

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**AVALIAÇÃO DO SÊMEN DE BÚFALOS EM TRÊS MEIOS DE
CRIOPRESERVAÇÃO**

MARIANA FURTADO ZORZETTO

Botucatu – SP

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**AVALIAÇÃO DO SÊMEN DE BÚFALOS EM TRÊS MEIOS DE
CRIOPRESERVAÇÃO**

MARIANA FURTADO ZORZETTO

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária para obtenção do
título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eunice Oba

Co-orientador: Dr. Ian Martin

Nome do Autor: Mariana Furtado Zorzetto

Título: AVALIAÇÃO DO SÊMEN DE BÚFALOS EM TRÊS MEIOS DE
CRIOPRESERVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA

ProfªDrª Eunice Oba
Presidente e Orientadora
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof.Dr. Frederico Ozanam Papa
Membro
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Profª. Drª. Luciana da Silva Leal
Membro
Universidade Paranaense (UNIPAR) - Umuarama/PR

Data da Defesa: 22 de fevereiro de 2013.

Dedicatória

DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação aos meus pais Henrique Donizetti Zorzetto e Antonia Aparecida Furtado Zorzetto, a minha irmã Juliana Furtado Zorzetto. Obrigada pelo apoio, amor incondicional e dedicação para que esse sonho se realizasse.

Dedico aos meus avós Gilda Rodrigues, José Furtado e Anna Aparecida Canciã que são pessoas muito especiais para mim, sempre me tratando com muito amor e acompanhando meu crescimento.

Dedico a Deus, que sempre me protegendo e iluminando permitiu que eu chegasse até aqui.

Obrigada a todos !!!!

“Tudo o que um sonho precisa para ser realizado é alguém que acredite que ele possa ser realizado.”

Roberto Shinyashiki

Agradecimentos

AGRADECIMENTOS

“O saber a gente aprende com os mestres e os livros. A sabedoria se aprende é com a vida e com os humildes.”

Cora Coralina

A Professora Titular Eunice Oba pelos ensinamentos, exemplo, paciência e amizade. Obrigada pela confiança.

Ao Professor Titular Frederico Ozanam Papa pelo apoio durante o experimento, os ensinamentos, profissionalismo e amizade.

Ao professor Alcides de Amorim Ramos e Oswaldo Ramos proprietários dos animais (búfalos) que gentilmente foram cedidos para o experimento. Ainda agradeço ao professor Alcides Ramos pela ajuda com as análises estatísticas e por toda paciência.

Ao professor doutor José Ferreira Nunes e a Cristiane Mello da Universidade Estadual do Ceará pela atenção e por fornecerem o meio diluente ACP-111 utilizado e testado no sêmen de búfalos no presente estudo.

A CAPES pela bolsa de estudos que viabilizou a execução do projeto de pesquisa.

Ao Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da FMVZ – UNESP, Campus de Botucatu/SP, em nome de todos os seus professores e funcionários.

Aos amigos do curso de pós-graduação e companheiros do CERAN da FMVZ – UNESP, Campus de Botucatu - SP, pela convivência, amizade e troca de experiências.

Ao co-orientador Ian Martin pela paciência, ensinamento, disponibilidade de tempo, você não é “chato” e pela amizade.

Ao Seu Dito funcionário da FMVZ na Fazenda Lageado por toda GRANDE ajuda, esforço, paciência e experiência passada, sem o senhor eu não conseguiria realizar o experimento, meu sincero obrigado.

Aos funcionários do setor de Bubalinocultura da Fazenda Lageado Lipe e Liu pelo apoio e ajuda para todas as horas e problemas.

Aos funcionários do confinamento de gado de corte da Fazenda Lageado Sidney e Claudemir pela ajuda durante todo o experimento e apoio em horas difíceis.

Aos amigos de pós- graduação Yamê, Gabriel, Camila Luba obrigada pela ajuda durante o experimento, pela amizade, conversar, risadas e todo apoio.

A Camila Freitas por toda ajuda nas análises realizadas no citômetro de fluxo, paciência e ensinamentos.

Aos estagiários de iniciação científica Saulo e Mariana por toda a ajuda durante o experimento e apoio.

Aos amigos Alexandre (Perdigão), Dayane, Carolina, Juliana, Renata, Débora, Luciane e Renato pelo apoio nas horas de desabafos e dificuldades, e ainda por estarem sempre ao meu lado.

A amiga Aliucha, Karina, Rita e todos os amigos de Sertãozinho pelo apoio mesmo que de longe, sempre na torcida.

Ao João Marcos por estar sempre ao meu lado me apoiando em minhas decisões, pela paciência na hora dos desabafos, pelos conselhos e todo carinho.

Aos amigos da República Zona Azul pelo seu apoio de forma peculiar e pelo espaço cedido nos momentos de comemorações.

A todos que de alguma forma contribuíram para esse trabalho...

DEDICO, HOMENAGEIO e AGRADEÇO.....!

Lista de Tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Valores médios, desvios padrão e coeficiente de variância, das características: integridade da membrana plasmática (IMP), motilidade (MT), motilidade progressiva (MP) e rápidos (RAP) entre os diluentes testado no sêmen de búfalos á fresco	27
Tabela 2	Valores médios, desvios padrão e coeficiente de variância, das características: velocidade ao longo de uma trajetória média (VAP), velocidade progressiva (VSL) e velocidade curvilinear (VCL) entre os diluentes testados no sêmen de búfalos á fresco	29
Tabela 3	Valores médios, desvios padrão e coeficiente de variância, das características: integridade da membrana plasmática (IMP), motilidade (MT), motilidade progressiva (MP) e rápidos (RAP) entre os diluentes testado no sêmen de búfalos pós-congelação	29
Tabela 4	Valores médios, desvios padrão e coeficiente de variância, das características: velocidade ao longo de uma trajetória média (VAP), velocidade progressiva (VSL) e velocidade curvilinear (VCL) entre os diluentes testados no sêmen de búfalos pós-congelação	30
Tabela 5	Valores médios, desvios padrão e coeficiente de variância, das características: membrana plasmática lesada e acrossoma íntegro (MPLAI), membrana plasmática e acrossoma lesados (MPAL), membrana plasmática e acrossoma íntegros (MPAI) e membrana plasmática íntegra e acrossoma lesado (MPIAL, dados transformados em $\sqrt{x+0,5}$) entre os diluentes testados no sêmen de búfalos pós-congelação	30
Tabela 6	Valores médios, desvios padrão e coeficiente de variância, das características: anexina negativa e iodeto de propídio positivo (AN-PI+), anexina e iodeto de propídio negativos (AN-PI-), anexina e iodeto de propídio positivos (AN+PI+, dados transformados em $\sqrt{x+1}$) e anexina positiva e iodeto de propídio negativo (AN+PI-, dados transformados em $\sqrt{x+0,5}$) entre os diluentes testados no sêmen de búfalos pós-congelação	31
Tabela 7	Valores médios, desvios padrão e coeficiente de variância, das características: células íntegras (CI), células íntegras com lesões semelhantes à capacitação (CIAN+, dados transformados em $\sqrt{x+1}$) e índice de fragmentação de DNA (IDF, dados transformados em $\sqrt{x+0,5}$) entre os diluentes testados no sêmen de búfalos pós-congelação	32

Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

	Microscopia de epifluorescência de sêmen bubalino utilizando a associação das sondas fluorescentes diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e iodeto de propídio (IP) observado no aumento de 100X (seta preta: espermatozoide com membrana plasmática íntegra; seta branca: espermatozoide com membrana acrossomal íntegra e membrana plasmática lesada; seta vermelha: espermatozoide com membrana plasmática e acrossomal lesada)	28
Figura 1		
Figura 2	Gráfico gerado pelo citometro de fluxo, cotendo as quatro populações espermáticas (MPLAI, MPAL, MPAI e MPIAL) em sêmen de búfalos	31
Figura 3	Gráfico gerado pelo citometro de fluxo, contendo as quatro populações geradas na análise com anexina V e PI, em sêmen de búfalos	32
Figura 4	Gráficos gerados pelo citometro de fluxo, demonstrando a porcentagem de lesões semelhantes à capacitação na população de células íntegras, em sêmen de búfalos	33
Figura 5	Espermatozoide normal e espermatozoide com cauda fortemente dobrada (indicado pela seta branca) observado em microscopia de interferência diferencial (DIC, aumento de 100X) em sêmen bubalino	36
Figura 6	Indicado pela seta branca um espermatozoide com gota citoplasmática distal observado em microscopia de interferência diferencial (DIC, aumento de 100X) em sêmen bubalino	36

Lista de Abreviaturas

LISTA DE ABREVIATURAS

ACP-111: Água de coco em pó;
ANOVA: análise de varinância;
AO: acridina Orange;
BB: Botu-Bov®;
CASA: Análise computadorizada do movimento espermático;
CDFA: diacetato de carboxifluoresceína;
CI: células íntegras;
CONC: concentração espermática;
DIC: microscopia de interferência diferencial;
DMAI: defeitos maiores;
DMEN: defeitos menores;
DNA: ácido desoxirribonucleico;
ECP: Cipionato de estradiol;
FITC-PSA: Isothiocionato de fluoresceína associado a aglutinina do *Pisum sativum*;
IA: inseminação artificial;
IDF: índice de fragmentação de DNA;
IMP: Integridade da membrana plasmática;
mL: Mililitro;
mM: miliMol;
MP: Motilidade progressiva;
MPAI: Membrana plasmática e acrossomal íntegras;
MPAL: Membrana plasmática e acrossomal lesadas;
MPIAL: Membrana plasmática íntegra e acrossomal lesada;
MPLAI: Membrana plasmática lesada e acrossomal íntegra;
MT: Motilidade total;
N₂L: Nitrogênio líquido;
pH: concentração de ions de Hidrogênio;
PI: Iodeto de Propídeo;
RAP: Espermatozoides com movimento rápido;
ROS: Espécies reativas de oxigênio;
SAS: Statistical Analysis System (Sistema de Análise Estatística);
Tris-gema: Tris (hidroximetil-aminometano) gema de ovo-frutose;

VAP: velocidade ao longo de uma trajetória média;

VCL: Velocidade curvilinear;

VOL: volume;

VSL: velocidade progressiva;

μL : Microlitro;

Sumário

SUMÁRIO

Lista de Tabelas	IX
Lista de Figuras	XI
Lista de Abreviaturas	XIII
Resumo	XIX
Abstract	XXI
1. Introdução	02
2. Revisão de Literatura	05
2.1. Criopreservação.....	05
2.2. Diluidores de Sêmen	07
2.3. Colheita do Sêmen	10
2.4. Avaliação do ejaculado	10
2.4.1. Volume	10
2.4.2. Cor e Densidade	11
2.4.3. Motilidade	11
2.4.4. Análise computadorizada do sêmen (CASA)	12
2.4.5. Concentração espermática	12
2.4.6. Viabilidade e Morfologia	13
2.5. Citometria de Fluxo	14
2.5.1. Viabilidade e Integridade Acrossomal	15
2.5.2. Lesões semelhantes à capacitação	16
2.5.3. Avaliação da Cromatina (fragmentação do DNA)	16
3. Objetivo	19
3.1. Objetivo Geral	19
3.2. Objetivos Específicos	19
4. Material e Métodos	21
4.1. Local do experimento.....	21
4.2. Animais	21
4.3. Alimentação.....	21
4.4. Colheita de sêmen	21
4.5. Análises do Ejaculado.....	22
4.6. Congelação e Descongelção do sêmen	23
4.7. Citometria de Fluxo	24
4.7.1. Integridade das membranas plasmáticas e Acrossomal	24
4.7.2. Lesões semelhantes à Capacitação	24
4.7.3. Cromatina	25
4.8. Análise estatística	25
5. Resultados	27
6. Discussão	35

7. Conclusões	41
8. Bibliografia	43
9. Anexos	60
10. Artigo científico.....	62
Normas da revista	76

Resumo

ZORZETTO, M. F. **Avaliação do sêmen de búfalos em três meios de criopreservação.** Botucatu, 2013. 100p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

Os programas que visam aumentar a incorporação de biotecnologias reprodutivas a fim de se obter um incremento genético dos rebanhos bubalinos, visando aumentar a produtividade dos mesmos. No entanto, a melhoria do sistema produtivo e reprodutivo será possível mediante a utilização de tecnologias que viabilizem o melhor aproveitamento dos animais, como a congelação de sêmen. Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a qualidade das amostras seminais de búfalos diluídas em três meios diferentes: Botu-bov[®] (BB), água de coco em pó (ACP-111) e Tris-gema antes e após a criopreservação utilizando o mesmo protocolo. No presente estudo foram utilizados 4 touros bubalinos para colheitas seminais utilizando vagina artificial, os ejaculados foram diluídos com BB, Tris-gema e ACP-111. O sêmen fresco foi analisado quanto ao seu volume, aspecto, cor, concentração (câmara de Neubauer), morfologia realizada por microscopia de interferência diferencial (DIC), cinética pelo sistema CASA e pela microscopia de epifluorescência. Na pós-congelação as amostras foram avaliadas pelo CASA, citometria de fluxo (membrana plasmática, acrossoma, lesões semelhantes à capacitação e fragmentação do DNA) e pela microscopia de epifluorescência. Os diluentes BB e Tris-gema apresentaram melhores resultados para congelação do sêmen de búfalos, em relação ao meio ACP-111 (BB 58,59%; Tris-gema 52,64% e ACP-111 36,94% para MT). Porém o diluente BB demonstrou superioridade em relação à motilidade progressiva espermática (MP para BB, Tris-gema e ACP-111, 47,56%; 40,39% e 29,59% respectivamente), menor porcentagem de índice de fragmentação de DNA (0,85%) e de espermatozoides lesados (24,97%). Assim sendo, mediante o protocolo do presente estudo deduz-se que o BB apresenta superioridade na congelação de sêmen de búfalos, sendo este a melhor opção de diluente para essa biotecnologia.

Palavras chave: Sêmen, Criopreservação, Búfalos, Reprodutores.

Abstract

ZORZETTO, M. F. **Evaluation of buffalo semen cryopreservation in three ways.** Botucatu, 2013. 100p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

These programs aim to increase the incorporation of reproductive biotechnologies in order to obtain a genetic increment of buffalo herds to increase their productivity. However, improving the productive and reproductive system will be possible through the use of technologies that enable the best use of animals, such as semen freezing. Therefore, this study aimed to evaluate the quality of semen samples of buffalo diluted in three different extenders: Botu-bov ® (BB), powdered coconut water (ACP-111) and Tris-yolk before and after cryopreservation using the same protocol. In the present study was used four buffalo bulls for seminal collection using artificial vagina. The ejaculates were diluted with BB, Tris-yolk and ACP-111. The fresh semen was analyzed for volume, appearance, color, concentration (Neubauer chamber), morphology performed by differential interference microscopy (DIC), the kinetic by CASA system and membrane integrity by epifluorescence microscopy. In the post-freeze moment the samples were evaluated by CASA, flow cytometry (plasma membrane, acrosome, lesions similar to capacitation and DNA fragmentation) and by epifluorescence microscopy. The extenders BB and Tris-yolk showed superior results for semen freezing of buffalo in relation to the ACP-111 (BB 58,59%; Tris-yolk 52,64% e ACP-111 36,94% for MT). However the diluent BB demonstrated superiority for progressive sperm motility (MP for BB, Tris-yolk and ACP-111, 47,56%; 40,39% e 29,59% respectively), lower percentage of DNA fragmentation (0,85%) and lower percentage of damaged sperm (24,97%). Thus, through the protocol of this study it shows that the BB has superiority in semen freezing of buffalo, appearing to be the best option of extender for this biotechnology.

