different extenders. In: Annual Conference of Society ForTheriogenology. Baltimore. **Anais...** Baltimore: 1998. p. 149-151.

PARKS, J. E.; ARION, J. A.; FOOTE, R. H. Lipids of plasma membrane and outer acrosomal membrane from bovine spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 37, p. 1249–1258, 1987.

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

PONS-REJRAJI, H.; BAILEY, J. L.; LECLERC, P. Cryopreservation affects bovine sperm intracellular parameters associated with capacitation and acrosome exocytosis. **ReproductionFertilityandDevelopment**, v. 21, n. 4, p. 525- 537, 2009.

RAIZADA, B. C.; SATTAR, A; PANDEY, M. D. A comparative study of freezing buffalo semen in two dilutors. In: ACHARYA, R. M; LOKESHWAR, R. R; KUMAR, A. T. Proceedings of 2nd World Buffalo Congress, New Delhi, India. **Anais...** International Buffalo Federation: Roma, Italy, 1990, p. 66–74.

RAMIRES NETO, C; MONTEIRO, G. A.; SOARES, R. F.; PEDRAZZI, C.; DELL'AQUA JR, J. A.; PAPA, F. O.; ALVARENGA, M. A. Effect of Removing Seminal Plasma Using a Sperm Filter on the Viability of Refrigerated Stallion Semen. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 33, p. 40-43, 2013.

RAMIRES NETO, C., MONTEIRO, G. A., SOARES, R. F., PEDRAZZI, C., DELL'AQUA JR, J.A.; PAPA, F. O., CHAVES, M. M. C., ALVARENGA, M. A. New seminal plasma removal method for freezing stallion sêmen. **Theriogenology**, v. 79, p. 1120–1123, 2013b.

RASUL, Z; AHMAD, N; ANZAR, M. Changes in motion characteristics, plasma membrane integrity and acrosome morphology during cryopreservation of buffalo spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 22, p. 278-83, 2001.

RESENDE, H. L.; OLIVEIRA, J. P.; ECKER, M. K. C.; GUASTI, P. N.; PAPA, F. O.; JACOB, J. C. F. Criopreservação de sêmen equino previamente refrigerado com e sem plasma seminal por 12 horas. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 35, p. 306-310, 2013.

RHEMREV, J. P. T.; VERMEIDEN, J. P. W.; HAENEN, G. R. M. M.; DE BRUIJNE, J. J.; REKERS-MOMBARG, L. T. M.; BAST, A. Progressively motile human spermatozoa are well protected against *in vitro* peroxidation imposed by induced oxidative stress. **Andrologia**, v. 33, p. 151-158, 2001.

RIJSSELAERE, T.; VAN SOOM, A.; MAES, D.; DE KRUIF, A. Effect of centrifugation on in vivo survival of fresh diluted canine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 57, p. 1669-1681, 2002.

ROACH, J.; SCHNOBRICH, M.; ELLERBROCK, R.; FEIJO, L.; BRADECAMP, E.; ALVARENGA, M. A.; KLINE, K.; CANISSO, I. Comparison of cushioned centrifugation and SpermFilter filtration on longevity and morphology of cooled-stored equine semen. **Veterinary Record**, v. 178, n. 10, p. 1–4, 2016.

SAHNI, K. L. Inhibitory effect of seminal plasma on motility of bovine semen. **Indian Journal Animal Science**, v. 60, p. 786-788, 1990.

SALEH, R. A.; AGARWAL, A.; KANDIRALI, E.; SHARMA, R. K.; THOMAS, A. J.; NADA, E. A.; EVENSON, D. P.; ALVAREZ, J. G. Leukocytospermia is associated with increased reactive oxygen species production by human spermatozoa. **Fertility and Sterility**, v. 78, p. 1215–1224, 2002.

SANCLER-SILVA, Y. F. R.; RAMIRES-NETO, C.; MARTINHO, A. P. V.; MONTEIRO, G. A.; SOARES, R. F.; LISTONI, F. J. P.; DELL'AQUA JR, J. A.; PAES, A. C.; PAPA, F. O.; ALVARENGA, M. A. Effects of seminal plasma removal on bacterial growth in stallion semen. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 32, p. 475-518, 2012.

SANSONE, G.; NASTRI, M. G. F.; FABBROCINI, A. Storage of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.55–76, 2000.

SARIOZKAN, S.; BUCAK, M. N.; TUNCER, P. B.; ULUTAS, P. A.; BILGEN, A. The influence of cysteine and taurine on microscopic-oxidative stress parameters and fertilizing ability of bull semen following cryopreservation. **Cryobiology**, v. 58, p. 134-138, 2009.

SCHEMBRI, M. A.; MAJOR, D. A.; SUTTIE, J. J.; MAXWELL, W. M.; EVANS, G. Capacitation-like changes in equine spermatozoa throughout the cryopreservation process. **Reproduction Fertility Development**, v. 14, p. 225-233, 2002.

SENATORE, E. M.; VERBERCKMOES, S; PASCALE, M; PRESICCE, G. A. A deep utero-tubal semen deposition in Mediterranean Italian buffaloes using a new artificial insemination device. **Reproduction Fertility Development**, v. 16, p. 133, 2004.

SENGUPTA, B. P.; SINGH, I. N.; RAWAL, J. S. A reversible spermiostatic factor present in buffalo seminal plasma. **Current Science**, v. 45, p. 258-260, 1977.

SHARMA, A. K; GUPTA, R. C. Duration of seminiferous epithelial cycle in buffalo bulls (*Bubalus bubalis*). **Animal Reproduction Science**, v. 3, p. 217-224, 1980.

SHIVAJI, S.; BHARGAVA, P. M. Antifertility factors of mammalian seminal fluid. **Bioassays**, v. 7, p. 13-17, 1987.

SHUKLA, M. K.; MISRA, A. K. Effect of Bradykinin on Murrah buffalo (*Bubalus bubalis*) semen cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, v. 97, p. 175–179, 2007.

SIEME, H; KNOP, K; RATH, D. Effects of cushioned centrifugation on sperm quality in stallion semen stored cooled at 5 degrees for 24h, and stored cooled for 2 ou 24h and then frozen. **Animal Reproduction Science**, v. 94, p. 99-103, 2006.

SILVA, A. O. A.; MOTA, A. V.; RIBEIRO, H. F. L.; SOUZA, J. S.; REIS, N. A.; VALE, W. G. Preliminary report on ringer-lactate solution as an alternative diluter for buffalo semen. In: BUFFALO SYMPOSIUM OF AMERICAS, 1, 2002. **Anais...** Belém: PRODEPA – Governo do Estado do Pará, 2002. p.467-470.

SINGH, M; GHOSHA, S. K.; PRASADA, J. K.; KUMARA, A; TRIPATHIA, R. P.; BHUREB, S. K.; SRIVASTAVA, N. Seminal PDC-109 protein vis-à-vis cholesterol content and freezability of buffalo Spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 144, p. 22– 29, 2014.

SQUIRES, E. L.; PICKETT, B. W.; GRAHAM, J. K.; VANDERWALL, D. K.; McCUE, P. M.; BRUEMMER, J. E. Principles of cryopreservation. In: **Cooled and Frozen Stallion Semen**, b. 9, 1999.

STORNELLI, M. C.; TITTARELLI, C. M.; SAVIGNONE, C. A.; STORNELLI, M. A. Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. **Analecta Veterinária**, v. 25, p. 28-35, 2005.

TIBARY, A; GRAHAM, E. F.; ASR, A.; BOUKHLIQ, R.; DEYO, R. Effect of dialysis or centrifugation on post-thaw motility and fertility of Santa Gertrudis bull semen collected by electroejaculation. **Theriogenology**, v. 33, p. 733-739, 1990.

VALE, W. G. Reproductive management of buffalo male aiming semen production for artificial insemination. In: BUFFALO SYMPOSIUM OF AMERICAS, 1, 2002. **Anais...** Belém: PRODEPA - Governo do Estado do Pará, 2002. p.156-171.