Keywords: Semen, Cryopreservation, Buffalos, Breeder.

Introdução

1. Introdução

O rebanho bubalino brasileiro possui em torno de 1,18 milhão de cabeças, sendo que a maior parte do rebanho está situada na região norte (aproximadamente 60%), especificamente, no estado do Pará (aprox. 457 mil cabeças), na região sul encontram-se 124 mil cabeças (17%) e os demais 23% estão divididos em pequenos núcleos nas demais regiões (ANUALPEC, 2012).

A importância da espécie bubalina está ligada a sua dupla habilidade de produção (carne e leite) e a sua força de tração, levando notoriedade à espécie no cenário econômico mundial e a investimentos em programas tecnológicos semelhantes aos aplicados em bovinos. Estes programas visam aumentar a incorporação de biotecnologias reprodutivas a fim de se obter um incremento genético dos rebanhos bubalinos existentes no país e aumento da produtividade dos mesmos.

Esses animais também possuem importância por serem explorados em pequenas propriedades onde geram ganhos substanciais mostrando relevante instrumento de progresso (BERNARDES, 2007). Segundo este autor, além do Brasil possuir o maior rebanho da espécie no Ocidente, dispõe de animais com genética superior tanto para corte como para leite, com performances mais expressivas que as existentes nos países de origem.

O incremento no desempenho reprodutivo e produtivo dos rebanhos brasileiros é necessário para atender a constante demanda crescente por alimento de origem animal. No entanto, a melhoria do sistema produtivo e reprodutivo só será possível mediante a utilização de tecnologias modernas que viabilizem o melhor aproveitamento dos animais.

Deste modo, a implantação de técnicas reprodutivas torna-se importante, uma vez que possibilita a disseminação de genes superiores entre a espécie, alcançando a melhoria no desempenho dos animais.

Portanto, o principal objetivo de todas as análises de sêmen é obter precisão, de forma objetiva, rápida e barata podendo prever a fertilidade da amostra (GILLAN et al., 2005). Os espermatozoides são células que requerem o cumprimento de uma série de critérios a fim de alcançar a fertilização, por exemplo: a realização do estado de hiperatividade (hiperativação), apresentar o acrossoma intacto, ser capaz de atingir a capacitação, apresentar DNA normal e ser capaz de se ligar a zona pelúcida, entre outros. Dentre os métodos que podem ser utilizados para essas avaliações destacam-se a citometria de fluxo, sendo uma técnica capaz de fazer avaliações em células isoladas, o

sistema Computer Digital Image Analysis (CASA) para a avaliação da cinética espermática, a microscopia de interferência diferencial (DIC) para a avaliação da morfologia espermática e de epifluorescência para a avaliação da integridade de membrana.

Embora haja estudos em relação à criopreservação do sêmen, ainda existe muita controvérsia em relação aos melhores diluidores, crioprotetores e métodos de congelamento e descongelamento na espécie bubalina. Os espermatozoides, geralmente, sofrem lesões durante o processo de criopreservação, demonstrando a necessidade de diluentes que promovam maior proteção da célula durante esse processo.

Em virtude disso, a presente pesquisa foi baseada na hipótese de que os meios Botu-bov[®] e Tris-gema apresentariam melhores resultados como diluentes no sêmen de búfalos em relação ao meio ACP-111.

Revisão de Literatura

2. Revisão de literatura

2.1 Criopreservação

Os princípios básicos da criopreservação do sêmen são a suspensão do metabolismo e a manutenção das características espermáticas por um período prolongado de tempo (AMANN e PICKETT, 1987).

A qualidade do sêmen congelado é um dos fatores que afeta a probabilidade de concepção (SAACKE, 1984). O uso do sêmen congelado na inseminação artificial foi relatado em uma escala limitada em búfalos, por causa da má congelabilidade e fertilidade do sêmen nessa espécie, quando comparado com o bovino (KAKAR e ANAND, 1981; MUER et al., 1988; RAIZADA et al., 1990; SINGH e PANT 2000; ANDRABI et al., 2001, 2008; AHMAD et al., 2003; SENATORE et al., 2004; KUMARESAN et al., 2005).

O processo de criopreservação requer que os espermatozoides sejam submetidos à refrigeração moderada e controlada, visando preservar a função dessas células, que é a fecundação do ovócito (HOLT, 2000). O controle na redução da temperatura diminui a possibilidade de perda da viabilidade celular, por diminuir a formação de cristais de gelo no interior da célula espermática (KUMAR et al., 2003).

Suarez (1998) relatou que em torno de 50% dos espermatozoides em amostras normais foram lesados durante as etapas de criopreservação, havendo assim, necessidade da utilização de maior número de espermatozoides na inseminação com sêmen congelado quando comparado a amostras de sêmen fresco.

As principais injúrias celulares relacionadas ao choque frio ocorrem entre 15° a 5°C (STORNELLI et al., 2005; WATSON, 2000), levando a queda significativa na motilidade espermática e atividade metabólica (BLACKSHAW e SALISBURY, 1957).

O termo choque térmico define um conjunto de alterações ocorridas na célula espermática de mamíferos submetida à refrigeração rápida da temperatura corpórea ($\pm 38\text{ }^{\circ}\text{C}$) às temperaturas próximas a $5\text{ }^{\circ}\text{C}$, resultando no decréscimo da motilidade espermática, assim como em mudanças na bioquímica e no funcionamento destes gametas (WATSON, 2000).

Outras alterações críticas que podem ocorrer na criopreservação é o “efeito solução”, caracterizado pela desidratação excessiva da célula, elevada concentração de solutos, modificação do pH e consequente alteração na função dos espermatozoides (FAHY, 1980).

O ponto crítico é em torno de -3°C e -10°C , neste momento ocorre a formação de cristais de gelo e liberação de calor latente de fusão, o que acarreta aumento da temperatura no sistema e maiores injúrias celulares (WATSON, 2000).

Neste período, ocorre mudanças no gradiente osmótico entre os meios intra e extracelular, alterando o equilíbrio e desse modo acontece a desidratação celular. Neste ponto, a taxa de congelação deve ser lenta, para evitar a congelação da água intracelular. A perda de água e a desidratação são eventos desejáveis, por reduzir a probabilidade de formarem canais de gelo intracelulares que causam danos as estruturas internas, assim como a membrana plasmática (SQUIRES, 1999).

Desta forma, torna-se estritamente necessária a descongelação na mesma intensidade, de forma lenta, para que a célula, ao ser reidratada, não sofra rompimentos das membranas biológicas pela rápida reconstituição do volume intracelular (CRESPILHO, 2010).

O processo de congelação rápida, aliado à descongelação lenta, implicará danos causados pela formação de pequenos cristais de gelo, os quais podem se agrupar formando grandes cristais, que rompem a membrana (WATSON, 2000).

As diferenças entre as espécies quanto à fragilidade do seu espermatozoide ao processo de refrigeração são largamente atribuídas às variações na composição da membrana plasmática. A sensibilidade da membrana em se submeter às transições durante a refrigeração é inversamente relacionada com a proporção de colesterol presente. Também está relacionada com a quantidade de ácidos graxos saturados e insaturados presente, sendo que, elevados índices de ácidos graxos saturados imprimem maior susceptibilidade a danos a membrana (DROBNIS et al., 1993).

Segundo Raizada et al. (1990) e Andrabi et al. (2008) há fatores específicos bioquímicos que afetam a capacidade dos espermatozoides para evitar os danos provocados pelos procedimentos criogênicos. Uma das muitas causas possíveis de menor congelabilidade do sêmen de búfalos em comparação com o bovino pode ser devido às diferenças na quantidade de lipídeos nos espermatozoides (JAIN e ANAND, 1976; TATHAM, 2000). Por exemplo, a fosfatidilcolina que compõe aproximadamente 66% de todos os fosfolipídeos encontrados na membrana plasmática dos espermatozoides de búfalos (CHESHMEDJIEVA e DIMOV, 1994), está presente apenas ao redor de 50% na membrana do espermatozoide bovino (PARKS et al., 1987). Do mesmo modo, fosfatidiletanolamina que corresponde a aproximadamente 23% de todos os

fosfolipídeos presentes na membrana plasmática dos espermatozoides bubalinos (CHESHMEDJIEVA e DIMOV 1994), corresponde há apenas 10% na membrana do espermatozoide bovino (PARKS et al., 1987).

Segundo Ladha (1998), a membrana plasmática de espermatozoides é rica em fosfolipídeos e fisiologicamente assimétrica, com fosfatidilcolina e esfingomielina localizadas no folheto externo da bicamada lipídica, enquanto fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina encontram-se situadas no folheto interno. Durante a criopreservação, a membrana plasmática sofre modificações para se adequar às mudanças de temperatura, como o movimento de translocação de fosfolipídeos, com externalização da fosfatidilserina. Transformações ocorridas nas membranas espermáticas durante o procedimento de congelação/descongelação assemelham-se às alterações fisiológicas da capacitação (SILVA et al., 2009a).

Segundo Thomas et al. (2006), semelhante à capacitação, a criopreservação provoca na membrana plasmática um estado de maior fluidez e exposição de sítios de ligação à moléculas externas, requerendo menor tempo para a célula se capacitar.

Neid et al. (2002) observaram que a célula espermática de equinos, quando congelada/descongelada, sofre maior ação da peroxidação lipídica do que a célula refrigerada, ou não exposta à criopreservação. Estes resultados também foram encontrados no sêmen de bubalinos (KADIRVEL et al., 2009).

Os protocolos para criopreservação do sêmen bovino geralmente incluem o resfriamento do sêmen à 4 a 5°C, seguido por um intervalo variável de equilíbrio (de 30 minutos a 24 horas) sob temperatura de refrigeração e posteriormente a congelação seminal (LEITE et al., 2010).

Estudando a utilização de 4 ou 18 horas de tempo de equilíbrio em sêmen de touros holandeses, Foot et al. (2001) chegaram à conclusão de que 4 horas foram suficientes para o sêmen refrigerado tornar-se equilibrado e oferecer uma boa congelação/descongelação e sobrevivência dos espermatozoides.

O período de equilíbrio varia de acordo com a espécie animal, com o protocolo de congelação/descongelação e também segundo o meio diluente utilizado (CHACUR, 1996).

2.2 Diluidores de Sêmen

A primeira etapa envolvida na criopreservação é a diluição do sêmen em meios específicos, evitando-se os efeitos deletérios (FOOTE, 1982).

A diluição do sêmen é importante por: permitir uma proteção efetiva do sêmen com antibióticos, minimizando a possibilidade de transmissão de patógenos ou de organismos potencialmente patogênicos; prolongar a sobrevivência dos espermatozoides e protegê-los de condições ambientais desfavoráveis; aumentar o volume ejaculado; reduzir os efeitos tóxicos dos subprodutos do metabolismo espermático e possibilitar a avaliação apropriada da motilidade espermática individual, evitando, ao mesmo tempo, a aglutinação dos espermatozoides (BITTENCOURT, 2009).

Porém, os diluidores e crioprotetores podem causar danos irreversíveis aos espermatozoides se a estrutura físico-química da célula for afetada, diminuindo assim a motilidade e a capacidade fecundante (PICKETT et al., 1987).

Os agentes crioprotetores mais utilizados são: gema de ovo, glicerol e açúcares, sendo empregados em diferentes porcentagens de acordo com a composição dos diluidores (CHACUR, 1996).

A gema de ovo é um dos ingredientes importantes dos crioprotetores de sêmen, pois protege as membranas celulares contra o choque térmico e impede ou restaura a perda de fosfolípidos da membrana do espermatozóide (YADAV, 2010).

Rasul et al. (2000) realizaram um estudo para identificar o tampão apropriado para a criopreservação de sêmen de búfalo. Os tampões testados foram Tris-citrato de sódio, ácido Tris-cítrico, Tris-Tes ou Tris-Hepes. Os autores observaram que Tris-citrato tendia a ser superior por melhorar as características do movimento dos espermatozóides.

Oba et al. (1994) e Chacur et al. (1997) relataram que o TES tem valor igual ao Tris-base em relação a pós-descongelção, quando avaliaram a motilidade, retenção do acrossoma e integridade da membrana.

Com a utilização de um meio diluente glicina-gema e congelando ejaculados de búfalos, Roy et al. (1956) mantiveram na pós-descongelção, motilidade média de 80%, em relação à motilidade inicial das amostras a fresco, resultado tido como satisfatório pelos autores.

No Brasil, Vale et al. (1984) utilizaram três animais Murrah, com idades entre dois a oito anos, dos quais foram congelados ejaculados com os meios à base de TRIS e TES, alcançando uma taxa de concepção média de 57,1%, para ambos os diluidores.

Fritsch (1994) trabalhando com os meios à base de TRIS e TES, em três tempos de equilíbrio, concluiu que os dois diluidores são adequados na manutenção da

viabilidade espermática do sêmen bubalino, demonstrando que o diluidor TES proporcionou resultados superiores de viabilidade pós-criopreservação, com os melhores tempos de equilíbrio entre cinco e meia e sete horas.

Segundo Barnabé et al. (1996) com a utilização dos diluentes TRIS, TES-TRIS e glicina, a motilidade progressiva pós-descongelação apresentou médias de 30, 40 e 50%, respectivamente, valores esses obtidos de 30 ejaculados oriundos de um reprodutor da raça Murrah.

Em animais da raça Mediterrânea, no Brasil, Oba et al. (1993) descreveram a utilização do diluidor TES, demonstrando que a motilidade espermática apresentou um comportamento semelhante antes e após a diluição. Achados similares foram descritos por Chacur (1996) com búfalos da raça Murrah utilizando o mesmo diluidor. Este mesmo autor, testando os tempos de equilíbrio de uma, duas, três e quatro horas não observou diferença no vigor e motilidade espermática pós-congelação usando os diluentes TES, Glicina-Gema e Triladyl, concluindo que estes diluidores foram adequados para criopreservação do sêmen bubalino.

Crespilho (2010) relatou que os diluidores TRIS e Botu-Bov[®] foram mais efetivos para a congelação do sêmen de touros, mostrando-se mais vantajosos em relação ao meio Botu-Bov[®] a base de lecitina de soja (BB-L) pela produção de um maior número de amostras seminais adequadas para a utilização em programas de IA.