VIANA, A. K. S.; CHALHOUB, M.; RIBEIRO FILHO, A. L.; ALMEIDA, A. K.; PORTELA, A. P. M.; BITTENCOURT, R. F.; ALVES, S. G. G.; BITTENCOURT, C. C.; QUINTELA, A. T. Avaliação in vitro do sêmen caprino resfriado com e sem centrifugação do plasma seminal e diluído em leite desnatado-glicose e tris-gema de ovo. **Ciência Animal Brasileira**, v. 7, n. 1, p. 67-76, 2006.

VISHWANATH, R; SHANNON, P. Do sperm cells age? A review of the physiological changes in sperm during storage at ambient temperature. **Reproduction Fertility Development**, v. 9, p. 321-331, 1995.

WAHEED, M. M.; GOUDA, E. M.; KHALIFA, T. A. A. Impact of seminal plasma superoxide dismutase and glutathione peroxidase on cryopreserved buffalo spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 142, n. 3-4, p. 126-130, 2013.

WAITE, J. A.; LOVE, C. C.; BRINSKO, S. P.; TEAGUE, S. R.; SALAZAR JR, J. L.; MANCILL, S. S.; VARNER, D. D. Factors impacting equine sperm recovery rate and quality following cushioned centrifugation. **Theriogenology**, v. 70, p. 704-714, 2008.

WATSON, P. F.; KUNZE, E; CRAMER, P; HAMMERSTEDT, R. H. A comparison of critical osmolality and hydraulic conductivity and its activation energy in fowl and bull spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 13, p. 131-138, 1992.

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

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

WAY, A.L.; GRIEL Jr, L.C.; KILLIAN, G.J. Effects of accessory sex gland fluid on viability, capacitation, and the acrosome reaction of cauda epididymal bull spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 21, p. 213-219, 2000.

ZAHN, F. S.; PAPA, F. O.; MELO, C. M. Blood serum, seminal plasma and sperm membrane protein profiles in stallions: are they correlated to semen freezability? **Animal Reproduction Science**, v. 94, p. 64–66, 2006.

ZORZETTO, M. F. **Avaliação do sêmen de búfalos em três meios de criopreservação**. 2013. 99 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2013.

Artigo elaborado segundo normas da Revista Theriogenology – ISSN 0093-691X

**CAPÍTULO 2 - Comparação entre dois métodos de remoção de plasma seminal
na criopreservação de sêmen de búfalos**

Rodrigo dos Santos Albuquerque¹, Rodrigo de Moraes², Adriana Novaes dos Reis²,
Moysés dos Santos Miranda², Erika Aline Dias Ribeiro³, Fabio Morato Monteiro³,
Claudia Cristina Paro de Paz³, Marcilio Nichi⁴, Camila de Paula Freitas-Della'Aqua⁵,
Frederico Ozanam Papa⁵, Rinaldo Batista Viana⁶, Lindsay Unno Gimenes¹.

¹Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, Faculdade
de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal,
Brasil.

²Central de Biotecnologia e Reprodução Animal, Universidade Federal do Pará,
Castanhal, Brasil.

³Centro APTA Bovinos de Corte, Instituto de Zootecnia, Sertãozinho, Brasil.

⁴Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

⁵Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, Brasil.

⁶Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, Brasil.

Corresponding author: +5591981139295 (R.S. Albuquerque)

E-mail adress: rdsa20@gmail.com and gimeneslu@fcav.unesp.br

20 **Resumo**

21 O objetivo do presente estudo foi averiguar a qualidade do sêmen de búfalos
22 submetidos a dois métodos de remoção de plasma seminal (filtragem e centrifugação).
23 Foram utilizados sete touros da raça Murrah submetidos a colheitas de sêmen uma
24 vez por semana durante oito semanas, totalizando 141 amostras. Cada ejaculado foi
25 dividido em três grupos: C (Controle: presença de plasma seminal), CE
26 (Centrifugação) e F (Filtragem). Foi avaliada a cinética espermática pelo sistema de
27 análise computadorizada de motilidade espermática (CASA); a integridade da
28 membrana plasmática e acrossomal, o potencial da membrana mitocondrial e a
29 estimativa das espécies reativas ao oxigênio (EROs) foram avaliadas pela citometria
30 de fluxo; e a peroxidação lipídica pela técnica de espécies reativas ao ácido
31 tiobarbitúrico (TBARS). Foi observado que a remoção do plasma seminal não
32 melhorou as variáveis de movimentação espermática em relação ao grupo controle. A
33 presença de plasma seminal (grupo C) foi responsável pelo maior grau de injúrias à
34 membrana plasmática ($47,88 \pm 1,99$) quando comparados ao grupo F ($40,45 \pm 2,01$) e
35 CE não diferiu entre os grupos ($41,30 \pm 1,96$; $p < 0,07$). CE resultou em maior número
36 de células com lesões na membrana acrossomal ($0,77 \pm 0,05$) em comparação ao F
37 ($0,28 \pm 0,06$) e C não diferiu entre os grupos ($0,34 \pm 0,06$; $p < 0,03$). A filtragem
38 proporcionou maiores índices de lesões em ambas as membranas plasmática e
39 acrossomal ($22,18 \pm 1,07$; $p < 0,01$). Nenhuma diferença foi observada no potencial de
40 membrana mitocondrial entre os grupos. Entretanto, a produção de EROs foi maior no
41 grupo CE em relação aos grupos C e F, embora não tenham sido detectadas
42 diferenças na análise TBARS. Portanto, a remoção de plasma seminal não promoveu
43 melhoria na qualidade do sêmen descongelado de búfalos em relação ao grupo

controle, tanto na cinética espermática quanto na integridade de membrana, potencial mitocondrial e peroxidação lipídica.

Palavras-chave: Búfalo, sêmen, plasma seminal, centrifugação, SpermFilter.

1. Introdução

Os espermatozoides de búfalos são mais susceptíveis ao processo de criopreservação quando comparados aos de bovinos, interferindo diretamente no potencial de fertilidade [1,2]. Esta constatação é explicada pela diminuição da capacidade dos espermatozoides bubalinos em prevenir danos causados durante a criopreservação devido a presença de fatores bioquímicos específicos [3], tais como: diferença na composição lipídica da membrana plasmática [4] e presença de proteínas constituintes do plasma seminal [5,6].

Embora o plasma seminal de bubalinos contenha diversas substâncias benéficas aos espermatozoides [7], algumas proteínas presentes neste composto são responsáveis pela alteração na permeabilidade da membrana, reduzindo a qualidade espermática após a descongelação [8]. Adicionalmente, já foi demonstrado que os efeitos da presença de fatores inibitórios no plasma seminal são mais acentuados no sêmen de búfalos que de outras espécies [9,10], uma vez que as concentrações de antioxidantes naturais presentes no sêmen dos búfalos são baixas e diminuem ainda mais durante a diluição e o processo de criopreservação [11,12].

A remoção do plasma seminal vem se tornando uma opção a ser estabelecida para tentar melhorar a qualidade do sêmen. Apesar de controversa, esta técnica vem sendo defendida por vários pesquisadores como forma de melhorar as variáveis e a capacidade fertilizante dos espermatozoides de diversas espécies, como em búfalos

[13], bovinos [14,15], ovinos [16] e equinos [17]. Em garanhões, por exemplo, a retirada do plasma seminal é realizada rotineiramente pelo método de centrifugação, devido ao grande volume de plasma seminal característico desses animais, todavia em outras espécies este método tem sido pouco estudado e adotado. Entretanto, alguns pesquisadores relatam efeitos deletérios da centrifugação sobre a qualidade espermática, principalmente sobre a motilidade, devido ao dano provocado pela força mecânica durante a centrifugação [18,19,20,21].

Uma alternativa à centrifugação, é a filtragem do plasma seminal com o uso do dispositivo SpermFilter® (BotuPharma, Botucatu, Brasil), uma vez que por eliminar a necessidade de centrifugação, torna o processo menos lesivo aos espermatozoides [22]. Em equinos, seu uso tem sido reportado com resultados de motilidade total, morfologia espermática e taxa de recuperação de espermatozoides semelhantes à técnica de centrifugação, tornando-se uma opção em laboratórios ou fazendas que não possuam uma centrífuga para realização do procedimento [23].

Todavia, em búfalos, os estudos referentes à viabilidade e funcionalidade espermática quanto à presença ou ausência do plasma seminal nos ejaculados submetidos à criopreservação são escassos, sendo que a técnica de filtragem ainda não foi relatada na espécie, assim como seu efeito sobre os espermatozoides. Portanto, no presente trabalho foi testada a hipótese de que a remoção de plasma seminal por filtragem melhora a qualidade do sêmen criopreservado em búfalos causando menos danos ao espermatozoide que o processo de centrifugação. Para tanto, as técnicas de centrifugação e filtragem foram comparadas em relação ao grupo sem remoção de plasma seminal, sendo avaliadas características funcionais e cinéticas dos espermatozoides.

2. Material e métodos

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, UNESP, Jaboticabal, em 07 de Julho de 2014 sob o protocolo nº 12072/14.

2.1 Colheita e processamento do sêmen in natura

Sete touros bubalinos da raça Murrah foram submetidos à colheita de sêmen por vagina artificial uma vez por semana, com variação de cinco a oito ejaculados por touro. Após a colheita, os ejaculados foram avaliados macro e microscopicamente quanto a: volume, cor, aspecto, concentração espermática, turbilhonamento, motilidade progressiva, vigor e morfologia espermática. As colheitas foram realizadas nos meses de fevereiro a abril de 2015, na Central de Biotecnologia da Reprodução Animal (CEBRAN/UFGA), localizada no município de Castanhal, PA, Brasil (1° 18' 18" S and 47° 56' 36" W). O local apresenta clima tropical úmido com temperatura média em torno de 26°C, precipitação pluviométrica anual entre 2300 e 2800 mm e mensal de 67 a 399 mm [24].

Os ejaculados eram avaliados por análise subjetiva e considerados aptos à criopreservação, quando apresentavam valores de motilidade ($\geq 70\%$), vigor (≥ 3), concentração espermática ($300\text{--}1200 \times 10^6/\text{ml}$), espermatozoides morfologicamente normais ($\geq 70\%$), conforme estabelecido para sêmen de búfalos pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal [25]. A técnica de coloração supravital com eosina-nigrosina foi utilizada para avaliar a integridade de membrana plasmática (IMP) do sêmen fresco, em que 200 células foram analisadas por amostra e os resultados mostrados em porcentagem de células com membrana plasmática intacta [26]. A morfologia

espermática foi avaliada com solução de formol-salina tamponada, sendo contados 200 espermatozoides por amostra e classificados em defeitos maiores (DMA) e menores (DMe), os quais somados corresponderam aos defeitos totais (DT) [27]. As variáveis do sêmen fresco estão na Tabela 1.

Cada ejaculado foi diluído na proporção 1:3 (sêmen:diluidor) com diluidor à base de gema de ovo e glicerol (Botu-Bov®; Botupharma, Botucatu, Brasil), sendo divididos em três grupos: C (Controle - com plasma seminal presente), e outros dois grupos sem plasma seminal, CE (Centrifugação) e F (Filtragem). Para as amostras do grupo C, o sêmen foi diluído de modo convencional para a concentração de 30×10^6 espermatozoides/dose com diluidor Botu-Bov®. Para as amostras do grupo CE, o sêmen foi colocado em tubos Falcon de 15 ml e centrifugados (Damon-Iec HN-SII LabCentrifuge) a $600 \times g$ por 10 minutos em temperatura ambiente [28]. Para retirada do plasma seminal, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspendido com Botu-Bov® na mesma concentração do grupo C. Para as amostras do grupo F, o sêmen foi filtrado utilizando o SpermFilter® e o diluidor Botu-Bov®. Em seguida, o sêmen foi adicionado à membrana do filtro e movimentos rotacionais suaves foram realizados sobre uma placa de petri. Os espermatozoides retidos no filtro foram ressuspendidos com Botu-Bov® na mesma concentração do grupo C [29].

2.2 Criopreservação do sêmen

O sêmen dos três grupos foi envasado em palhetas estéreis de 0,25 ml. Em seguida, sob temperatura ambiente as palhetas eram colocadas em um refrigerador (MiniTub®) com temperatura controlada a 4 °C durante 4 horas, apresentando curva de resfriamento de 3 °C/min até a estabilização a 4°C. Após este período, as palhetas

foram distribuídas em grades teladas e dispostas numa caixa isotérmica com 2,5 cm de nitrogênio líquido, mantidas a 3,5 cm acima do vapor de nitrogênio líquido por 20 minutos, sendo a curva de congelação $-20\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até as palhetas atingirem -153°C [30]. Posteriormente, as palhetas foram imersas diretamente no nitrogênio líquido, colocadas em racks, identificadas e então conservadas em container criogênico a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento da realização das análises pós-descongelção.

Para a realização das análises seguintes, as amostras foram descongeladas da mesma forma para os três grupos em banho-maria a 37°C por 30 segundos, utilizando *pool* de duas palhetas para a execução das análises.

2.3 Análise computadorizada da motilidade espermática

As amostras foram avaliadas pelo sistema de análise computadorizada da motilidade espermática (CASA), utilizando o aparelho Hamilton Thorne (Versão 14, Hamilton Thorne Biosciences, Beverly, EUA). Para tanto, 10 μl de sêmen de cada grupo foram colocados na câmara de leitura de Makler (Makler Counting Chamber®, Sefi-Medical Instruments Ltd., Haifa, Israel), previamente aquecida à 38°C . As análises do movimento espermático foram realizadas pelo programa Animal Motility, sendo feita a escolha automática e padronizada de cinco campos de leitura. As características de movimento espermático analisadas foram: percentual de motilidade total (MOT), percentual de motilidade progressiva (PROG), percentual de espermatozoides rápidos (RAP), velocidade do trajeto (VAP; em $\mu\text{m}/\text{s}$), velocidade progressiva (VSL; em $\mu\text{m}/\text{s}$), velocidade curvilínea (VCL; em $\mu\text{m}/\text{s}$), deslocamento lateral da cabeça (ALH; em μm), frequência de batimento flagelar (BCF; em Hz), percentual de retilinearidade do movimento (STR) e percentual de linearidade (LIN).

O *set up* do equipamento foi previamente ajustado da seguinte forma: frames por segundo: 60 Hz; tamanho mínimo da célula: 6 pixels; contraste de células em relação ao campo: 60 pixels; contraste de células imóveis: 60 pixels; referência de velocidade média da trajetória (VAP): $<40 \mu\text{m/s}$; referência de velocidade baixa da trajetória (VAP): $<30 \mu\text{m/s}$; referência de velocidade baixa (VSL): $<20 \mu\text{m/s}$; Retilinearidade (STR): 60%; magnificação 1,89; temperatura 38°C.

2.4 Análises funcionais espermáticas

Após a criopreservação, foram realizados quatro testes funcionais nos espermatozóides.

A integridade de membrana plasmática e acrossomal, o potencial de membrana mitocondrial e a quantidade das espécies reativas de oxigênio foram avaliados por citometria de fluxo (BD LSR Fortessa; Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA), equipado com lasers: azul 488-nm, 100 mW; vermelho 640-nm, 40 mW e violeta 405-nm, 100 mW. Em cada amostra, 10.000 células espermáticas foram analisadas numa taxa de 800 eventos/s. O corante Hoechst 33342 (100 mg/ml) foi adicionado para garantir que os debris celulares e outras partículas fossem excluídos das análises. Os dados foram avaliados pelo programa do mesmo fabricante BD FACSDiva software 6.1.

A estimativa da peroxidação lipídica foi analisada por espectrofotometria (UV-vis Spectrophotometer Ultrospec 3300 Pro; Biochrom Ltd., Cambridge, UK) com comprimento de onda de 532 nm.

2.4.1 Avaliação da integridade de membrana plasmática e acrossoma

As sondas de iodeto de propídio (PI; P4170, Sigma Aldrich), Aglutinina de *Pisum sativum*, associada ao isotiocionato de fluoresceína (FITC-PSA, L0770, Sigma Aldrich) e Hoechst 33342 (H342; 14533, Sigma Aldrich) foram utilizadas. Assim, em uma amostra de 200 µl de sêmen descongelado e diluído em meio TALP na concentração de 10×10^6 espermatozoides/ml foram adicionados 50 µl de H342 (100 µg/ml), 20 µl de PI (50 µg/ml) e 0.25 µl de FITC-PSA (2 µg/ml), e então homogeneizadas, incubadas por 15 minutos a 37°C e analisadas por citometria de fluxo [31].