O meio de congelação ACP[®] consiste em um pó fino, uniforme e desidratado formulado de água de coco obtida após a seleção dos frutos, colheita do endosperma líquido e submissão ao processo de desidratação (SILVA et al., 2000). Existem diferentes formas de ACP[®], cada uma ajustada de acordo com o propósito do pH e osmolaridade resultante de cada meio. O ACP-111[®] foi desenvolvido especialmente para a conservação de sêmen bovino (MACHADO, 2010), contudo já foi testado na conservação de sêmen ovino (MACHADO et al., 2006), caprino (SALGUEIRO et al., 2002), equino (SAMPAIO NETO et al., 2002), suíno (TONIOLLI et al., 2009) e canino (CARDOSO et al., 2005), além disto também foi utilizado como meio de maturação de oócitos caninos (SILVA et al., 2000).

Os diluentes Botu-Bov[®] e ACP-111[®] até o momento da realização do presente estudo não foram testados em sêmen de búfalos.

2.3 Colheita do Sêmen

O sêmen pode ser colhido por meio de eletroejaculação, vagina artificial e massagem das glândulas sexuais anexas e é obtido com um tubo graduado de 15 ml de plástico, a fim de facilitar a mensuração do volume. Deve-se cobrir o tubo com um protetor para evitar contato com os raios UV e as mudanças bruscas de temperatura que afetam o sêmen (NORDIN et al., 1990).

Segundo Alvarez (2003) e Koonjaenak e Rodriguez (2007) a melhor forma de se obter amostras de sêmen de búfalo é utilizando uma vagina artificial, com temperatura entre 40 °C e 42 °C. O touro búfalo é, talvez, um dos machos domésticos mais facilmente treinados para colheita de sêmen, especialmente com vagina artificial, e geralmente, o touro bubalino ejacula dentro da vagina já na primeira tentativa.

Sansone (2000) relatou que duas colheitas sucessivas a cada 3-4 dias a partir dos 30 meses de idade produz maior volume de ejaculado e produção de espermatozoides. Nesse aspecto, Vale (2006) observou que um touro búfalo que tenha esgotado as suas reservas por excesso de serviços sexuais, precisa de cerca de uma semana para repor sua reserva. Quando os búfalos machos permitem o serviço uma vez ou duas vezes por dia durante curtos períodos, o descanso noturno é suficiente para restaurar o número original de espermatozoides.

De acordo com Vale (2006) não há evidência de que a fertilidade é reduzida pela frequência de ejaculações. Os touros bubalinos podem servir diariamente e ainda em maior frequência durante períodos limitados, mantendo um elevado nível de fertilidade. O macho bubalino pode ser subfêtil, durante períodos de 1 a 4 semanas após estresse causado por febre, calor ou doenças agudas.

2.4 Avaliação do ejaculado

2.4.1. Volume

O volume de sêmen deve ser medido imediatamente após a colheita. Varia dependendo da raça, idade, tamanho, números de saltos, métodos de colheita, nutrição do animal, saúde e ambiente (NAZIR, 1988). Vale (1994) e Almaguer et al. (2007) sugeriram que em touros na puberdade o volume é de cerca 1 mL e de 3 mL após atingirem a maturidade.

Koonjaenak e Rodriguez (2007) encontraram o volume de 3-4 mL em ejaculados de búfalos da raça Nili-Ravi, que é semelhante ao descrito por Sajjad et al. (2007). O

volume de ejaculado varia dependendo da idade do touro, encontrando-se um aumento de volume entre 4 a 12 anos (PANT et al., 2003). Corroborando para esses achados, Nordin et al. (1990) encontraram um maior volume de ejaculado em touros adultos do que nos jovens. De forma oposta, Javed et al. (2000) não encontraram diferenças significativas no volume de sêmen de touros em diferentes idades.

2.4.2 Cor e Densidade

A cor do ejaculado pode variar caso haja urina, sangue ou pus presente, ou ainda, devido à dieta do animal. A coloração pode variar desde um acinzentado até o amarelo citrino (HAFEZ, 2004).

A densidade do sêmen depende das variações na concentração de espermatozoides. Sêmen geralmente varia do branco leitoso ao creme, com a densidade do sêmen variando de um aquoso, leitoso, leitoso-cremoso, até cremoso (CANIZALES, 2011).

Vale (1994) encontrou diferenças significativas na densidade entre espermatozoides íntegros ou lesados. Koonjaenak e Rodriguez (2007) encontraram diferenças significativas na cor e densidade no sêmen do reprodutor bubalino e estas foram afetadas pela idade dos touros.

2.4.3 Motilidade

A motilidade segundo Barth (2000) é o resultado da avaliação do movimento do espermatozoide. Esta avaliação é efetuada numa lâmina perfeitamente limpa com uma gota de 3 a 4 mm de sêmen e coberto com uma lamínula. Deve-se observar em objetivas de 20X ou 40X, de preferência em microscópio de contraste de fase, e os resultados são expressos em percentagem (0% a 100%).

Sajjad et al. (2007) em touros da raça Nili-Ravi entre 12 e 15 anos encontraram uma motilidade de $51,53 \pm 2,23\%$, resultados similares foram encontrados por Javed et al. (2000) em búfalos da mesma raça e faixa de idade ($56,89 \pm 0,65\%$). Contrariamente, Suryaprakasam e Rao (1993), Kumar et al (1993) e Younis (1996) relataram uma motilidade ($> 60\%$) na raça Murrah e Nili-Ravi.

Koonjaenak e Rodriguez (2007) relataram uma motilidade individual progressiva dos espermatozoides de 65% para 80% em touros búfalo Nili-Ravi, de 6 a 18 anos.

Aguiar et al. (1994) encontraram $78,6 \pm 5,6\%$ de espermatozoides móveis nos estados brasileiros de Minas Gerais e Bahia.

A diferença na motilidade dos espermatozoides pode ser devido à época de amostragem do sêmen e à leitura subjetiva. A avaliação subjetiva da motilidade dos espermatozoides é realizada rotineiramente. O resultado depende muito da experiência do operador, o que implica em uma variação entre as estimativas adequadas para os problemas de fertilidade (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 2003). Para reduzir esta variação, se desenvolveu ao longo das últimas duas décadas um método computadorizado Computer Assisted Sperm Analysis (CASA; SANSONE et al., 2000).

2.4.4 Análise Computadorizada do Sêmen (CASA)

Técnicas tradicionais de avaliação da motilidade em massa, porcentagem de motilidade e progressiva, apesar de serem comuns e rápidas, e o equipamento exigido ser simples, tem um forte caráter subjetivo, porque estão sujeitas a interpretações e examinadores diferentes (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2003).

A grande vantagem do CASA está em ser "objetivo", avaliar a motilidade do espermatozoide e também diversos outros parâmetros da cinética espermática (JANUSKAUSKAS et al., 1999, HALLAP et al., 2004). O sistema CASA permite a detecção de alterações do movimento espermático e melhorou a qualidade dos estudos em laboratórios.

A técnica CASA utiliza um *software* que analisa e grava cada característica do movimento espermático, facilitando a comparação de resultados entre diferentes laboratórios e possibilitando diagnosticar as mais sutis diferenças entre reprodutores ou tratamentos (CONTRI et al., 2010). Este detalhamento da cinética celular proporcionada pelo CASA reflete diretamente na qualidade de análise dos espermatozoides presentes em uma amostra seminal (FARREL et al., 1996).

O movimento espermático corresponde a uma das características mais importantes associadas ao potencial de fertilização de uma amostra, reportando-se uma clara associação entre a ausência de movimento e os quadros de infertilidade (OLDS-CLARKE, 1996).

2.4.5 Concentração Espermática

O número de espermatozoides é expresso em milímetros cúbicos, para se determinar tal número são usados métodos tais como: contagem em câmara de

Neubauer e espectrofotometria (PANT et al., 2003.). A concentração espermática tem grande variação (600 - 1500 milhões de células por mL) e este parâmetro é afetado por condições sazonais, nutricionais e a idade dos búfalos reprodutores (LOHACHIT, 1984).

Medições mais rotineiras da concentração são feitas por um espectrofotômetro. Em búfalos criados na Bahia (Brasil) foram observadas concentrações de $1166,3 \pm 17,5 \times 10^6$ espermatozoides/mL (AGUIAR, 1994). Em búfalos da raça Murrah criados na Índia, Kumar et al., (1993) encontraram concentrações de $524,1 \pm 20,7$ - $1031,4 \pm 28,7 \times 10^6$ espermatozoides/mL. Resultados semelhantes foram observados por Rattan (1990) na raça Nili-Ravi, Koonjaenak e Rodriguez (2007).

Javed et al. (2000) observaram menores concentrações de espermatozoides em búfalos mais velhos comparados com animais mais jovens. No entanto, Younis (1996) não encontrou nenhuma diferença significativa na concentração de espermatozoides entre búfalos jovens e velhos.

2.4.6 Viabilidade e Morfologia

O teste de viabilidade avalia a percentagem de espermatozoides com membrana íntegra ou lesada em um ejaculado e avalia a integridade da membrana plasmática do espermatozoide. O corante preferivelmente usado é eosina-nigrosina. Em um eppendorf previamente aquecido a 37-38 °C, mistura-se 5 µL de sêmen com 15 µL de corante (eosina-nigrosina) e deixa-se em repouso durante 30 segundos. Elabora-se um esfregaço e deixa-se secar ao calor, observado em microscopia óptica de luz com ampliação de 40x. Os espermatozoides vivos e com membrana plasmática intacta não permitem a passagem de eosina para dentro da célula e ficará de cor transparente no microscópio, enquanto que os espermatozoides mortos, com a perda funcional da região da membrana, permite a passagem do corante e é observado de cor roxa. O valor mínimo considerado aceitável é de 70% de espermatozoides vivos (KOONJAENAK et al., 2007).

A morfologia espermática avalia a percentagem de espermatozoides normais e anormais em uma dada amostra. Palacios (2005) observou que a morfologia dos espermatozoides é um fator determinante na capacidade de fertilização do espermatozoide, uma vez que existe uma correlação entre os defeitos do espermatozoide e a infertilidade.

Os espermatozoides podem conter alguns defeitos de conformação, estas alterações são devido à espermiogênese defeituosa, sendo por herança, enfermidade, estresse por calor ou frio, exposição a condições ambientais adversas, repouso sexual prolongado (mais de 60 dias), e técnicas inadequadas de manipulação do sêmen (SAEED et al., 1994).

A maioria dos estudos que avaliaram anormalidades acrossomais foram realizados utilizando a coloração de Giemsa (RAMAKRISHNAN e ARIFF, 1994). Mais de 90% dos espermatozoides foram observados com acrossoma intacto em touros da raça Murrah, em que o sêmen foi avaliado com o corante Giemsa (AGUIAR, 1994; KUMAR, 1993). Talevi et al. (1994) reportaram resultados semelhantes utilizando a fluorescência lectina.

Em estudos de Saeed et al. (1994) em touros da raça Murrah, a maior parte das alterações foram encontradas na cabeça do espermatozoide ($5,78 \pm 2,1\%$), enquanto que as anormalidades de peça intermediária foram menor que 1% e outras anormalidades variaram de $3,92 \pm 1,0\%$ a $5,7 \pm 0,4\%$. O aparecimento de gota citoplasmática foi inferior a 1%. Proporções semelhantes de anormalidades foram observadas no sêmen de búfalos da raça Murrah do Brasil (AGUIAR et al. 1994, KUMAR, 1993).

Sajad et al. (2007) em touros da raça Nili-Ravi com idade entre 12 a 15 anos mostraram alterações de $11,67 \pm 0,90\%$, resultados semelhantes foram encontrados por Saeed (1990).

Koonjaenak e Rodriguez (2007) encontraram menos de 15% de anormalidades em espermatozoides de búfalos, onde a anormalidade mais comum foi à cabeça piriforme, seguida de acrossomas Knobbed, que é a presença de um grânulo no acrossomo, sendo de origem hereditária e está ligado diretamente com a infertilidade do animal quando encontrado em grande quantidade. A terceira anormalidade mais encontrada foi à gota citoplasmática proximal e em seguida caudas dobradas, estes resultados foram detectados por contraste de fase em microscopia de luz. Além disso, determinaram que a idade do búfalo reprodutor tem efeito significativo sobre a incidência geral de anormalidades de cabeça, defeitos do acrossoma, gota citoplasmática proximal e defeitos de cauda totais.

2.5 Citometria de Fluxo

Os espermatozoides são células que requerem cumprir determinadas etapas a fim de alcançarem a fertilização, por exemplo: entrar em estado de hiperatividade

(hiperativação), acrossoma estar intacto, atingir a capacitação, o DNA estar íntegro e ter a capacidade de se ligar a zona pelúcida, entre outros. Dentre os métodos que podem ser utilizados para essas avaliações destaca-se a citometria de fluxo, sendo uma técnica capaz de fazer medições em células isoladas.

O citômetro de fluxo tem resultado rápido em todas as subpopulações dentro de uma amostra, tornando-o ideal para a avaliação de populações heterogêneas, tais como espermatozoides. Essa metodologia, além de ser utilizada para as análises espermáticas, também realiza a sexagem do sêmen, ou seja, a separação dos espermatozoides que carregam dos cromossomos X e Y (GILLAN et al., 2005).

2.5.1 Viabilidade e Integridade Acrossomal

Na avaliação da integridade de membrana as sondas mais utilizadas são as de iodeto de propídio (PI) e etídio homodímero (EH), marcando a viabilidade. Esses corantes ao entrarem nas células com o plasmalema danificado emitem fluorescência vermelha quando há ligação de ácidos nucleicos (PI: 636 nm; EH: 617 nm) (GILLAN et al., 2005). Segundo Garner et al. (1986) outras sondas podem ser usadas para avaliar a viabilidade, emitindo fluorescência verde ao entrar em células metabolicamente ativas (por exemplo, diacetato de carboxifluoresceína).

O uso das lecitinas, que se ligam a resíduos glucosídicos em diferentes partes da membrana acrossomal, tem sido demonstrado com a mesma finalidade em uma ampla gama de espécies. *Pisum sativum* (ervilha) aglutinina (PSA) (TAO et al., 1993) e *Arachis hypogaea* (amendoim) aglutinina (PNA) (TAO et al., 1993; THOMAS et al., 1997; NAGY et al., 2003; MARTÍNEZ-PASTOR et al., 2005) têm sido as lecitinas mais utilizadas para as análises do acrossoma, devido à sua especificidade.

Sondas acrossomais são geralmente conjugadas com um fluorocromo que emite fluorescência verde, como a fluoresceína de isotiocianato (FITC), e combinado com a viabilidade ou corantes PI e EH. Atualmente, eles estão disponíveis conjugados com fluorocromos emitindo comprimentos de onda diferentes. Por exemplo, Nagy et al. (2003) propuseram o uso conjugado de PNA com o fluorocromo ficoeritrina laranja (PE-PNA), que provido entre o verde SYBR-14 e o vermelho PI, tem sido utilizado com sucesso conjugado com o fluorocromo laranja tetrametilrodamina isotiocianato (TRITC), em uma coloração tripla com YO-PRO® -1 e MitoTracker® Deep Red FM (DOMÍNGUEZ-REBOLLEDO et al., 2010).

2.5.2 Lesões semelhantes à capacitação

A capacitação espermática é um requisito necessário para que ocorra a fertilização e resulta em alterações na membrana plasmática as quais tornam os espermatozoides capazes de efetuar a reação acrossomal, que, em condições fisiológicas, ocorre durante exposição a uma glicoproteína que compõe a zona pelúcida do ovócito (BLEIL e WASSARMAN, 1983; GADELLA et al., 2008).