Nesta avaliação, foram estimados os valores percentuais de quatro subpopulações de espermatozoides de acordo com a positividade-negatividade das sondas: membrana plasmática lesada e acrossoma íntegro (MPLAI), membrana plasmática e acrossoma lesado (MPAL), membrana plasmática e acrossoma íntegro (MPAI) e membrana plasmática íntegra e acrossoma lesado (MPIAL).

2.4.2 Avaliação do potencial da membrana mitocondrial

Para detectar o potencial mitocondrial, as sondas iodeto 5, 5', 6, 6', tetracloro-1, 1', 3, 3' - tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1; Sigma-Aldrich) e H342 foram utilizadas. Em cada amostra de 300 µl de sêmen descongelado e diluído em TALP na concentração de 10×10^6 espermatozoides/ml foi adicionado 10 µl de JC-1 e 50 µl de H342, homogeneizadas, incubadas por 15 minutos a 37°C ao abrigo da luz e então analisadas por citometria de fluxo [32]. Foram identificadas duas subpopulações: alto potencial mitocondrial (HPM) e baixo potencial mitocondrial (LPM).

2.4.3 Espécies reativas ao oxigênio

A sonda 5-(-6)-carboxi-2,7-diclorodihidrofluoresceindiacetato (D6883; carboxi-H2DCFDA; Molecular Probes) foi utilizada conforme Guthrie e Welch [33] para quantificar as espécies reativas de oxigênio (ROS). Em 500 µl de sêmen descongelado e diluído em TALP na concentração de 1×10^6 espermatozoides/ml foi adicionado 0.5 µl da sonda DCFDA (20 µM), 50 µl de PI (50 µg/ml) e 50 µl de H342 (100 µg/ml). As amostras foram homogeneizadas e incubadas a 25°C por 60 minutos. Nesta análise, foram observadas duas subpopulações: células totais com ROS positivo (CT ROS+) e células integras com ROS positivo (CI ROS+).

2.5 Determinação da peroxidação lipídica induzida

A técnica foi realizada por meio da reação de duas moléculas de ácido tiobarbitúrico com uma molécula de malondialdeído, sob condições de alta temperatura e baixo pH; o composto de coloração rósea formado por esta reação é mensurado em espectrofotômetro. As mensurações foram baseadas na metodologia primeiramente descrita por Ohkawa et al. [34].

A peroxidação lipídica foi provocada por meio da indução pelo sistema sulfato de ferro e ácido ascórbico, que por sua vez o primeiro acelera a quebra de hidroperóxidos propagando a reação em cadeia da peroxidação lipídica, conhecida como reação de Fenton, na qual o ácido ascórbico é responsável pela redução do Fe^{2+} para Fe^{3+} e, na presença do ferro, atua como intermediário na formação de radicais $\text{OH}^\cdot$ [35].

Após a descongelação das palhetas, em cada amostra de 200 µl de sêmen foram adicionados 1600 µl de PBS para centrifugação (Centrífuga Eppendorf 5804R)

a 800× g durante 10 minutos. Posteriormente, retirou-se o sobrenadante e repetiu-se novamente o processo com adição de mais 1600 µl de PBS e posterior centrifugação, para efetuar a lavagem completa da amostra e promover a remoção completa do diluidor. Em seguida, foram acrescentados 50 µl de Sulfato (4 mM) de Ferro e 50 µl de Vitamina C (20 mM) para incubação por 90 minutos a 37°C. Após isto, foram colocados 600 µl de uma solução 10% de Ácido Tricloroacético (TCA; Sigma T 9159) gelado e centrifugados a 18.000× g durante 10 minutos, para que ocorresse a precipitação das proteínas, então foram retirados 800 µl de sobrenadante para posterior leitura.

No momento da leitura foram adicionados 500 µl de Ácido Tiobarbitúrico 1% (TBA; Sigma T 5500) dissolvidos em hidróxido de sódio 0,05N (NaOH; Sigma S 8045) e as alíquotas contendo essa mistura foram incubadas em banho fervente a 100°C por 15 minutos para que ocorresse a reação de peroxidação lipídica. Logo após, as amostras foram resfriadas em gelo (0°C) para paralisar a reação. Posteriormente, os TBARS foram quantificados em espectrofotômetro e os resultados foram comparados com uma curva padrão, feita previamente com malondialdeído (Sigma 10,838-3) [36].

2.6 Análise Estatística

As variáveis espermáticas obtidas pelo CASA e pela citometria de fluxo foram avaliadas empregando o PROC GLM (SAS Inst., Inc., Cary, NC), após terem sido feitas a análise e adequação da normalidade da distribuição e homocedasticidade. No modelo de análise foram incluídos os efeitos de tratamento (fixo) e touro (aleatório). A descrição dos dados foi expressa como média±erro padrão e/ou em porcentagens. As diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$ e quando $0,05 < p < 0,10$ foram designadas como tendência.

3. Resultados

Os resultados das variáveis espermáticas avaliadas pelo CASA estão mostrados na Tabela 2. Foi observado após a descongelação que não houve diferença ($p>0,05$) entre os grupos com relação as variáveis MOT, PROG, RAP, STR e LIN. Entretanto, o grupo CE foi superior ($p<0,05$) ao grupo F com relação às características VAP, VSL, VCL e ALH, sendo que o grupo controle, com plasma seminal, não diferiu em comparação com os outros grupos. A variável BCF apresentou maior valor no grupo F ($p<0,01$) em comparação ao grupo CE, entretanto não diferindo do grupo C.

Com relação às funções espermáticas analisadas por citometria de fluxo após a descongelação, foi observado que não houve alteração ($p>0,05$) entre os grupos com relação à quantidade de espermatozoides com as membranas plasmática e acrossoma íntegras (MPAI). Porém, no grupo C foram verificados os maiores índices de lesões na membrana plasmática e acrossoma íntegro (MPLAI) em relação ao grupo F, sendo que a centrifugação não diferiu entre os grupos. Por outro lado, maiores porcentagens ($p<0,01$) de células com lesões em ambas as membranas (MPAL) foi encontrada no grupo F em comparação ao grupo controle, porém não houve diferença em relação ao grupo CE. Adicionalmente, o grupo CE provocou aumento de células com lesão no acrossoma e membrana plasmática íntegra (MPIAL) em relação ao grupo F, e o grupo C não diferiu entre os grupos ($0,34\pm0,06$).

A remoção de plasma seminal tanto por centrifugação quanto por filtragem não possibilitou aumento no potencial de membrana mitocondrial ($p>0,05$) em relação ao grupo controle. Porém, a centrifugação foi capaz de produzir maiores quantidades

($p < 0,01$) de espécies reativas ao oxigênio em comparação a filtragem e grupo controle.

Apesar disto, a centrifugação e a filtragem não provocaram aumento no grau de peroxidação lipídica, uma vez que não houve diferença entre os grupos quanto à concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

4. Discussão

Embora a influência do plasma seminal sobre os espermatozoides venha sendo discutida há anos, os reais efeitos ainda não são totalmente conhecidos, gerando, inclusive muita controvérsia em muitas espécies. Isso é claramente percebido quando alguns estudos realizados em búfalos [37,38,39,40] indicam que o plasma seminal é benéfico à célula espermática, possibilitando melhores resultados quanto à viabilidade e à qualidade do sêmen, influenciando positivamente a função espermática e a capacidade fertilizante. Por outro lado, a atuação deste fluido é questionada durante a criopreservação devido a atuação de fatores inibitórios que agem sobre a membrana plasmática estimulando o efluxo de colesterol e fosfolípidos, que por sua vez pode lesar a membrana dos espermatozoides [41]. O presente estudo é o primeiro relato dos efeitos da remoção do plasma seminal por filtragem comparada à centrifugação em bubalinos.

No presente estudo, de modo geral foram obtidos bons resultados de cinética espermática, sendo superiores a alguns estudos realizados em búfalos [42,43,44] e semelhantes a pesquisas em outras espécies tais como em equinos [45] e bovinos [46]. Segundo Love et al. [47] a motilidade espermática é maior nas amostras com o plasma seminal removido, o que não foi verificado no presente estudo visto que não houve diferença entre as variáveis MOT, PROG, RAP.

A remoção de plasma seminal por centrifugação possibilitou maiores velocidades espermáticas (VAP, VCL, VSL e ALH) em relação à filtragem, porém não diferiu em relação ao grupo controle. Por outro lado, a variável BCF, que representa o vigor das células espermáticas [48], foi maior na filtragem. Valores elevados de VCL e ALH estão positivamente correlacionados com a taxa de fertilização [49], entretanto a avaliação dessas variáveis isoladamente não é suficiente para predizer o real potencial de fertilidade do sêmen [50]. Esses resultados são divergentes daqueles obtidos por Ahmad et al. [1] que obtiveram valores de motilidade espermática, avaliados em microscopia de contraste de fase, maiores no grupo com ausência de plasma seminal. Porém nesse estudo, diferentemente desta pesquisa, os autores removeram plasma seminal por meio da filtragem com gel Sephadex.

Em outras espécies, como os equinos [51], os resultados obtidos também foram distintos daqueles observados nos búfalos do presente estudo, uma vez que não foram encontradas diferenças entre as variáveis avaliadas pelo CASA após a remoção de plasma seminal tanto pela centrifugação quanto por filtragem. Porém ao submeterem os animais sensíveis ao processo de criopreservação à utilização da técnica de remoção de plasma tanto por centrifugação quanto pela filtragem, notaram que os resultados das variáveis de movimentação espermática foram superiores para os grupos que removeram o plasma seminal. No presente estudo, não foi possível submeter à remoção do plasma seminal, os animais considerados maus congeladores uma vez que foi realizado uma seleção dos ejaculados, na qual somente os ejaculados que continham variáveis seminais mínimas estabelecidos eram destinados aos grupos e ao processo de criopreservação.

Um estudo avaliando a longevidade, morfologia espermática e taxa de recuperação [23], mostrou que a técnica de centrifugação com cushion foi superior na motilidade progressiva em relação a filtração com SpermFilter® e este último não interferiu na quantidade de células normais nem no percentual de espermatozoides recuperados. Resultados semelhantes foram encontrados no presente estudo relacionados à motilidade utilizando a centrifugação, porém divergiram na técnica de filtração uma vez que foram observadas maiores lesões nas membranas realizando este procedimento.

As maiores lesões de membrana plasmática obtidas no grupo C e CE, permitem inferir que, possivelmente os constituintes do plasma seminal em contato com a membrana podem causar aumento na permeabilidade, tornando-a mais vulnerável a possíveis danos provocados pela criopreservação [52,53]. Quanto ao método de centrifugação (grupo CE), os danos à membrana plasmática podem ser decorrentes do choque mecânico, constatação esta, já anteriormente descrita por Hoogewijs et al. [54] que notaram diminuição no percentual de células com membrana intacta após igual procedimento. A lesão acrossomal também foi mais evidente nas amostras de sêmen submetidas à centrifugação. Neste caso, a membrana plasmática permanece intacta, mas o acrossoma apresenta-se lesionado, e isto pode ocorrer quando o processo de reação acrossomal se inicia precocemente. Em pesquisa realizada em humanos, foi detectado que os espermatozoides se tornaram mais responsivos a esse processo quando o plasma seminal foi removido [55].

A técnica de filtração revelou maiores injúrias quando as lesões afetaram ambas as membranas (MPAL). Ressalta-se que, esta técnica foi desenvolvida para a espécie equina, sendo comprovada sua eficácia em ganhões [22,56]. Inferências

podem ser feitas devido às diferentes características seminais entre búfalos e
garanhões, o que pode ter contribuído para os diferentes resultados obtidos no
presente estudo. Todavia, as razões para este efeito permanecem ainda
desconhecidas.

A remoção do plasma seminal não interferiu no potencial de membrana
mitocondrial. No presente trabalho, foi observado que a porcentagem do número de
células com alto potencial mitocondrial (HMP) foi menor que a quantidade de células
com baixo potencial mitocondrial (LMP) após a criopreservação, o que corrobora com
outros relatos em búfalos [57,58]. A atividade mitocondrial possui intensa relação com
valores elevados de BCF e isto proporciona alta capacidade de migração e penetração
do espermatozoide no muco cervical, interferindo no potencial de fertilidade
[48,59,60]. No entanto, não foi verificado neste estudo a influência de BCF sobre a
atividade mitocondrial, visto que a filtragem apresentou valores superiores de BCF
porém isto não refletiu na população de espermatozoides com alto potencial
mitocondrial pois não houve diferença entre os grupos.

O sêmen de búfalos apresenta uma particularidade distinta em relação a
outras espécies quanto à quantidade de ácidos graxos poli-insaturados. Segundo
Kadirvel et al. [61] os espermatozoides bubalinos detêm grande concentração desse
componente na cauda, o que possibilita aumento na atividade flagelar espermática
por meio do fornecimento de fosfolipídios, fonte de energia principal da fosforilação
oxidativa das mitocôndrias. O número de células com alto potencial mitocondrial deste
estudo reafirma esta hipótese de que os búfalos podem apresentar uma aceleração
na atividade flagelar, uma vez que os valores de HMP foram superiores a outras
pesquisas realizadas em bovinos [62] e equinos [63].

Em relação à produção intracelular de espécies reativas ao oxigênio, foi verificada maior porcentagem de células reagidas no grupo CE em relação aos outros grupos, demonstrando que a centrifugação aumenta os níveis de EROs independente da força ou tempo em que as amostras permanecem na centrifuga [64]. Esses resultados corroboram com a pesquisa feita por Guimarães et al. [65] que observaram maiores concentrações de EROs em amostras de sêmen bovino submetidas a centrifugação em gradiente de densidade contínuo de Percoll. Resultados semelhantes são encontrados no sêmen humano, no qual necessita-se utilizar a técnica de centrifugação para selecionar espermatozoides mais velozes, porém é evidenciado o aumento da quantidade de EROs após o procedimento [64].

Um dos fatores que podem aumentar a susceptibilidade do sêmen bubalino ao estresse oxidativo é a presença acentuada de ácidos graxos poli-insaturados. Se por um lado beneficiam a movimentação dos espermatozoides bubalinos, por outro a grande quantidade deste componente prejudica a célula espermática, uma vez que a criopreservação acelera a produção de EROs, diminuindo a viabilidade após a congelação [66,67].

Na literatura é reportado que altas concentrações de EROs induzem maiores injúrias aos espermatozoides tais como: diminuição da motilidade [68], maiores índices de lesão nas membranas espermáticas [69] e redução da atividade mitocondrial [70]. Todavia, é importante ressaltar que a produção de EROs em concentrações fisiológicas é benéfica aos espermatozoides, uma vez que atuam como mediadores das funções espermáticas demonstrando exercer papel essencial nos processos de capacitação espermática e reação acrossomal, influenciando positivamente na capacidade fertilizante [71,72]. Apesar da maior produção de EROs

observada no presente estudo para o grupo CE, não foi notado aumento da peroxidação lipídica após a criopreservação quando foi retirado o plasma seminal, independente da técnica utilizada (centrifugação ou filtragem). É possível que este aumento de EROs tenha sido provocado pela força mecânica da centrifugação e não pela ausência de plasma seminal. Além disso, o aumento da quantidade de EROs no grupo CE não foi suficiente para gerar injúrias à membrana das células espermáticas, conforme o resultado obtido por TBARS que não mostrou diferença entre os grupos, uma vez que CE apresentou valores de cinética espermática, integridade de membrana e potencial mitocondrial semelhantes ao grupo com plasma seminal.

Ao mensurar a peroxidação lipídica pela concentração de malondialdeído (MDA) no sêmen descongelado de búfalos, Kadirvel et al. [73] não observaram correlação entre integridade do acrossoma e peroxidação lipídica, afirmando que os danos no acrossoma são independentes da quantidade de EROs e peroxidação lipídica, visto que a causa da peroxidação lipídica está mais relacionada à redução da atividade de enzimas antioxidantes do que o próprio aumento da permeabilidade da membrana durante o processo de criopreservação. Isto explica os achados com nenhuma diferença entre os grupos em relação a peroxidação lipídica, embora tenham sido encontrados resultados diferentes entre os grupos em relação a integridade das membranas.