Assim, muitas técnicas de fluorescência foram adaptadas para citometria de fluxo, para medir as mudanças neste evento. A coloração com clorotetraciclina é a técnica mais apropriada e representativa na detecção da capacitação em espermatozoides (WARD e STOREY, 1984).

Merocyanine 540 (M540) tem sido utilizada como uma alternativa para a detecção de capacitação (HARRISON et al., 1996). No entanto, sua utilidade tem sido questionada, pois pode detectar células com membrana degeneradas, além de avaliar sua capacitação (MURATORI et al., 2004). Essa sonda pode ainda ser útil para avaliar a permeabilidade da membrana (PENÃ et al., 2004; FERNANDEZ-SANTOS et al., 2007; CABALLERO et al., 2009). A capacitação envolve mudanças de pH citosólico e aumento dos níveis de cálcio. A capacitação e maturação dos espermatozoides são características reguladas por fosforilação das proteínas.

O processo de apoptose tem sido detectado em espermatozoides com o auxílio da citometria de fluxo (PENÃ, 2007). Um dos passos iniciais da apoptose é a translocação de fosfatidilserina do interior para o exterior do folheto da membrana plasmática, que pode ser detectada pela anexina V. Este marcador, conjugado com FITC, foi analisado pela citometria de fluxo para detectar mudanças sutis na membrana plasmática relacionadas ao processamento de espermatozoides, como a congelção e a descongelção ou outros estresses em várias espécies domésticas [touro: ANZAR et al. (2002); JANUSKAUSKAS et al. (2003); javali: GADELLA e HARRISON (2002), PETRUNKINA et al. (2005); PENÃ et al., (2005a)].

Atualmente, a anexina V está disponível conjugada com uma ampla variedade de fluorocromos.

2.5.3 Avaliação da cromatina (fragmentação do DNA)

A estrutura da cromatina do espermatozoide (proteínas associadas ao DNA) pode ser mensurada por vários métodos, incluindo os ensaios “Tunnel” e Cometa, assim como a citometria de fluxo após tratamento com ácido e coloração dos espermatozoides

com acridina orange (AO). Estes testes avaliam o grau de fragmentação de DNA que ocorre após tratamento químico do complexo DNA-cromatina dos espermatozoides e que pode refletir indiretamente na qualidade do DNA dos espermatozoides (TUREK, 2005).

Espermatozoides com a cromatina danificada podem prejudicar a capacidade dos espermatozoides viáveis de fertilizarem, como também diminuir a fertilização *in vitro* ou o sucesso da inseminação artificial, podendo causar abortamentos, anormalidades fetais e até mesmo reduzir a aptidão da prole (VIRRO et al., 2004). O SCSA[®] (SCSA diagnósticos, Brookings, Dakota do Sul, EUA) é o teste mais difundido para a avaliação da cromatina de espermatozoides por citometria de fluxo. Este teste é relativamente simples de se executar: amostras de espermatozoides são submetidas a uma etapa de desnaturação do DNA, misturado com a solução AO (laranja) e analisados por citometria de fluxo (EVENSON e JOST, 2000).

Acridina orange é um fluorocromo metacromático prontamente intercalado no DNA. A etapa de desnaturação induz a formação de rupturas no DNA, portanto, cada cabeça de espermatozoide analisado pela AO produz uma mistura de fluorescência verde e vermelha quando atingido por um laser de 488 nm, dependendo do índice de fragmentação do DNA e a susceptibilidade à desnaturação da cromatina.

Os dados são processados para obter de cada espermatozoide o total de fluorescência vermelha emitida, indicando o índice de fragmentação do DNA (IDF). Uma série de valores de corte pode ser definida para IDF, para obter a porcentagem de espermatozoides com IDF moderada (de corte em 0,25 IDF) e com alta IDF (de corte em 0,75 DFI).

Esses dados demonstram a necessidade de novas metodologias e diluentes que promovam uma maior proteção da célula durante o processo de criopreservação para minimizar os danos causados durante o processo. Especialmente na espécie bubalina, onde, ainda são poucos os trabalhos referentes à congelação.

Objetivos

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

O presente estudo teve como objetivo avaliar a qualidade das amostras seminais de búfalos diluídas em três meios diferentes: Botu-bov[®], água de coco em pó (ACP-111[®]) e Tris-gema antes e após a criopreservação.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a integridade da membrana dos espermatozoides;
- Comparar a congelabilidade do sêmen bubalino diluído com três diferentes crioprotetores (Botu-bov[®], ACP-111[®] e Tris-gema);
- Avaliar motilidade, motilidade progressiva, velocidade ao longo de uma trajetória média (VAP), velocidade progressiva (VSL), velocidade curvilínea (VCL), percentagem de espermatozoides rápidos (RAP) com o emprego do analisador computadorizado dos movimentos espermáticos CASA, pré e pós-congelamento;
- Avaliar a integridade da membrana pela técnica modificada por Harrison e Vickers (1990), com a associação das sondas fluorescentes diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e iodeto de propídio (IP), nos momentos pré e pós-congelamento;
- Avaliar as alterações morfológicas (defeitos espermáticos) em microscopia de interferência diferencial (DIC);
- Avaliar a integridade do acrossoma, integridade da membrana citoplasmática, lesões semelhantes à capacitação e índice de fragmentação de DNA com o uso da técnica de citometria de fluxo, após a descongelamento das amostras de sêmen;

Material e Métodos

4. Material e Métodos

4.1 Local do experimento

O experimento foi conduzido na Universidade Estadual Paulista, Fazenda Experimental Lageado, FMVZ – UNESP/Botucatu, latitude -22,89° e longitude -48,45°. Os animais permaneceram confinados em piquete coberto com sombrite, cercado com cerca elétrica, contendo bebedouro com fornecimento de água *ad libitum* e comedouro.

4.2 Animais

Dois meses antes do início do experimento sete animais mestiços da raça Murrah foram condicionados a condução por cabresto, estimulação do salto e colheita de sêmen com vagina artificial modelo Botucatu (OBA, 1993). Foi utilizada uma fêmea da mesma espécie e raça como manequim para o momento da colheita; e a estimulação do estro foi induzida com a administração de 2,0 mL via intramuscular de Cipionato de Estradiol - ECP[®]. O cio foi observado 48h após a aplicação do hormônio.

Para o experimento apenas quatro animais dos sete condicionados inicialmente foram colhidos, pois os três animais não apresentaram libido e se recusavam a montar. Os animais utilizados no experimento apresentavam idades de 4, 6 e 7 anos.

4.3 Alimentação

Os sete machos ficaram confinados em baia coletiva e receberam a mesma dieta composta por concentrado comercial (18% PB), sal mineral *ad libitum* e feno (Tifton tipo A). A dieta foi fornecida duas vezes ao dia, pela manhã (8h) e tarde (16h), mantendo sobra diária referente a 5% do fornecido.

4.4 Colheita de sêmen

Previamente ao início do experimento, os animais foram submetidos a um período de adaptação de 30 dias (julho) em que foram condicionados à colheita de sêmen (duas vezes por semana) e ao cabresto, sendo que após este período deu-se início ao experimento. No período experimental também foram realizadas duas colheitas semanais durante um mês com a finalidade de melhorar a qualidade do sêmen. A colheita de sêmen foi realizada com vagina artificial modelo Botucatu com temperatura entre 42 a 46 °C, preconizada por Vale et al. (1984) e Vale (1994). Durante o período experimental foram realizadas 32 colheitas entre os meses de agosto e setembro.

4.5 Análises do Ejaculado

Na avaliação dos ejaculados foram consideradas as características macro e microscópicas, sendo, portanto, as seguintes análises realizadas:

- Mensuração do volume em tubo de ensaio graduado;
- Avaliação visual do aspecto e cor;
- Contagem da concentração espermática utilizando a câmara hematocimétrica de Neubauer, em diluição de 1:200.

Foram utilizados três diluidores para congelação, o meio Tris-gema (30g Tris-[hidroximetilaminometano], 17g ácido cítrico, 12,5g de frutose, 0,20g sulfato de amicacina, 2 mL de Orvum Est Pastum (OEP) e 200mL de gema de ovo para 1000mL da solução); o diluidor Botu-Bov[®] (BB; Botupharma Ltda, Botucatu, São Paulo, Brasil) e o diluidor a base de água de coco em pó ACP -111 (Universidade Estadual do Ceará – UECE).

O diluidor ACP-111 foi preparado com o seguinte protocolo: a água de coco em pó foi diluída em 50 mL de água destilada e acrescentado 20% de gema de ovo. O meio foi centrifugado por aproximadamente 1h e meia, logo após foi separado o sobrenadante e adicionado 7% de glicerol. O diluidor, por fim, foi separado em tubos graduados de 50 mL e mantidos congelados em freezer (-20 °C).

Uma alíquota de sêmen (10 µL) foi colocada em três eppendorfs diferentes, previamente aquecidos em banho seco a 37 °C, e cada amostra foi diluída até se obter concentração de 50×10^6 espermatozoides/mL com os diluentes BB, Tris-gema e ACP-111 para posterior avaliação.

Após a diluição das amostras foi realizada a análise no sistema Computer Digital Image Analysis (CASA) (HTM-IVOS 12; Hamilton-Thorne Research, Danvers, MA, USA) depositando uma alíquota de 10 µL da amostra diluída, em uma câmara de Makler (Makler Counting ChamberR, Sefi-Medical Instruments ltd., Haifa, Israel) pre-aquecida a 37°C. Em cada amostra avaliou-se no mínimo 500 células e as seguintes variáveis foram consideradas: motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), velocidade ao longo de uma trajetória média (VAP, µm/s), velocidade progressiva (VSL, µm/s) velocidade curvilínea (VCL, µm/s) e percentagem de espermatozoides rápidos (RAP, %). Tais análises foram realizadas antes e após a congelação do sêmen.

A avaliação da integridade da membrana (IMP%, espermatozoides viáveis) foi realizada nos momentos antes e após a congelação do sêmen, empregando-se a técnica modificada por Harrison e Vickers (1990) pela associação das sondas fluorescentes diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e iodeto de propídio (IP). Uma amostra de 10 μ L previamente diluída (sêmen + meio de congelação) foi adicionada em 25 μ L da solução de trabalho composta por: 1 mL de citrato de sódio a 2,95%; 10 μ L de formol salino; 10 μ L de carboxifluoresceína e 40 μ L de iodeto de propídio. As amostras foram observadas em lâmina e lamínula na objetiva de 40X por microscopia de epifluorescência e foram contadas 100 células, sendo consideradas íntegras as coradas totalmente em verde, e lesadas as coradas em vermelho ou em verde e vermelho.

Amostras de sêmen fresco (10 μ L de sêmen) foram conservadas em eppendorfs contendo 1,0 mL formol salina em geladeira (4°C) para avaliação da porcentagem de alterações morfológicas dos espermatozoides (cauda, cabeça, acrossoma e peça intermediária) presentes em cada ejaculado com emprego da microscopia de interferência diferencial (DIC, Leica DM 2500). A análise das amostras foi realizada mediante observação em lâmina e lamínula em um aumento de 100X e 100 células foram contadas.

Após a descongelação do sêmen as análises para integridade acrossomal, integridade da membrana, lesões semelhantes à capacitação e índice de fragmentação de DNA foram realizadas através de citometria de fluxo.

4.6 Congelação e Descongelação do sêmen

De acordo com os parâmetros encontrados na concentração e motilidade espermáticas, foram acrescentados os três tipos de diluentes, Tris-gema, Botu-Bov[®] e água de coco em pó (ACP-111[®]), até atingir o volume para padronização da concentração em 50×10^6 espermatozoides por palheta.

O envase foi realizado manualmente em palhetas francesas de 0,5 mL e, essas, submetidas à congelação. Para o procedimento de congelação as mesmas foram distribuídas em um grade telada e resfriadas a 5 °C por quatro horas em geladeira (MiniTub[®]), com uma curva de resfriamento de 3 °C por minuto até estabilizarem a 5 °C.

Decorrido esse período a grade contendo as palhetas foi transferida para uma caixa isotérmica de isopor de 45 litros com 3,5cm de nitrogênio líquido (N₂L), onde foi disposta horizontalmente 3 cm acima do nível do N₂L durante 20 min. Para finalizar a

congelamento das palhetas foi realizada a imersão das mesmas no N₂L. Posteriormente as amostras foram acondicionadas em globetes e conservadas em *container* criogênico a -196 °C.

Para a descongelamento das palhetas realizou-se a imersão das mesmas em banho-maria a 37 °C por 30 segundos. Após a descongelamento foram realizadas as análises para as características anteriormente mencionadas CASA, integridade da membrana (microscópio de epifluorescência) e citometria de fluxo.

4.7 Citometria de Fluxo

Para as análises de citometria de fluxo, foi utilizado o equipamento 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. Os dados foram avaliados por programa do mesmo fabricante BD FACSDiva™ software v6.1. De acordo com as análises descritas a seguir.

4.7.1 Integridade das membranas plasmática e Acrossomal

Para a avaliação da integridade da membrana plasmática e acrossomal foram utilizadas as sondas iodeto de propídio (PI; P4170, Sigma), FITC-PSA (L-0770, Sigma) de acordo com protocolo desenvolvido por Arruda et al. (2003) modificado com a adição do Hoechst (H33342, 100 mg/mL, H-1399, Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, EUA). Assim, numa amostra de 400 µL de sêmen diluído em TALP na concentração de 10x10⁶ espermatozoides/mL foram adicionados 5 µL de H3342 (100µg/mL), 5µL de PI (50µg/mL) e 0.5µL de FITC-PSA (2µg/mL), e então homogenizadas e incubadas por 15 minutos a 37°C ao abrigo da luz.

4.7.2 Lesões semelhantes à Capacitação

Para essa avaliação foram utilizadas as sondas anexina V-FITC Kit de apoptose (6710KK; Pharmingen) e PI de acordo com as recomendações do laboratório, também modificada com a utilização do Hoechst 33342. Assim, alíquotas de sêmen foram diluídas em solução tampão de anexina V (10 mM Hepes/NaOH – pH 7,4 – 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂) a uma concentração de 2x10⁶ espermatozoides/mL; um volume de 100 µL (concentração final de 2x10⁵) desta amostra foi colocado em um tubo de cultura de 5 mL e então acrescido de 5 µL de anexina V-FITC, 5 µL de PI (50 µg/mL) e 5 µL de Hoechst (100µg/mL). A amostra foi homogeneizada e incubada por 15 minutos à 37 °C e então adicionados mais 200 µL de solução tampão de anexina V.