5. Conclusões

A hipótese de que a remoção do plasma seminal provoca menos danos aos espermatozoides e melhora a qualidade do sêmen de búfalos não foi confirmada, pois a remoção do plasma seminal não melhorou as variáveis de cinética espermática e nem reduziu os índices de lesões nas membranas plasmática e acrossomal.

Do mesmo modo não se confirmou a hipótese que a filtração seja menos lesiva às células que a centrifugação. Embora o método de filtração apresente vantagens sobre a centrifugação, uma vez que proporcionou menor produção de EROs, não justifica sua utilização no sêmen de búfalos devido aos semelhantes resultados obtidos frente à não remoção do plasma seminal. Mais estudos são necessários para avaliar esta metodologia quanto ao potencial de fertilidade *in vitro* e *in vivo*.

Conflitos de interesse

Os autores reportam nenhum conflito de interesse.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação para o Desenvolvimento da Unesp (FUNDUNESP), proc: 2523-002-14 PROPe-CDC, pelo suporte financeiro, à Botupharma (em especial ao Dr José Antônio Della'Aqua Júnior) pelo fornecimento dos diluentes e dispositivo SpermFilter®, à Central de Biotecnologia de Reprodução Animal (CEBRAN), ao Instituto de Zootecnia pelas análises realizadas no CASA (proc Fapesp: 2012/05555-8) e pela análise estatística, e ao Departamento de Radiologia e Reprodução Animal, FMVZ – Unesp Botucatu, pela utilização do citômetro de fluxo e ao Departamento de Reprodução Animal, FMVZ – USP, pela execução da técnica de TBARS.

Referências

- [1] Ahmad Z, Anzar M, Shahab M, Ahmad N, Andrabi SMH. Sephadex and sephadex ion-exchange filtration improves the quality and freezability of low-grade buffalo semen ejaculates. *Theriogenology* 2003;59:1189–202.
- [2] Andrabi SMH, Ansari MS, Ullah N, Anwar M, Mehmood A, Akhter S. Duck egg yolk in extender improves the freezability of buffalo bull spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 2008;104:427–33.
- [3] Andrabi S. Factors Affecting the Quality of Cryopreserved Buffalo (*Bubalus bubalis*) Bull Spermatozoa. *Reprod Domest Anim* 2009;44:552–69.
- [4] Holt W V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. *Theriogenology* 2000;53:47–58.
- [5] Harshan HM, Sankar S, Singh LP, Singh MK, Sudharani S, Ansari MR, et al. Identification of PDC-109-like protein(s) in buffalo seminal plasma. *Anim Reprod Sci* 2009;115:306–11.
- [6] Singh M, Ghosh SK, Prasad JK, Kumar A, Tripathi RP, Bhure SK, et al. Seminal PDC-109 protein vis-à-vis cholesterol content and freezability of buffalo Spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 2014;144:22–9.
- [7] Ahmad M, Khan A, Shah ZA, Ahmad KM. Effects of removal of seminal plasma on the survival rate of buffalo bull spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 1996;41:193–9.
- [8] Kumar A, Singh LP, Harshan HM, Majumdar AC. Seminal plasma non-heparin binding proteins (NHBP) reduce the cryoinjury to buffalo cauda epididymal spermatozoa induced by heparin binding proteins (HBP). *Anim Reprod Sci* 2008;104:220–6.

- 459 [9] Muer SK, Roy SB, Mohan G, Dhoble RL. Cryogenic changes in seminal protein
460 of cattle and buffalo. *Theriogenology* 1988;30:1005–10.
- 461 [10] Sahni KL. Inhibitory effect of seminal plasma on motility of bovine semen. *Indian*
462 *J Anim* 1990;60:786–8.
- 463 [11] Kumar R, Jagan Mohanarao G, Arvind, Atreja SK. Freeze-thaw induced
464 genotoxicity in buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa in relation to total
465 antioxidant status. *Mol Biol Rep* 2011;38:1499–506.
- 466 [12] El-Sisy GA, El-Nattat WS, El-Sheshtawy RI. Buffalo semen quality, antioxidants
467 and peroxidation during chilling and cryopreservation. *J Vet Res* 2007;11:55–61.
- 468 [13] Goyal R., Tuli R., Georgie G., Chand D. Comparison of quality and freezability
469 of water Buffalo semen after washing or sephadex filtration. *Theriogenology*
470 1996;16:679–86.
- 471 [14] Way AL, Griel Jr LC, Killian GJ. Effects of accessory sex gland fluid on viability,
472 capacitation, and the acrosome reaction of cauda epididymal bull spermatozoa.
473 *J Androl* 2000;21:213–9.
- 474 [15] Bergeron A, Crête MH, Brindle Y, Manjunath P. Low-density lipoprotein fraction
475 from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine
476 seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane.
477 *Biol Reprod* 2004;70:708–17.
- 478 [16] Luna C, Yeste M, Rivera Del Alamo MM, Domingo J, Casao A, Rodriguez-Gil
479 JE, et al. Effect of seminal plasma proteins on the motile sperm subpopulations
480 in ram ejaculates. *Reprod Fertil Dev* 2015.
- 481 [17] Kareskoski M, Katila T. Components of stallion seminal plasma and the effects
482 of seminal plasma on sperm longevity. *Anim Reprod Sci* 2008;107:249–56.

- 483 [18] Jasko DJ, Martin JM, Squires EL. Effect of insemination volume and
484 concentration of spermatozoa on embryo recovery in mares. *Theriogenology*
485 1992;37:1233–9.
- 486 [19] Martinus RD, Molan PC, Shannon P. Deleterious effect of seminal plasma in the
487 cryopreservation of bovine spermatozoa. *New Zel J Agric Res* 1991;34:281–5.
- 488 [20] Macpherson ML, Shore MD, Fernandez MH, Miller CD, Thompson JA,
489 Blanchard TL. Processing factors which influence viability and fertility of
490 cryopreserved equine spermatozoa. *Havemayer Found Mono Ser* 2001;6:27–9.
- 491 [21] Alvarez JG, Lasso JL, Blasco L, Numez RC, Heyner S, Caballero PP, et al.
492 Centrifugation of human spermatozoa induces sublethal damage; separation of
493 human spermatozoa from seminal plasma by a dextran swim-up procedure
494 without. *Hum Reprod* 1993;8:1087–92.
- 495 [22] Alvarenga MA, Melo CM, Magalhães LCO, Papa FO. A new method to
496 concentrate equine sperm. *Anim Reprod Sci* 2010;121:186–7.
- 497 [23] Roach J, Schnobrich M, Ellerbrock R, Feijo L, Bradecamp E, Alvarenga MA, et
498 al. Comparison of cushioned centrifugation and SpermFilter filtration on longevity
499 and morphology of cooled-stored equine semen. *Vet Rec* 2016;178:1–4.
- 500 [24] Alvares CA, Stape JL, Sentelhas PC, Gonçalves JLM, Sparovek G. Köppen's
501 climate classification map for Brazil. *Meteorol Zeitschrift* 2013;22:711–28.
- 502 [25] CBRA. Brazilian College of Animal Reproduction. Manual para exame
503 andrológico e avaliação de sêmen animal. 2013;3 ed. Belo.
- 504 [26] Khan MIR, Ijaz A. Effect of osmotic pressure on motility, plasma membrane
505 integrity and viability in fresh and frozen-thawed buffalo spermatozoa. *Animal*
506 2008;2:548–53.