4.7.3 Cromatina

Este ensaio foi realizado como descrito por Evenson (1986), onde uma alíquota de sêmen foi diluída em 200 μ L de uma solução tampão (0,186g de EDTA dissódico, 0,790 g de Tris-HCl, 4,380 g NaCl em 500 mL água deionizada, pH 7,4). Esta foi misturada com 400 μ L de solução de ácido detergente (2,19 g NaCl, HCl 1,0 mL de 2N solução, 0,25 mL Triton-X, qsp. 250 mL de água deionizada). Após 30 segundos, 1,2 mL da solução de acridina orange (AO; 3,8869 g de ácido cítrico mono-hidratado, 8,9429 g Na₂HPO₄, 4,3850g NaCl, 0,1700 g de EDTA dissódico, 4 μ g/mL de solução acridina orange (1 mg/mL), qsp. 500 mL de água, pH 6,0). A amostra foi então coberta com papel-alumínio durante a avaliação. A citometria de fluxo foi realizada em 5 minutos e os dados arquivados em CD para posterior análise através do *software* WinList 6.0 (*Verify software house*).

4.8 Análise Estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo procedimento GLM descrito no SAS 9.2 (2011). E as diferenças entre as médias (médias dos quadrados mínimos) pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($p < 0,05$), tendo considerado as seguintes causas de variações, momento (fresco e pós-congelação) e diluidores (Tris-gema, BB e ACP-111).

Em decorrência de alta variabilidade de algumas das características realizou-se a transformação das mesmas para a raiz quadrada (foram transformadas: anexina positiva e PI positivo [AN+PI+] e células íntegras com anexina positiva [CIAN+] em $\sqrt{x+1}$, para membrana plasmática íntegra e acrossoma lesado (MPIAL), anexina positiva e PI negativo [AN+ PI-] e índice de fragmentação do DNA (IDF) em $\sqrt{x+0,5}$), a fim de levar a normalidade dos dados. Nas tabelas e figuras os dados foram apresentados já transformados.

Resultados

5. Resultados

O volume dos ejaculados nos búfalos utilizados no presente estudo variou entre 3,14 a 4,46 mL.

A Tabela 1 apresenta os valores médios, desvios padrão e coeficiente de variância dos dados analisados (MT, MP e RAP) e a porcentagem de integridade de membrana plasmática (IMP) avaliada pela microscopia de epifluorescência (Figura 1) no momento à fresco em relação aos três tipos de diluentes testados, Tris-gema, Botu-Bov[®] (BB) e água de coco em pó ACP -111. Para as variáveis analisadas pelo sistema CASA: motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), rápidos (RAP) e integridade da membrana plasmática (IMP) no momento à fresco, não foi observada diferença estatística em relação aos três meios BB, Tris-gema e ACP-111 (Tabela 1).

Tabela 1. Valores médios, desvios padrão e coeficiente de variância, das características: integridade da membrana plasmática (IMP), motilidade (MT), motilidade progressiva (MP) e rápidos (RAP) entre os diluentes testados no sêmen de búfalos á fresco.

DILUIDORES	N	Variáveis			
		MT (%)	MP (%)	RAP (%)	IMP (%)
BB	32	81,38 ^a	61,34 ^a	79,28 ^a	73,39 ^a
Tris-gema	32	78,87 ^a	54,00 ^a	76,84 ^a	64,86 ^a
ACP -111	32	76,19 ^a	57,41 ^a	73,13 ^a	67,19 ^a
Média ± DP		64,16 ± 15,17	48,42 ± 13,21	61,25 ± 15,29	41,19 ± 14,80
CV%		23,64	27,28	24,96	35,93

* Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$)



Figura 1. Microscopia de epifluorescência de sêmen bubalino utilizando a associação das sondas fluorescentes diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e iodeto de propídio (IP) observado no aumento de 100X (seta preta: espermatozoide com membrana plasmática íntegra; seta branca: espermatozoide com membrana acrossomal íntegra e membrana plasmática lesada; seta vermelha: espermatozoide com membrana plasmática e acrossomal lesada).

Na Tabela 2 estão demonstrados os valores médios, desvios padrão e coeficiente de variância para as velocidades ao longo de uma trajetória média (VAP), progressiva (VSL) e curvilínea (VCL) analisadas no sistema computadorizado CASA no momento á fresco comparando-se os em relação aos três diluentes testados. Para a VAP o diluente Tris-gema apresentou valor superior em relação aos demais meios. Na VSL os meios BB e Tris-gema não diferiram entre si e apresentaram valores maiores em relação ao meio ACP-111. E na VCL o meio Tris-gema apresentou valor superior em relação ao meio ACP-111, porém não diferiu do meio BB.

Tabela 2. Valores médios, desvios padrão e coeficiente de variância, das características: velocidade ao longo de uma trajetória média (VAP), velocidade progressiva (VSL) e velocidade curvilinear (VCL) entre os diluentes testados no sêmen de búfalos á fresco.

DILUIDORES	N	Variáveis		
		VAP ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VCL ($\mu\text{m/s}$)
BB	32	107,49 ^a	87,30 ^a	178,66 ^{ab}
Tris-gema	32	120,10 ^b	91,67 ^a	198,89 ^a
ACP -111	32	102,16 ^a	83,00 ^b	165,64 ^b
Média $\pm$ DP		97,22 $\pm$ 13,51	80,12 $\pm$ 9,15	157,29 $\pm$ 32,07
CV%		13,90	11,42	20,39

*Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$)

A Tabela 3 apresenta os valores médios, desvios padrão e coeficiente de variância dos dados analisados no CASA (MT, MP e RAP) e a porcentagem de integridade de membrana plasmática (IMP) avaliada pela microscopia de epifluorescência (Figura 1) no momento pós-congelação em relação aos três tipos de diluentes testados, Tris-gema, Botu-Bov[®] e água de coco em pó ACP -111.

A comparação entre os diluentes testados demonstrou que no momento pós-congelação os meios Tris-gema e BB não foram diferentes para as características MT, MP e RAP, enquanto que o ACP-111 demonstrou valores inferiores para tais características. A IMP, não diferiu entre Tris-gema, BB e ACP-111 (Tabela 3).

Tabela 3. Valores médios, desvios padrão e coeficiente de variância, das características: integridade da membrana plasmática (IMP), motilidade (MT), motilidade progressiva (MP) e rápidos (RAP) entre os diluentes testado no sêmen de búfalos pós-congelação.

DILUIDORES	N	Variáveis			
		MT (%)	MP (%)	RAP (%)	IMP (%)
BB	32	58,59 ^a	47,56 ^a	55,47 ^a	34,07 ^a
Tris-gema	31	52,64 ^a	40,39 ^a	48,29 ^a	29,50 ^a
ACP -111	32	36,94 ^b	29,59 ^b	34,06 ^b	25,51 ^a
Média $\pm$ DP		64,16 $\pm$ 14,79	48,42 $\pm$ 12,82	61,25 $\pm$ 15,00	41,19 $\pm$ 14,86
CV%		23,05	26,47	24,51	36,08

* Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$)

A Tabela 4 apresenta os valores médios, desvios padrão e coeficiente de variância para as velocidades (VAP, VSL e VCL) analisadas no sistema computadorizado CASA de acordo com os diluentes testados no momento pós-

congelamento. Nas velocidades VAP e VCL os diluentes Tris-gema, BB e ACP-111 não diferiram entre si, apenas para VSL o meio BB apresentou valor superior em relação ao ACP-111, porém não diferiu do meio Tris-gema.

Tabela 4. Valores médios, desvios padrão e coeficiente de variância, das características: velocidade ao longo de uma trajetória média (VAP), velocidade progressiva (VSL) e velocidade curvilínea (VCL) entre os diluentes testados no sêmen de búfalos pós-congelamento.

DILUIDORES	N	Variáveis		
		VAP ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VCL ($\mu\text{m/s}$)
BB	32	88,18 ^a	76,35 ^a	137,04 ^a
Tris-gema	31	85,74 ^a	72,42 ^{ab}	138,53 ^a
ACP -111	32	79,27 ^a	69,72 ^b	124,36 ^a
Média $\pm$ DP		97,22 $\pm$ 13,51	80,12 $\pm$ 9,15	157,29 $\pm$ 32,07
CV%		13,90	11,42	20,39

*Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$)

A Tabela 5 demonstra a integridade da membrana plasmática e acrossomal por citometria de fluxo referente aos diluentes testados (Figura 2). Os diluentes diferiram para os parâmetros MPLAI e MPAL, onde o diluidor BB apresentou maior percentagem de espermatozoides com membrana lesada e acrossoma íntegro e menor número de espermatozoides lesados.

Tabela 5. Valores médios, desvios padrão e coeficiente de variância, das características: membrana plasmática lesada e acrossoma íntegro (MPLAI), membrana plasmática e acrossoma lesados (MPAL), membrana plasmática e acrossoma íntegros (MPAI) e membrana plasmática íntegra e acrossoma lesado (MPIAL, dados transformados em $\sqrt{x+0,5}$) entre os diluentes testados no sêmen de búfalos pós-congelamento.

DILUIDORE S	Variáveis			
	MPLAI (%)	MPAL (%)	MPAI (%)	MPIAL (%)
BB	45,05 ^a	24,97 ^b	29,72	0,86
Tris-gema	38,75 ^b	35,15 ^a	25,90	0,84
ACP -111	37,28 ^b	38,15 ^a	24,37	0,83
Média $\pm$ DP	40,36 $\pm$ 9,92	32,76 $\pm$ 9,39	26,66 $\pm$ 11,10	0,84 $\pm$ 0,08
CV%	24,58	28,66	41,62	9,83

*Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$)

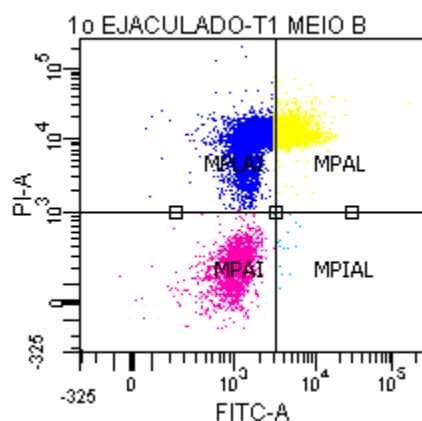


Figura 2. Gráfico gerado pelo citometro de fluxo, cotendo as quatro populações espermáticas (MPLAI, MPAL, MPAI e MPIAL) em sêmen de búfalos.

As análises por citometria de fluxo realizadas para avaliar as lesões semelhantes à capacitação utilizando as sondas anexina V (AN) e iodeto de propídio (PI) estão apresentadas na Tabela 6. Estão demonstrados os valores médios para as lesões semelhantes à capacitação (AN+, Figura 3), quanto aos diluentes testados. Os diluentes não diferiram para nenhum dos parâmetros analisados.

Tabela 6. Valores médios, desvios padrão e coeficiente de variância, das características: anexina negativa e iodeto de propídio positivo (AN-PI+), anexina e iodeto de propídio negativos (AN-PI-), anexina e iodeto de propídio positivos (AN+PI+, dados transformados em $\sqrt{x+1}$) e anexina positiva e iodeto de propídio negativo (AN+PI-, dados transformados em $\sqrt{x+0,5}$) entre os diluentes testados no sêmen de búfalos pós-congelamento.

DILUIDORES	Variáveis			
	AN-PI+ (%)	AN-PI- (%)	AN+PI+ (%)	AN+PI- (%)
BB	55,56	26,23	4,02	2,08
Tris-gema	54,98	21,64	3,91	2,11
ACP -111	49,54	21,69	3,96	1,75
Média $\pm$ DP	53,36 $\pm$ 17,66	23,19 $\pm$ 11,16	3,96 $\pm$ 1,84	1,98 $\pm$ 1,19
CV%	33,1	48,13	46,45	60,41

*Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$)

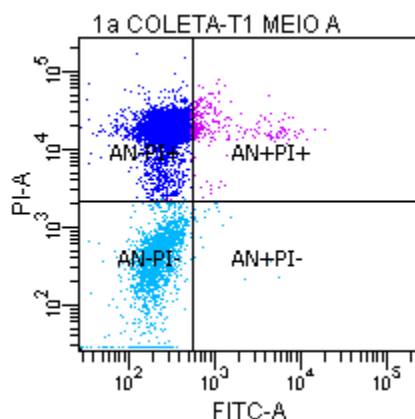


Figura 3. Gráfico gerado pelo citometro de fluxo, contendo as quatro populações geradas na análise com anexina V e PI, em sêmen de búfalos.

As células íntegras (CI), células íntegras com lesões semelhantes à capacitação (CIAN+) e o índice de fragmentação de DNA (IDF) tem seus valores médios demonstrados na Tabela 7. Estão apresentados os valores médios para as células íntegras (CI), células íntegras com lesões semelhantes à capacitação (CIAN+, Figura 4) e o índice de fragmentação do DNA (IDF), em relação aos três tipos de diluentes. Os diluentes BB e ACP-111 diferiram quanto à integridade das células, e o diluente BB apresentou maior valor de CI.

Quanto ao índice de fragmentação de DNA, este apresentou-se superior no diluente Tris-gema e semelhante nos demais diluentes testados.

Tabela 7. Valores médios, desvios padrão e coeficiente de variância, das características: células íntegras (CI), células íntegras com lesões semelhantes à capacitação (CIAN+, dados transformados em $\sqrt{x+1}$) e índice de fragmentação de DNA (IDF, dados transformados em $\sqrt{x+0,5}$) entre os diluentes testados no sêmen de búfalos pós-congelamento.

DILUIDORES	Variáveis		
	CI (%)	CIAN+ (%)	IDF (%)
BB	31,77 ^a	3,68	0,85 ^b
Tris-gema	27,32 ^{ab}	3,75	1,06 ^a
ACP -111	25,14 ^b	3,57	0,87 ^b
Média ± DP	28,08 ± 10,99	3,67 ± 2,15	0,93 ± 0,19
CV%	39,13	58,58	20,87

*Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$)

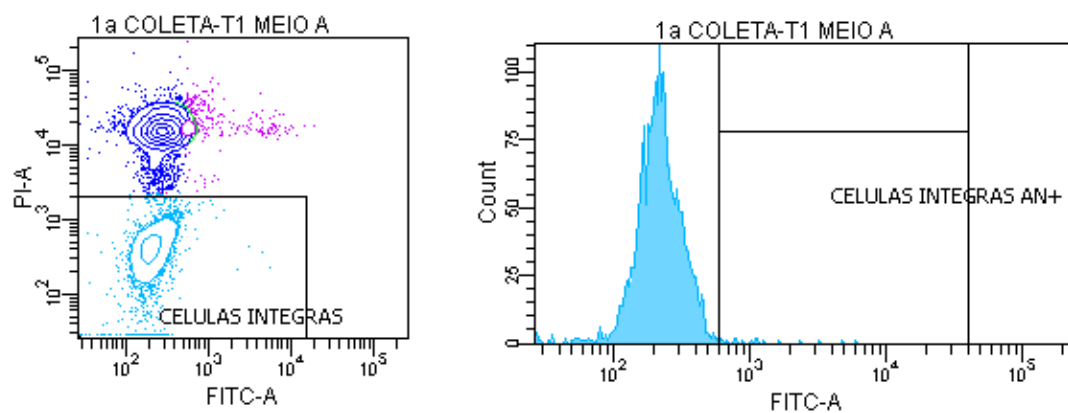


Figura 4. Gráficos gerados pelo citometro de fluxo, demonstrando a porcentagem de lesões semelhantes à capacitação na população de células íntegras, em sêmen de búfalos.