- 507 [27] Blom E. The ultrastructure of some characteristics sperm defects and a proposal
508 for a new classification on the bull spermogram. Nord Vet Med 1973;25:383–91.
- 509 [28] Della'Aqua Jr JA, Papa FO, Alvarenga MA, Zahn FS. Effect of centrifugation and
510 packing system on sperm parameters of equine frozen semen. Anim Reprod Sci
511 2001;68:324–5.
- 512 [29] Ramires Neto C, Monteiro GA, Soares RF, Pedrazzi C, Dell'aqua JA, Papa FO,
513 et al. New seminal plasma removal method for freezing stallion semen.
514 Theriogenology 2013;79:1120–3.
- 515 [30] Graham JK. Current techniques for freezing equine semen. In: Techniques for
516 handling and utilization of transported cooled and frozen equine spermatozoa.
517 Proceedings... Fort Collins-Co, 1995-1996. p. 153. n.d.
- 518 [31] Freitas-Dell'Aqua CP, Guasti PN, Monteiro GA, Maziero RR., Dell'aqua JA, Papa
519 FO. Flow cytometric analysis of fertile and subfertile frozen stallion spermatozoa.
520 Anim Reprod 2012;9:941.
- 521 [32] Evenson DP, Ballachey BE. Flow cytometric evaluation of bull sperm chromatin
522 structure, mitochondrial activity and concentration. Proc Elev NMB Tech Conf
523 AI Reprod 1986:109.
- 524 [33] Guthrie HD, Welch GR. Determination of intracellular reactive oxygen species
525 and high mitochondrial membrane potential in percoll treated viable boar sperm
526 using fluorescence-activated flow cytometry. J Anim Sci 2006;84:2089–100.
- 527 [34] Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by
528 thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem 1979;95:351–8.
- 529 [35] Nichi M, Goovaerts IGF, Cortada CNM, Barnabe VH, De Clercq JBP, Bols PEJ.
530 Roles of lipid peroxidation and cytoplasmic droplets on in vitro fertilization

- capacity of sperm collected from bovine epididymides stored at 4 and 34 °C. Theriogenology 2007;67:334–40.
- [36] Nichi M, Bols PEJ, Züge RM, Barnabe VH, Goovaerts IGF, Barnabe RC, et al. Seasonal variation in semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* bulls raised under tropical conditions. Theriogenology 2006;66:822–8.
- [37] Eghbali M, Alavi-shoushtari SM, Asri-rezaei S, Ansari MK. Calcium , Magnesium and Total Antioxidant Capacity (TAC) in Seminal Plasma of Water Buffalo (*Bubalus Bubalis*) Bulls and their Relationships with Semen Characteristics. Vet Res Forum 2010;1:12–20.
- [38] Ibrahim SS, Rakha AM, El-Chahidi AA, El-Azab AL. Preservation of buffalo semen. II. The role of seminal plasma. Egypt J Vet Sci 1981;18:67–76.
- [39] Arangasamy A, Singh LP, Ahmed N, Ansari MR, Ram GC. Isolation and characterization of heparin and gelatin binding buffalo seminal plasma proteins and their effect on cauda epididymal spermatozoa. Anim Reprod Sci 2005;90:243–54.
- [40] Asadpour R, Alavi-Shoushtari SM, Rezaii SA, Ansari MHK. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of buffalo bulls seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. Anim Reprod Sci 2007;102:308–13.
- [41] Manjunath P, Therien I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. J Reprod Immunol 2002;53:109–19.
- [42] Gonçalves AA, Garcia AR, Arruda RP, Barioni Jr W, Lourenço Jr JDB, Kahwage PR, et al. Dietary supplementation with unsaturated fatty acids improves quality of water buffalo (*Bubalus bubalis*) thawed semen. Semin Ciências Agrárias

555 2014;35:2467–84.

556 [43] Mandal DK, Nagpaul PK, Gupta AK. Motion characteristics of murrah buffalo bull
557 spermatozoa in various seasons and its relationship with functional integrity of
558 the plasmallema. *Theriogenology* 2003;60:349–58.

559 [44] Rasul Z, Anzar M, Jalali S, Ahmad N. Effect of buffering systems on post-thaw
560 motion characteristics, plasma membrane integrity, and acrosome morphology
561 of buffalo spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 2000;59:31–41.

562 [45] Andrade AFC, Zaffalon FG, Celeghini ECC, Nascimento J, Tarragó OFB,
563 Martins SMMK, et al. Addition of Seminal Plasma to Post-thawing Equine
564 Semen: What is the Effect on Sperm Cell Viability? *Reprod Domest Anim*
565 2011;46:682–6.

566 [46] Crespilho AM, Papa FO, Sá Filho MF, Guasti PN, Dell'Aqua Jr JA, Vasconcelos
567 JLM, et al. The influence of insemination dose on pregnancy per fixed-time
568 artificial insemination in beef cows is affected by semen extender. *Anim Reprod*
569 2014;11:3–10.

570 [47] Love CC, Brinsko SP, Rigby SL, Thompson JA, Blanchard TL, Varner DD.
571 Relationship of seminal plasma level and extender type to sperm motility and
572 DNA integrity. *Theriogenology* 2005;63:1581–91.

573 [48] Contri A, Valorz C, Faustini M, Wegher L, Carluccio A. Effect of semen
574 preparation on casa motility results in cryopreserved bull spermatozoa.
575 *Theriogenology* 2010;74:424–35.

576 [49] Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K. Computer assisted semen analyzers in
577 andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* 2002;57:149–79.

578 [50] Farrel PB, Foote RN, Mcardle MM, Trouern-Trend VL, Tardif AL. Media and

- dilution procedures tested to minimize handling effects on human, rabbit and bull sperm for computer-assisted sperm analysis (CASA). *J Androl* 1996;17:293–300.
- [51] Ramires Neto C, Monteiro GA, Soares RF, Pedrazzi C, Dell’aqua JA, Papa FO, et al. Effect of Removing Seminal Plasma Using a Sperm Filter on the Viability of Refrigerated Stallion Semen. *J Equine Vet Sci* 2013;33:40–3.
- [52] Thérien I, Moreau R, Manjunath P. Major proteins of bovine seminal plasma and high density lipoprotein induces cholesterol efflux from epididimal sperm. *Biol Reprod* 1998;58.
- [53] Thérien I, Moreau R, Manjunath P. Bovine seminal plasma phospholipid-binding proteins stimulate phospholipid efflux from epididimal sperm. *Biol Reprod* 1999;61:590–8.
- [54] Hoogewijs M, Rijsselaere T, De Vliegher S, Vanhaesebrouck E, De Schauwer C, Govaere J, et al. Influence of different centrifugation protocols on equine semen preservation. *Theriogenology* 2010;74:118–26.
- [55] Cross NL. Multiple effects of seminal plasma on the acrosome reaction of human sperm. *Mol Reprod Dev* 1993;35:316–23.
- [56] Alvarenga MA, Papa FO, Carmo MT, Kievitsbosch T, Castro Chaves MMB, Ramires Neto C. Methods of Concentrating Stallion Semen. *J Equine Vet Sci* 2012;32:424–9.
- [57] Kadirvel G, Periasamy S, Kumar S. Effect of cryopreservation on apoptotic-like events and its relationship with cryocapacitation of buffalo (*Bubalus bubalis*). *Reprod Domest Anim* 2012;47:143–50.
- [58] Mohan R, Atreja S. Soya Milk Tris-based Phytoextender Reduces Apoptosis in

- 603 Cryopreserved Buffalo (*Bubalus bubalis*) Spermatozoa. *Reprod Domest Anim*
 604 2014;49:797–805.
- 605 [59] Rasul Z, Ahmad N, Anzar M. Changes in motion characteristics, plasma
 606 membrane integrity, and acrosome morphology during cryopreservation of
 607 buffalo spermatozoa. *J Androl* 2001;22:278–83.
- 608 [60] Mortimer ST. CASA - Practical aspects. *J Androl* 2000;21:515–24.
- 609 [61] Kadirvel G, Kumar S, Kumaresan A, Kathiravan P. Capacitation status of fresh
 610 and frozen-thawed buffalo spermatozoa in relation to cholesterol level,
 611 membrane fluidity and intracellular calcium. *Anim Reprod Sci* 2009;116:244–53.
- 612 [62] Castro LS, Hamilton TRS, Mendes CM, Nichi M, Barnabe VH, Visintin JA, et al.
 613 Sperm cryodamage occurs after rapid freezing phase: flow cytometry approach
 614 and antioxidant enzymes activity at different stages of cryopreservation. *J Anim*
 615 *Sci Biotechnol* 2016;7:17.
- 616 [63] Wu Z, Zheng X, Luo Y, Huo F, Dong H, Zhang G, et al. Cryopreservation of
 617 stallion spermatozoa using different cryoprotectants and combinations of
 618 cryoprotectants. *Anim Reprod Sci* 2015;163:75–81.
- 619 [64] Shekarriz M, DeWire DM, Thomas a J, Agarwal A. A method of human semen
 620 centrifugation to minimize the iatrogenic sperm injuries caused by reactive
 621 oxygen species. *Eur Urol* 1995;28:31–5.
- 622 [65] Guimarães ACG, Leivas FG, Santos FW, Schwengber EB, Giotto AB, Machado
 623 CIU, et al. Reduction of centrifugation force in discontinuous percoll gradients
 624 increases in vitro fertilization rates without reducing bovine sperm recovery.
 625 *Anim Reprod Sci* 2014;146:103–10.
- 626 [66] Nair SJ, Brar a. S, Ahuja CS, Sangha SPS, Chaudhary KC. A comparative study

on lipid peroxidation, activities of antioxidant enzymes and viability of cattle and buffalo bull spermatozoa during storage at refrigeration temperature. Anim Reprod Sci 2006;96:21–9.