Discussão

6. Discussão

O volume variou entre 3,55 a 4,46 mL, apresentando dentro da normalidade para touros bubalinos em maturidade sexual. Vale (1994) e Almaguer et al. (2007) sugerem que touros na puberdade apresentam volume de cerca 1 ml e após atingirem a maturidade de 3 mL. No presente estudo todos os animais utilizados estavam maduros sexualmente e, portanto, o volume está de acordo com o preconizado pelos autores acima citados.

O presente estudo demonstrou que para todas as variáveis analisadas pelo CASA: motilidade (MT), motilidade progressiva (MP) e rápidos (RAP) e a integridade da membrana plasmática (IMP) não foram diferentes estatisticamente para o momento á fresco. Esses resultados foram semelhantes aos relatos de Chacur (1996), Crespilho (2007) e Salvador (2008) que relataram alta motilidade espermática inicial associada ao alto vigor espermático no sêmen fresco. Contudo, de acordo com os mesmos autores, tais parâmetros iniciais não garantem por si só bom desempenho no processo de criopreservação. A análise de múltiplos atributos de movimentos espermáticos por meio da técnica CASA e a determinação da viabilidade espermática, por meio de técnicas de análise das membranas citoplasmáticas pode agregar maior sensibilidade à avaliação *in vitro* do sêmen em distintas espécies animais como a bubalina (CHACUR, 1996 e 1997) e bovina (CRESPILHO, 2007).

No momento pós-descongelção pôde ser observada uma queda nas porcentagens de MT (58,59%), MP (47,56%), RAP (55,47%) e IMP (34,07%) comparadas às porcentagens iniciais das amostras seminais. Diversos autores já haviam demonstrado (KAKAR e ANAND, 1981; MUEER et al., 1988; RAIZADA et al., 1990; SINGH e PANT 2000; ANDRABI et al., 2001, 2008; AHMAD et al., 2003; SENATORE et al., 2004; KUMARESAN et al., 2005) que o sêmen descongelado empregado na inseminação artificial apresenta baixas taxas de fertilidade e, por essa razão, é ainda pouco empregado. Esses baixos resultados de IA podem estar claramente relacionados aos menores valores seminais pós-descongelção, principalmente a alta incidência de lesão na membrana plasmática.

Os resultados do presente estudo quanto à diferença entre os momentos á fresco e pós-congelção estão de acordo com Suarez (1998) que relatou que em torno de 50% dos espermatozoides em amostras normais são lesados durante os processos de criopreservação. As velocidades analisadas pelo CASA (VAP, 107,49%), (VSL, 87,30%) e (VCL, 178,66%) apresentaram valores maiores no momento á fresco, o que

pode ser devido à porcentagem de espermatozoides lesados durante a criopreservação e/ou a má congelabilidade e fertilidade do sêmen bubalino relatados em diversos estudos citados acima. Tais velocidades no momento á fresco apresentaram os seguintes resultados: para a VAP o diluente Tris-gema apresentou valor superior (120,10%) em relação aos outros meios. Na VSL os meios BB e Tris-gema não diferiram entre si e apresentaram valores maiores (87,30%; 91,67%, respectivamente) em relação ao meio ACP-111 (83,00%). E na VCL o meio Tris-gema apresentou valor superior (198,89%) em relação ao meio ACP-111, porém não diferiu do meio BB.

Na avaliação entre os diluentes no momento pós-congelação foi observado que o Tris-gema (52,64%; 40,39%;48,29%, respectivamente) e BB (58,59%; 47,56%; 55,47%, respectivamente) não diferiram para as características MT, MP e RAP, enquanto o ACP-111 demonstrou diferença estatística e valores inferiores. Dessa forma, pode-se inferir que tais diluentes foram adequados em manter a qualidade cinética dos espermatozoides. Já para IMP os meios não apresentaram diferença estatística. Portanto, deduz que tais diluentes (BB, Tris-gema e ACP-111) foram adequados em manter a integridade da membrana dos espermatozoides após a congelação dos mesmos. Ao se tratar da IMP dos espermatozoides a técnica com uso de sondas fluorescentes traz informações importantes para a avaliação do funcionamento das membranas espermáticas (HARRISON e VICKERS, 1990; GARNER, 1986). Os resultados observados em relação à preservação da integridade da membrana indicam que ocorreram interações entre o diluidor e o tempo de equilíbrio que resultam em uma maior sobrevivência espermática (LEITE, 2008).

A motilidade progressiva no momento pós-congelação, não diferiu entre Tris-gema e BB, porém tais meios apresentaram valores superiores em relação ao outro diluente. Comparando tal resultado em um experimento semelhante, porém em bovinos, (CELEGHINI, 2005) aonde também foi empregado o meio Botu-Bov®, foi observada MT e MP superiores para tal meio (BB) em relação ao meio Bioxcell®.

Zaffalon (2009) testando três meios de diluentes encontrou resultado semelhante ao do presente estudo, relatando uma motilidade progressiva superior para o meio BB, da mesma forma a autora encontrou percentagem maior quanto aos espermatozoides RAP no mesmo meio, igualmente ao nosso estudo que não observou diferença estatística entre BB e Tris-gema, e demonstraram valores superiores em relação ao meio ACP-111 no momento pós-congelação.

Chacur et al. (2012) encontraram resultados diferentes do presente estudo, quando testando os meios Botu-Bov[®], Botu-Bov Egg Free[®] e TRIS, demonstraram que a percentagem de espermatozoides rápidos (RAP) foi maior para os diluidores Botu-Bov[®] e Botu-Bov Egg Free[®], em relação ao meio TRIS.

As velocidades no momento pós-congelação a VAP e VCL, os diluentes Tris-gema, BB e ACP-111 não diferiram entre si. Quanto à VSL houve diferença estatística entre o BB e ACP-111, o BB apresentou valor superior (76,35%) em relação ao ACP-111 (69,72%), contudo o diluidor BB não diferiu do meio Tris-gema. Vale salientar que para uso prático, os parâmetros de cinética espermática por meio da análise computadorizada (CASA) estão relacionados com a taxa de fecundação, onde valores de VAP, VSL e a VCL são significativamente maiores em amostras que produzem mais de 50% de oócitos fecundados (VERSTEGEN, IGUER-OUADA e OCLIN, 2002).

No presente estudo pôde-se verificar que a maioria dos parâmetros avaliados pelo CASA foram semelhantes para os meios BB e Tris-gema, o que difere dos resultados obtidos por Chacur et al. (2012) em sêmen bovino, aonde o diluente Botu-Bov[®] apresentou superioridade na maioria dos parâmetros avaliados pelo CASA. Semelhante aos resultados apresentados neste estudo Oliveira et al. (2007) estudando os meios TRIS e ACP-101 em caprinos, relataram que houve o efeito do diluente, os espermatozoides diluídos-congelados em TRIS apresentaram valores superiores em relação aos parâmetros cinéticos (CASA).

Barbosa et al. (2010), diferentemente dos resultados encontrados neste estudo, utilizaram o diluente a base de água de coco em pó (ACP-106[®]) no sêmen canino e observaram ótimos resultados na motilidade ($99,23 \pm 0,77\%$), enquanto no presente estudo o meio ACP-111 resultou em menores valores (36,94%) para a maioria dos parâmetros avaliados no presente estudo.

Igualmente ao presente estudo Anzar et al. (2002), utilizando a associação de anexina V-FITC e iodeto de propídio, encontraram quatro diferentes populações espermáticas no sêmen de bovino: necróticas (AN+PI+), seminecróticas (AN-PI+), apoptóticas (AN+PI-) e vivas (AN-PI-). Observaram que a fertilidade de touros não foi correlacionada com a taxa de apoptose de sêmen á fresco ou congelado, mas com a porcentagem de células necróticas no sêmen á fresco. O aumento do número de células em apoptose pode interferir na longevidade seminal (ORTEGA-FERRUSOLA et al., 2008).

Os diluentes diferiram para os parâmetros MPLAI e MPAL, o diluidor BB apresentou maior percentagem de espermatozoides com membrana lesada e acrossoma íntegro (45,05%) e menor percentagem de membrana plasmática e acrossoma lesados (24,97%). Resultados semelhantes ao presente estudo foram relatados em bovinos por Zaffalon (2009) que observou que no diluente BB a percentagem de células sem reação acrossomal e com a membrana plasmática íntegra foi maior em espermatozoides bovinos. Resultados similares, em relação a integridade da membrana plasmática e acrossomal, foi relatado por Crespilho (2010).

Os diluentes não diferiram para nenhum dos parâmetros analisados pela anexina V (lesões semelhantes à capacitação). Cerca de 30% dos espermatozoides bovinos congelados apresentam alterações compatíveis com capacitação (VERSTEGEN et al., 2002), sendo observada uma correlação positiva entre porcentagem de espermatozoides não capacitados e taxa de não retorno ao estro após inseminação artificial (THUNDATHIL et al., 1999). Contudo deduz-se que em relação às lesões semelhantes à capacitação os três diluentes testados no presente estudo apresentaram boa eficiência na proteção e preservação das células espermáticas em relação a tal lesão.

Os diluentes BB e ACP-111 diferiram quanto à integridade das células, e o diluente BB apresentou maior valor de CI (31,77%). Barbosa et al. (2010) observaram em sêmen canino um total de espermatozoides normais de $96,05 \pm 0,66\%$; total de espermatozoides com acrossoma intacto de $99,40 \pm 0,30\%$, com o uso do meio a base de água de coco em pó, ao contrário dos resultados deste estudo, o ACP-111 apresentou os menores valores quanto à integridade das células (CI, 25,14%).

Assim para corroborar para os resultados deste estudo Zaffalon (2009) utilizando o mesmo protocolo de análise por citometria de fluxo (associação de PI, FICT-PSA e H33342), encontrou que o BB preservou melhor a membrana plasmática dos espermatozoides bovinos.

Quanto ao índice de fragmentação de DNA, este se apresentou maior no diluente Tris-gema (1,06%) e semelhante nos demais diluentes testados. Nos estudos em humanos e eqüinos; observa-se correlação negativa entre fertilidade e integridade de DNA (AGARWAL e SAID, 2003; LOVE, 2005; MORRELL et al., 2008). Assim, a concepção depende, entre outros fatores, da habilidade da cromatina espermática previamente condensada em se descondensar e formar o pro núcleo masculino durante a interação com o ovócito (MADRID-BURY et al., 2005). Os valores observados para os meios Botu-bov e ACP-111 são de 0,85 e 0,87 % de IDF, respectivamente, melhores

resultados em relação ao observado para o meio Tris-gema (1,06%). De acordo com Evenson e Jost (2000), valores abaixo de 15% são considerados baixos, demonstrando que todas as amostras seminais, independente do meio diluidor ou da idade dos animais apresentavam baixo índice de fragmentação do DNA. Adicionalmente, os valores encontrados no presente estudo são compatíveis aos valores encontrados em amostras seminais bovinas de alta fertilidade (1,2 a 3%; BOCHENEK et al., 2001).

Conclusões

7. Conclusões

Com base nos resultados obtidos no presente estudo podemos concluir que: o sêmen fresco apresentou melhores valores de cinética espermática em relação ao congelado, ressaltando a má congelabilidade do sêmen dessa espécie e a necessidade da melhoria da técnica.

Os diluentes BB e Tris-gema apresentaram melhores resultados para congelação do sêmen de búfalos, em relação ao meio ACP-111.

O diluente BB demonstrou superioridade em relação à motilidade progressiva espermática, menor porcentagem de índice de fragmentação de DNA e de espermatozoides lesados.

Portanto, mediante o protocolo do presente estudo deduz-se que o BB apresenta superioridade na congelação de sêmen de búfalos, sendo este a melhor opção de diluente para essa biotecnologia.

Bibliografia

8. Bibliografia

AGARWAL, A.; SAID, T.M. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. **Hum Reprod**, v.9, p.331-345, 2003.

AGARWAL, A., MAKKER, K., SHARMA, R. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. **Am J Reprod Immunol**, v.59, p.2-11, 2008.

AGUIAR, P., ANDRADE, V., ABREU, J. GOMEZ, A., 1994. Physical and morphological semen characteristics of buffaloes aged from four to eight years old. **Proc. 4th Int. Buffalo Congr.**, Sao Paulo, Brazil. 3: 486–488

AHMAD, Z., ANZAR, M., SHAHAB, M., AHMAD, N., AANDRABI, S.M.H., 2003: Sephadex and sephadex ion-exchange filtration improves the quality and freezability of low-grade buffalo semen ejaculates. **Theriogenology** 59, 1189–1202.

ALMAGUER, P., 2007. El búfalo una opción de la ganadería. **Revista electrónica de Veterinaria VIII**: 8.

ÁLVAREZ, J., 2003. Manual de crianza del búfalo revista ACPA. Sistema reproductivo de la hembra. **Sociedad Cubana de Criadores de Búfalos**. 19-25.

AMANN, R. P.; PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Equine Veterinary Science**, 1987.

ANDRABI, S.M.H., AHMAD, N., ABBAS, A., ANZAR, M., 2001: Effect of two different antibiotic combinations on fertility of frozen buffalo and Sahiwal bull semen. **Pak Vet J** 21, 166–169.

ANDRABI, S.M.H., ANSARI, M.S., ULLAH, N., ANWAR, M., MEHMOOD, A., AKHTER, S., 2008: Duck egg yolk in extender improves the freezability of buffalo bull spermatozoa. **Anim Reprod Sci** 104, 427–433.

ANUALPEC, **Anuário da pecuária brasileira**, 2012.

ANZAR, M., HE, L., BUHR, M.M., KROETSCH, T.G, PAULS, K.P., 2002: Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relationship with fertility. **Biol Reprod** 66, 354–360.

BARBOSA, C.C.; MADEIRA, V.L.H.; JUCÁ, R.P.; OLIVEIRA, Â.C.; UCHOA, D. C.; PINHEIRO, A.Q.; SILVA, L.D.M. Diferentes concentrações de benzilpenicilina benzatina no sêmen canino criopreservado em diluidor à base de água de coco na forma de pó (ACP-106®). **Rev. Bras. Saúde Prod. An.**, v.11, n.1, p 270-281, 2010.

BARNABÉ, V.H. et al. Seasonal behavior of semen collected by eletroejaculation from buffaloes raised in São Paulo State (Southeast-Brazil). **In: International congress on animal reproduction**, 2, 1992, Haia. Proceedings...Haia, 1992.v.4, p.484-5.

BARTH, A., TRIBULO, H., 2000. Curso de evaluación de toros y control de la calidad seminal: 16 al 19 de Agosto del 2000. 1 ed. Córdoba (Argentina). **Universidad católica de Córdoba**, 3-10, p.55, 2000.

BERNARDES, O. Bubalinocultura no Brasil: situação e importância econômica **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.31, n.3, p.293-298, jul./set. 2007.

BITTENCOURT, R.F. **Viabilidade e fertilidade de sêmen ovino criopreservado com glicerol e dimetilacetamina acrescido de trealose e edta**. Botucatu, 2009. 201p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

BOCHENEK, M.; SMORAG, Z.; PILCH, J. Sperm chromatin structure assay of bulls qualified for artificial insemination. **Theriogenology**, v.56, p.557-567, 2001.