[67] Sansone G, Nastri MJF, Fabbrocini A. Storage of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. Anim Reprod Sci 2000;62:55–76.

[68] Bansal AK, Bilaspuri GS. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. Vet Med Int 2010;2011:1–7.

[69] Kothari S, Thompson A, Agarwal A, Plessis SSD. Free-radicals: Their beneficial and detrimental effects on sperm function. Indian J Exp Biol 2010;78:1700–8.

[70] Guthrie HD, Welch GR. Effects of reactive oxygen species on sperm function. Theriogenology 2012;78:1700–8.

[71] Desai N, Sharma R, Maker K, Sabnegh E, Agarwal A. Physiological and pathological levels of reactive oxygen species in neat semen of infertile men. Fertil Steril 2009;92:1626–31.

[72] Kodama H, Kuribayashi Y, Gagnon C. Effect of sperm lipid peroxidation on fertilization. J Androl 1996;17:151–7.

[73] Kadirvel G, Kumar S, Ghosh SK, Perumal P. Activity of antioxidative enzymes in fresh and frozen thawed buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa in relation to lipid peroxidation and semen quality. Asian Pacific J Reprod 2014;3:210–7.

647 **Tabela 1**648 Características físicas e morfológicas do sêmen fresco de búfalos (*Bubalus bubalis*).

Variáveis	Grupos			Média Geral	P value
	Controle (n = 47)	Centrifugação (n = 47)	Filtragem (n = 47)		
Vol	-	-	-	2,5±1,7	-
Turb	-	-	-	3,74±0,6	-
IMP	-	-	-	71,6±5,6	-
DMe	-	-	-	15,9±8,3	-
DMa	-	-	-	4,3±2,7	-
DT	-	-	-	20,2±4,9	-
Conc	920,9±60,2	957,3±60,2	959,4±60,2	-	0,89
Mot	77,8±0,7	77,8±0,7	77,6±0,7	-	0,97
Vig	3,74±0,06	3,74±0,06	3,72±0,06	-	0,96

649 Vol: volume (ml), Turb: motilidade massal (0-5), IMP (Integridade de membrana plasmática), DMe
650 (defeitos menores), DMa (defeitos maiores), DT: defeitos totais, Conc: concentração espermática ($\times 10^6$
651 spz/ml), Mot: motilidade progressiva (%), Vig: vigor (%).

Tabela 2

Média $\pm$ erro padrão da análise computadorizada da cinética espermática (CASA) do sêmen de búfalos submetidos a duas técnicas distintas de remoção do plasma seminal (centrifugação x filtragem).

Variáveis	Grupos			P value
	Controle (n = 47)	Centrifugação (n = 47)	Filtragem (n = 47)	
MOT (%)	69,57 $\pm$ 2,03	71,92 $\pm$ 2,01	66,44 $\pm$ 2,01	0,16
PROG (%)	59,97 $\pm$ 1,83	61,13 $\pm$ 1,83	57,09 $\pm$ 1,85	0,28
RAP (%)	67,17 $\pm$ 2,04	69,28 $\pm$ 2,04	63,42 $\pm$ 2,06	0,12
VAP (μm/s)	93,15 $\pm$ 1,15 ^{ab}	96,65 $\pm$ 1,15 ^a	90,73 $\pm$ 1,17 ^b	<0,01
VSL (μm/s)	78,76 $\pm$ 0,91 ^{ab}	80,33 $\pm$ 0,91 ^a	76,87 $\pm$ 0,92 ^b	0,02
VCL (μm/s)	137,39 $\pm$ 2,19 ^{ab}	144,01 $\pm$ 2,21 ^a	133,35 $\pm$ 2,22 ^b	<0,01
ALH (μm)	5,64 $\pm$ 0,10 ^{ab}	5,96 $\pm$ 0,10 ^a	5,60 $\pm$ 0,10 ^b	0,02
BCF (Hz)	17,80 $\pm$ 0,30 ^a	16,67 $\pm$ 0,30 ^b	18,59 $\pm$ 0,31 ^a	<0,01
STR (%)	85,25 $\pm$ 0,50	83,72 $\pm$ 0,50	85,16 $\pm$ 0,51	0,06
LIN (%)	61,52 $\pm$ 0,67	59,87 $\pm$ 0,67	61,56 $\pm$ 0,68	0,13

^{ab}Letras diferentes na mesma linha indicam valores diferentes (P < 0,05)

Abreviações: MOT, motilidade total; PROG, motilidade progressiva; RAP, velocidade rápida; VAP, velocidade média da trajetória; VSL, velocidade linear; VCL, velocidade curvilinear; ALH, amplitude do deslocamento lateral da cabeça espermática; BCF, frequência de batimento caudal; STR, retilinearidade; LIN, linearidade.

Tabela 3

Média $\pm$ erro padrão da integridade de membrana plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial, produção de espécies reativas ao oxigênio analisadas por citometria de fluxo e peroxidação lipídica mensurada por TBARS do sêmen de búfalos submetido a duas técnicas distintas de remoção do plasma seminal (centrifugação x filtração).

Variáveis (%)	Grupos			Pvalue
	C Controle (n = 47)	CE Centrifugação (n = 47)	F Filtração (n = 47)	
MPLAI	47,88 $\pm$ 1,99 ^a	41,30 $\pm$ 1,96 ^{ab}	40,45 $\pm$ 2,01 ^b	0,07
MPAL	15,23 $\pm$ 1,06 ^b	17,43 $\pm$ 1,04 ^{ab}	22,18 $\pm$ 1,07 ^a	<0,01
MPAI	33,74 $\pm$ 2,09	37,91 $\pm$ 2,06	32,02 $\pm$ 2,11	0,19
MPIAL	0,34 $\pm$ 0,06 ^{ab}	0,77 $\pm$ 0,05 ^a	0,28 $\pm$ 0,06 ^b	0,03
HMP	35,46 $\pm$ 2,23	39,51 $\pm$ 2,20	33,42 $\pm$ 2,26	0,14
LMP	61,63 $\pm$ 2,51	57,90 $\pm$ 2,47	61,53 $\pm$ 2,54	0,70
CI ROS+	21,83 $\pm$ 4,60 ^b	56,68 $\pm$ 4,53 ^a	20,96 $\pm$ 4,7 ^b	<0,01
CT ROS+	17,94 $\pm$ 3,46 ^b	35,50 $\pm$ 3,41 ^a	16,07 $\pm$ 3,50 ^b	<0,01
TBARS (ng/ml)	342,41 $\pm$ 29,60	342,68 $\pm$ 361,16	290,09 $\pm$ 22,11	0,60

^{ab}Letras diferentes na mesma linha indicam valores diferentes (P < 0,05); 0,05 < p < 0,10 foi considerado como tendência.

MPLAI: membrana plasmática lesada e acrossomal íntegra; MPAL: membrana plasmática e acrossomal lesada; MPAI: membrana plasmática e acrossomal íntegra; MPIAL: membrana plasmática íntegra e acrossomal lesada; HMP: alto potencial mitocondrial; LMP: baixo potencial mitocondrial; CI ROS+: células íntegras positivas à produção de ROS; CT ROS+: células totais positivas à produção de ROS.

APÊNDICE

Fórmula TALP

SPERM TALP	
Água destilada qsp	500 mL
KCl	0,932 g
MgCl ₂ 6H ₂ O	0,085 g
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	0,025g
NaCl	2,100g
Piruvato de sódio	0,055g
CaCl ₂ 2H ₂ O	0,145g
Lactato de sódio	1,550mL
HEPES	1,190g
NaHCO ₃	1,050g
Gentamicina	0,250mL