BLACKSHAW, A.W.; SALISBURY, G.W. Factors influencing metabolic activity of bull spermatozoa. II. Cold-Shock and its prevention. **Journal of Dairy Science**, v.40, n.9, p.1099-1106, 1957.

BLEIL, J.D., WASSARMAN, P.M. Sperm-egg interactions in the mouse: sequence of events and induction of acrosome reaction by a zone glycoprotein. **Dev Biol**, v.95, p.317-324, 1983.

CABALLERO, I., VAZQUEZ, J.M., MAYOR, G.M., ALMINAÑA, C., CALVETE, J.J., SANZ, L., ROCA, J., MARTÍNEZ, E.A., 2009: PSP-I/PSP-II spermadhesin exert a decapacitation effect on highly extended boar spermatozoa. **Int J Androl** 32, 505–513.

CANIZALES, S.A. Características seminales del Búfalo de agua (*Bubalus bubalis*). **Revista Colombiana de Ciencia Animal** , Vol. 4, N. 1, p.95-102 , 2011.

CARDOSO, R.C.S., SILVA, A.R., SILVA, L.D.M., 2005. Use of the powdered coconut water (ACP-106[®]) for cryopreservation of canine spermatozoa. **Anim Reprod.** v. 2, p. 257-262. 2005.

CELEGHINI, E.C.C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozóides utilizando sondas fluorescentes** [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo; 2005.

CONTRI, A.; VALORZ, C.; FAUSTINI, M.; WEGHER, L.; CARLUCCIO, A. Effect of semen preparation on casa motility results in cryopreserved bull spermatozoa. **Theriogenology**, v.74, p.424–435, 2010.

CHACUR, M.G.M. **Avaliação da congelação de sêmen bubalino (*Buballus bubalis*) com diferentes diluidores Glicina-gema, Triladyl e TES em diferentes tempos de equilíbrio**. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP de Botucatu, 1996, Dissertação de Mestrado. 116p.

CHACHUR, M.G.M., OBA, E., GONZALES, C.I.M., 1997: Equilibrium time influence on motility, vigour and membrane integrity of thawed buffalo semen using triladyl, glycine-egg yolk and tes extenders. In: **Borghese A, Failla S, Barile VL (eds) Proceedings of 5th World Buffalo Cong., Caserta, Italy. International Buffalo Federation**, Roma, Italy, pp. 846–849.

CHACUR, M.G.M., et al. Efeito de meios diluentes na viabilidade de sêmen congelado bovino. **Vet. e Zootec.** 2012 mar.; 19(1): 346-355.

CHESHMEDJIEVA, S.B.; DIMOV, V.N., 1994: Effect of freezing on phospholipid distribution of buffalo spermatozoa plasma membranes. In: Vale WG, Barnabe VH, Mattos JCA de, **Proceedings of 4th World Buffalo Cong., Sao Paulo, Brazil. International Buffalo Federation**, Roma, Italy, pp. 519–521.

CRESPILHO, A.M. **Efeito do meio diluidor e da dose inseminante sobre a congelabilidade e fertilidade do sêmen bovino utilizado em programas de inseminação artificial em tempo fixo (IATF)** [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2007.

CRESPILHO, A.M. **Estudo comparativo de diferentes metodologias de preservação do sêmen bovino para a utilização em programas de inseminação artificial em tempo fixo (IATF)**. Botucatu, 2010. 114p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

DESAI, N.R., SHARMA, R., MAKER, K., SABNEGH, E., AGARWAL, A. Physiological and pathological levels of reactive oxygen species in neat semen of infertile men. **Fertil Steril**, v.92, p.1626-1631, 2009.

DOMÍNGUEZ-REBOLLEDO AE, FERNÁNDEZ-SANTOS MR, BISBAL AF, ROS-SANTAELLA JL, CARMONA M, MARTÍNEZ-PASTOR F, GARDE JJ, 2010: Suitability of novel antioxidants for protecting thawed spermatozoa from red deer. **Reprod Fertil Dev** doi: 10.1071/RD09197.

DROBNIS, E.Z. et al. Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes a demonstration using sperm as a model. **Journal of Experimental Zoology**, v.265, n.4, p.432-437, 1993.

EVENSON, D., JOST, L., 2000: Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. **Methods Cell Sci** 22, 169–189.

EVENSON, D.P., DARZYNKIEWICZ, Z., MELAMED, M.R., 1982: Simultaneous measurement by flow cytometry of sperm cell viability and mitochondrial membrane potential related to cell motility. **J Histochem Cytochem** 30, 279–280.

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. **Biophys J**, v.32, p.837-850, 1980.

FARREL, P.B.; FOOTE, R.H. MCARDLE, M.M.; TROUERN-TREND, V.; TARDIF, A.L. Media and dilution procedures tested to minimize handling effects on human, rabbit, and bull sperm for computer-assisted sperm analyses (CASA). **Journal of Andrology**, v.17, p.293-300, 1996.

FERNÁNDEZ-SANTOS, M.R., MARTÍNEZ-PASTOR, F., GARCÍA-MACÍAS, V., ESTESO, M.C., SOLER, A.J., DE PAZ, P., ANEL, L., GARDE, J.J., 2007: Extender osmolality and sugar supplementation exert a complex effect on the cryopreservation of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa. **Theriogenology** 67, 738–753.

FOOTE, R.H.; KAPROTH, M.T. Large batch freezing of bull semen: effect of time of freezing and fructose on fertility. **Journal of Dairy Science**, v.85, p.453-456, 2001.

FRITSCH, M. **Eficiência de dois diluidores e três tempos de equilíbrio na congelação de sêmen bubalino**. Santa Maria: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 1994. 100p. Dissertação. (Mestrado).

GADELLA, B.M., HARRISON, R.A.P., 2002: Capacitation induces cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent, but apoptosisunrelated, exposure of aminophospholipids at the apical head plasma membrane of boar sperm cells. **Biol Reprod** 67, 340–350.

GADELLA, B.M., TSAI, P.S., BOURKE, A., BREWIS, I.A. Sperm head membrane reorganization during capacitation. **Int J Dev Biol**, v.52, p.473, 2008.

GARNER, D.L., PINKEL, D., JOHNSON, L.A., PACE, M.M., 1986: Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. **Biol Reprod** 34, 127–138.

GARNER, D.L., THOMAS, C.A., JOERG, H.W., DEJARNETTE, J.M., MARSHALL, C.E. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. **Biol Reprod** 1997;57:1401–6.

GILLAN, L., EVANS, G., MAXWELL, W.M.C., 2005: Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. **Theriogenology** 63, 445–457.

GONÇALVES, F., BARRETTO, L.S.S., ARRUDA, R.P., PERRI, S.H.V., MINGOTI, G.Z. Effect of antioxidants during bovine *in vitro* fertilization procedures on spermatozoa and embryo development. **Reprod Domest Anim**, v.45, p.129-135, 2010.

GRUNEWALD, S., SHARMA, R., PAASCH, U., GLANDER, H.J., AGARWAL, A., 2009: Impact of caspase activation in human spermatozoa. **Microsc Res Tech** 72, 878–888.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**. 7ed. Barueri: Editora Manole Ltda, 2004. 107 e 369 a 394 p.

HALLAP, T., HAARD, M., JAAKMA, U., LARSSON, B. & RODRIGUEZ-MARTINEZ, H., 2004. Does cleansing of frozen-thawed bull semen before assessment provide samples that relate better to potential fertility? **Theriogenology**. 62: 702-13.

HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 88, p. 343-352, 1990.

HARRISON, R.A., ASHWORTH, P.J., MILLER, N.G., 1996: Bicarbonate / co₂, an effector of capacitation, induces a rapid and reversible change in the lipid architecture of boar sperm plasma membranes. **Mol Reprod Dev** 45, 378–391.

HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage semen. **Animal Reproduction Science**. v.62, n.1-3, p.2-22, 2000a.

HOLT, W.V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. **Theriogenology**, v.43, p.47-58, 2000b.

JANUSKAUSKAS, A., GIL, J., SÖDERQUIST, L., HÅÅRD, M.G., HÅÅRD, M.C., JOHANNISSON, A. RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. 1999. Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility of dairy bull semen used for artificial insemination in Sweden. **Theriogenology**. 52: 641-58.

JANUSKAUSKAS, A., JOHANNISSON, A., RODRIGUEZ-MARTÍNEZ, H., 2003: Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. **Theriogenology** 60, 743–758.

JAVED, M. T., KHAN, J.R., KAUSAR, P., 2000 Effect of age and season on some semen parameters of Nili- Ravi buffalo (*Bubalus bubalis*) bulls. **Vet. Arhiv.** 70: 83- 94.

KADIRVEL, G.; KUMAR, S.; KUMARESAN, A. Lipid peroxidation, mitochondrial membrane potential and DNA integrity of spermatozoa in relation to intracellular reactive oxygen species in liquid and frozen-thawed buffalo semen. **Anim Reprod Sci**, v.114, p.125-134, 2009.

KAKAR, S.S, ANAND, S.R, 1981: Changes in adenosine 5' -triphosphate, adenylate energy charge and adenosine 3' 5' -cyclic monophosphate during the freezing of buffalo semen. **J Reprod Fert** 62, 543–548.

KENNEY, R.M., BERGAMAN, R.V., COOPER, W.L., MORSE, G.W., 1975. Minimal contamination techniques for breeding mares: techniques and preliminary findings. **In: Proc. 21 st Annu. Conv. Am. Assoc, Equine Pract**, p.327.

KOONJAENAK, S., RODRIGUEZ-MARTINEZ. M., 2007. Assessment of semen quality in Swamp Buffalo AI Bulls in Thailand. **Ital J Anim Sci.** 6(Suppl. 2): 701-704.

KOTHARI, S., THOMPSON, A., AGARWAL, A., DU PLESSIS, S.S. Free radicals: their beneficial and detrimental effects on sperm function. **Indian J Exp Biol**, v.48, p.425-435, 2010.

KUMAR, S., SAHNI, K.L., BENJAMIN, B.N., MOHAN, G., 1993. Effect of various levels of yolk on deep freezing and storage of buffalo semen in different diluters without adding glycerol. **Buffalo J.** 1: 79–85.

KUMAR S, MILLAR JD, WATSON PF. The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines. **Cryobiology**, v.46, p.246-253, 2003.

KUMARESAN, A., ANSARI, M.R., ABHISHEK, G., 2005: Modulation of post-thaw sperm functions with oviductal proteins in buffaloes. **Anim Reprod Sci** 90, 73–84.

LADHA, S. Lipid heterogeneity and membrane fluidity in a highly polarized cell, the mammalian spermatozoon. **J Membr Biol**, v.165, p.1-10, 1998.

LEITE, T.G. **Tempo de equilíbrio na criopreservação do sêmen: Efeitos sobre características de motilidade e de integridade das membranas espermáticas de touros Gir leiteiro** [dissertação]. Belo Horizonte: Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais; 2008.

LEITE, T.G.; VALE FILHO, V.R.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C., EMERICK, L.L.; ZAFFALON, F.G.; MARTINS, J.A.M.; ANDRADE, V.J. Effects of extender and equilibration time on post-thaw motility and membrane integrity of cryopreserved Gyr bull semen evaluated by CASA and flow cytometry. **Animal Reproduction Science**, v.120, p.31–38, 2010.

LOHACHIT, C., 1987. Anatomy and clinical examination on female reproductive org of swamp buffalo reproduction. **Ed Thailand**. 93-1001

LOVE, C.C. The sperm chromatin structure assay: A review of clinical applications. **Anim Reprod Sci**, v.89, p.39-45, 2005.

MACHADO, V.P. **Rediluição do sêmen bovino congelado em meio à base de água de coco em pó (ACP-111[®])**. Teresina: Universidade Federal do Piauí, 2010, Tese de Doutorado. 100p.

MACHADO, V.P.; NUNES, J.F.; ARAÚJO, A.A.; FERNANDÉZ, D.R.P.; CORDEIRO, M.A.; MEDEIROS, C.H.N.; MONTEIRO, A.W.U. Fertilidade após inseminações artificiais cervical e laparoscópica utilizando diluidores à base de água de coco. **Brazilian Journal of Animal Science**. v. 43, p. 43 – 49, 2006.

MADRID-BURY, N.; PÉREZ-GUTIÉRREZ, J.P.; PÉREZ-GARNELO, S.; MOREIRA, P.; SANJUANBENITO, B.P.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; MARTÍNEZ, J.F. Relationship between non-return rate and chromatin condensation of deep frozen bull spermatozoa. **Theriogenology**, v.64, p.232-241, 2005.

MARCHETTI, C., JOUY, N., LEROY-MARTIN, B., DEFOSSEZ, A., FORMSTECHE, P., MARCHETTI, P., 2004: Comparison of four fluorochromes for the detection of the inner mitochondrial membrane potential in human spermatozoa and their correlation with sperm motility. **Hum Reprod** 19, 2267– 2276.

- MARTIN, G., CAGNON, N., SABIDO, O., SION, B., GRIZARD, G., DURAND, P., LEVY, R., 2007: Kinetics of occurrence of some features of apoptosis during the cryopreservation process of bovine spermatozoa. **Hum Reprod** 22, 380–388.
- MARTÍNEZ-PASTOR, F., GARCÍA-MACÍAS, V., ÁLVAREZ, M., HERRAEZ, P., ANEL, L., DE PAZ, P., 2005: Sperm subpopulations in Iberian red deer epididymal sperm and their changes through the cryopreservation process. **Biol Reprod** 72, 316–327.
- MARTÍNEZ-PASTOR, F., JOHANNISSON, A., GIL, J., KAABI, M., ANEL, L., PAZ, P., RODRIGUEZ-MARTÍNEZ, H., 2004: Use of chromatin stability assay, mitochondrial stain JC-1, and fluorometric assessment of plasma membrane to evaluate frozen-thawed ram semen. **Anim Reprod Sci** 84, 121–133.
- MORREL, J.M; JOHANNISSON, A.; DALIN, A.M.; HAMMAR, L.; SANDEBERT, T.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Sperm morphology and chromatin integrity in Swedish warmblood stallions and their relationship to pregnancy rates. **Acta Vet Scand**, v.50, p.2, 2008.
- MUER, S.K., ROY, S.B., MOHAN, G., DHOBLE, R.L., 1988: Cryogenic changes in seminal protein of cattle and buffalo. **Theriogenology** 30, 1005–1010.
- MURATORI, M., PORAZZI, I., LUCONI, M., MARCHIANI, S., FORTI, G., BALDI, E., 2004: Annexin V binding and merocyanine staining fail to detect human sperm capacitation. **J Androl** 25, 797–810.
- NAGY, S., JANSEN, J., TOPPER, E.K., GADELLA, B.M., 2003: A triplestain flow cytometric method to assess plasma- and acrosome- membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles. **Biol Reprod** 68, 1828–1835.
- NAZIR, M., 1988. Semen evaluation and sperm morphology. Monograph on Reproductive Pattern of Riverine Buffaloes and Recommendations to Improve Their Reproductive Performance at Small Farmer Level. **Pakistan Agri. Res. Council**, Islamabad, Pakistan.

NEID, D.M.; GADELLA, B.M.; COLLENBRANDER, B.; AGÜERO, A.; BROUWERS, J.F.H.M. Lipid peroxidation in stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.58, p.295-298, 2002.

NORDIN, W., HILMI, M., BONGSO, T. A., 1990. Semen characteristics related to age in growing swamp buffalo (*Bubalus babalis*). **Buffalo J.** 2: 161-6.

OBA, E., FUCK, E.J., BICUDO, S.D., PAP, F.O., OHASHI, O.M., 1994: Preliminary study on different mediums for deep freezing of buffalo semen. **In: Vale WG, Barnabe VH, Mattos JCA de, Proceedings of 4th World Buffalo Cong., Sao Paulo, Brazil. International Buffalo Federation**, Roma, Italy, pp. 579–581.

OBA, E.; FUCK, E.J.; BICUDO, S.D.; PAPA, F.O.; OHASHI, O.M. Estudo preliminar de diferentes meios para congelamento de sêmen de búfalos. **Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**, 10, Belo Horizonte. Anais... Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1993, v.2, p.337

OLIVEIRA, R.V. **Efeito de meios de re-diluição pós-descongelamento sobre a cinética e morfologia de espermatozoides caprinos congelados em meio à base de água de coco em pó (ACP-101) ou TRIS**. [Dissertação]. Fortaleza: Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará; 2007.

OLDS-CLARKE, P. How does poor motility alter sperm fertilizing ability? **Journal of Andrology**, v.17, n.3, p.183-186, 1996.

ORTEGA-FERRUSOLA, C., SOTILLO-GALAN, Y., VARELA-FERNANDEZ, E.; GALLARDO-BOLANOS, J.M., MURIEL, A.; GONZALEZ-FERNANDEZ, L.; TAPIA, J.; PENA, F.J. Detection of “Apoptosis-Like” changes during cryopreservation process in equine sperm. **J Androl**, v.29, p.213-221, 2008.

ORTEGA-FERRUSOLA, C., GARCÍA, B.M., GALLARDO-BOLANOS, J.M., GONZÁ LEZ-FERNÁNDEZ, L., RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H., TAPIA, J.A., PENÃ, F.J., 2009: Apoptotic markers can be used to forecast the freezeability of stallion spermatozoa. **Anim Reprod Sci** 114, 393–403.

PARKS, J.E.; ARION, J.A.; FOOTE, R.H., 1987: Lipids of plasma membrane and outer acrosomal membrane from bovine spermatozoa. **Biol Reprod** 37, 1249–1258.

PALACIOS, C., 2005. Técnicas para la evaluación de la capacidad fecundante de espermatozoides. **Memorias posgrado de reproducción bovina**. CGR Colombia.

PANT, H. C., SHARMA, R. K., PATEL, S. H., SHUKLA, H. R., MITTAL, A. K., KASIRAJ, R., MISRA, A. K., PRABHAKAR, J. H., 2003. Testicular development and its relationship to semen production in Murrah buffalo bulls. **Theriogenology**. 60: 27-34.

PENÃ, F.J., JOHANNISSON, A., WALLGREN, M., RODRIGUEZ MARTÍNEZ, H., 2004: Antioxidant supplementation of boar spermatozoa from different fractions of the ejaculate improves cryopreservation: changes in sperm membrane lipid architecture. **Zygote** 12, 117–124.

PENÃ, F.J., RODRÍGUEZ MARTÍNEZ, H., TAPIA, J.A., ORTEGA FERRUSOLA, C., GONZÁ LEZ FERNÁNDEZ, L., MACÍAS GARCÍA, B., 2009: Mitochondria in mammalian sperm physiology and pathology: a review. **Reprod Domest Anim** 44, 345–349.

PENÃ, F.J., SARAIVIA, F., GARCÍA-HERREROS, M., NUNEZ-MARTÍNEZ, I., TAPIA, J.A., JOHANNISSON, A., WALLGREN, M., RODRIGUEZ-MARTÍNEZ, H., 2005a: Identification of sperm morphometric subpopulations in two different portions of the boar ejaculate and its relation to postthaw quality. **J Androl** 26, 716–723.

PENÃ, F.J., SARAIVIA, F., JOHANNISSON, A., WALLGREN, M., RODRIGUEZ-MARTÍNEZ, H., 2007: Detection of early changes in sperm membrane integrity pre-freezing can estimate postthaw quality of boar spermatozoa. **Anim Reprod Sci** 97, 74–83.

PETRUNKINA, A.M., JEBE, E., TOPFER-PETERSEN, E., 2005: Regulatory and necrotic volume increase in boar spermatozoa. **J Cell Physiol** 204, 508–521.

PICKETT, B.W.; SQUIRES, E.L.; MACKINNON, A.O. Procedures for collection, evaluation and utilization of stallion semen for artificial insemination. **Fort Collins, CO: Colorado State University, Animal Reproduction Laboratory**, 1987.

RAIZADA, B.C., SATTAR, A., PANDEY, M.D., 1990: A comparative study of freezing buffalo semen in two dilutors. In: Acharya RM, Lokeshwar RR, Kumar AT (eds), **Proceedings of 2nd World Buffalo Cong**, New Delhi, India. International Buffalo Federation, Roma, Italy, pp. 66–74.

RAMAKRISHNAN, P., ARIFF, M., 1994. Effect of glycerol level and cooling rate on post-thaw semen quality of Malaysian swamp buffalo. **Proc. 4th Int. Buffalo Congr.**, Sao Paulo, Brazil. 3: 540–542.

RASUL, Z., ANZAR, M., JALALI, S., AHMAD, N., 2000: Effect of buffering systems on post-thaw motion characteristics, plasma membrane integrity, and acrosome morphology of buffalo spermatozoa. **Anim Reprod Sci** 59, 31–41.

RATTAN, P.J.S., 1990. Physico–chemical constituents of buffalo bull semen. In: Acharya, R.M. Lokeshwar, R.R., Kumar, S. Eds. **Recent Advances in Buffalo Research**. 3: 26–30.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H., 2003. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia. **Reprod Dom Anim**. 38: 312–318.

ROY, A., SRIVASTAVA, R.K., PANDEY, M.D., 1956: Deep freezing of buffalo semen diluted and preserved in glycine-egg yolk medium. **Indian J Dairy Sci** 9, 61–62.

SAACKE, R.G; 1984: Semen quality: importance of and influencing factors. In: **Proceedings of 10th NAAB Tech. Conf. A. I. Reprod Milwaukee**, WI, USA. National Association of Animal Breeders, Columbia, USA, pp. 30–36.

SAEED, A., CHAUDHRY, R., KHAN, I.H., KHAN, N.U., 1990. Morphology of semen buffalo bulls of different age groups. In: Acharya, R.M. **Recent Advances in Buffalo Research**. 3: 17–19.

SAJJAD, S. AKHTER., ANDRABI H., 2007. Blood Serum Testosterone Level and its Relationship With Scrotal Circumference and Semen Characteristics in Nili-Ravi Buffalo Bulls. **Pakistan Vet. J.** 27(2): 63-66

SALGUEIRO, C.C.; NUNES, J.F.; OLIVEIRA, K.P.L.; VIEIRA, V.E.; GONDIM, J.M.; MATEOS – REX, E. Utilização de diluidores à base de água de coco *in natura* e em pó na inseminação artificial em cabras em tempo fixo. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v. 5., p. 96-98, 2002.

SALVADOR, D.F.; ANDRADE, V.J.; VALE FILHO, V.R. Associação entre o perfil andrológico e a congelação de sêmen de touros da raça Nelore aos dois anos de idade, pré-selecionados pela classificação andrológica por pontos (CAP). **Arq Bras Med Vet Zootec**. 2008;60:587-93.

SAMPAIO NETO, J.C., SALGUEIRO, C.C.M., MATEOS – REX, E., NUNES, J.F., Utilização do diluente ACP-105[®] na refrigeração do sêmen equino. **Rev. Bras Reprod Anim**. v. 5., p. 137-139. 2002.

SANSONE, G. 2000. Storage of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. **Anim Reprod Sci**. 62 : 55-76.

SENATORE, E.M., VERBERCKMOES, S., PASCALE, M., PRESICCE, G.A., 2004: A deep utero-tubal semen deposition in Mediterranean Italian buffaloes using a new artificial insemination device. **Reprod Fertil Dev** 16, 133.

SILVA, J.R.V.; LUCCI, C.M.; CARVALHO, F.C.A.; BÃO, S.N.; COSTA, S.H.F.; SANTOS, R.R.; FIGUEIREDO, J.R. Effect of coconut water and Braun-Collins solutions at different temperatures and incubation times on the morphology of goat preantl follicles preserved in vitro. **Theriogenology**. v. 54. p. 809-822. 2000.

SILVA, A.R.; FONTENELE-NETO, J.D.; CARDOSO, R.C.S.; SILVA, L.D.M.; CHINIRÉA, V.H.; LOPES, M.D. Description of ultrastructural damages in frozen-thawed canine spermatozoa. **Ciênc Anim Bras**, v.10, p.595-601, 2009a.

SINGH, M., PANT, H.C., 2000: Effect of post-thaw incubation on semen quality of buffalo bulls – comparison with cattle. **Buffalo Bull** 19, 51–54.

SUAREZ, S.S. The oviductal sperm reservoir in mammals; mechanisms of formation. **Biology Reproduction**, 1998.

SURYAPRAKASAM, T. B., RAO, A.V., 1993. Studies on seminal characteristics of multiple breed AI bulls. **Indian Vet J.** 70: 629-632.

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, n.2, p.28-35, 2005.

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.

TALEVI, R., PELOSI, S., SANSONE, G., GRASSO, F., MATASSINO, D., 1994. Effects of different pre-freezing rates on buffalo sperm. Motility and ultrastructure preservation. **Proc. 4th Int. Buffalo Congr.**, Sao Paulo, Brazil. 3: 537-539.

TAO, J., CRITSER, E., CRITSER, J., 1993: Evaluation of mouse sperm acrosomal status and viability by flow cytometry. **Mol Reprod Dev** 36, 183-194.

TATHAM, B., 2000: Increasing Buffalo Production; Using Reproduction Technology. Report Rur. Indust. Res Corp. Dev., Kingston, ACT, Australia. Jain YC, Anand SR, 1976: The lipids of buffalo spermatozoa and seminal plasma. **J Reprod Fert** 47, 255-60.

TAYLOR, U.; RATH, D. Flow cytometrical sex sorting of buffalo sperm: status and opportunities. **In: Proceedings of international buffalo conference**, 1., New Delhi, 2010. P. 190-195.

THOMAS, C., GARNER, D., DEJARNETTE, J., MARSHALL, C., 1997: Fluorometric assessments of acrosomal integrity and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. **Biol Reprod** 56, 991-998.

THOMAS, A.D.; MEYERS, S.A.; BALL, B.A. Capacitation-like changes in equine spermatozoa following cryopreservation. **Theriogenology**, v.65, p.1531-1550, 2006.

TONIOLLI, R.; SILVA, M.C.; CHAVES, R.N. Utilização de diferentes meios de ressuspensão para o sêmen do varrão após descongelação. **R. Bras. Ci. Vet.** v. 16, n. 1, p. 41- 45. 2009.

TUREK, P.J. Practical approaches to the diagnosis and management of male infertility. **Nat Clin Pract Urol**. 2005; 2(5):226-38.

THUNDATHIL, J.; GIL, J.; JANUSKAUSKAS, A.; LARSSON, B.; SÖDERQUIST, L.; MAPLETOFT, R.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Premature capacitation and fertility of frozen-thawed bull semen used in artificial insemination. **Theriogenology**, v.51, p.351, 1999. Abstract.

VALE, W., 1997. News on reproductive biotechnology in males. **Proc. 5th World Buffalo Congr.**, Caserta, Italy. 1: 103–123.

VALE, W., 2006. Evaluación andrológica del semental bufalino. **Memorias II simposio de búfalos Europa-América. Medellín** – Colombia. 163-164.

VALE, W.G. Collection, processing and deep freezing of buffalo semen. **Buffalo Journal**, v.2, p . 65-81. 1994.

VALE, W.G.; RIBEIRO, H.F.L.; SOUSA, J.S.; OHASHI, O.M. Inseminação artificial em búfalos(*Bubalus bubalis*) na região amazônica. **Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**, 19, Belém. Anais...1984, p. 91.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.I.; OCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**. 2002;57:149-79.

VIRRO, M.R., LARSON-COOK, K.L., EVENSON, D.P., 2004: Sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. **Fertil Steril** 81, 1289–1295.

WARD, C.R., STOREY, B.T., 1984: Determination of the time course of capacitation in mouse spermatozoa using a chlortetracycline fluorescence assay. **Dev Biol** 104, 287–296.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Anim. Reprod. Sci.**, v.60. p.481-492, 2000.

YADAV, P.S.; SINGH, B.; SINGH, I.; SETHI, R.K. Reproductive biotechnology in buffalo. 1 ed. **Satish serial publishing house**, 2010. 78-79 p.

YOUNIS, M., 1996. Studies on semen quality, freezability and fertility of buffalo bulls during low and peak breeding seasons. PhD Thesis, **Univ. Agri. Faisalabad, Pakistan**

ZAFFALON, F.G. **Alterações semelhantes à capacitação no sêmen bovino após a criopreservação utilizando diluidores a base de gema de ovo e lecitina de soja.** [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo; 2009.

Anexos

9. Anexos

ANEXO 1: Os defeitos maiores (20,50%) mais encontrado no presente estudo para os espermatozoides de búfalos foi cauda fortemente dobrada ou enrolada (Figura 5), seguido dos defeitos de acrossoma; já para os defeitos menores (5,00%), os mais frequentes foram cauda dobrada ou enrolada e gota citoplasmática distal (Figura 6).

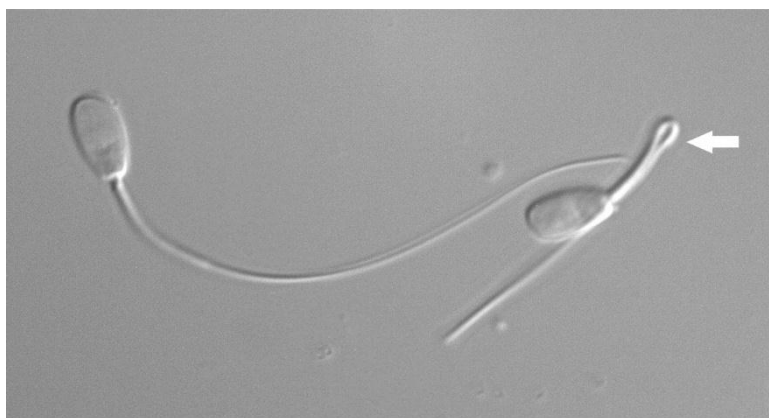


Figura 5. Espermatozoide normal e espermatozoide com cauda fortemente dobrada (indicado pela seta branca) observado em microscopia de interferência diferencial (DIC, aumento de 100X) em sêmen bubalino.

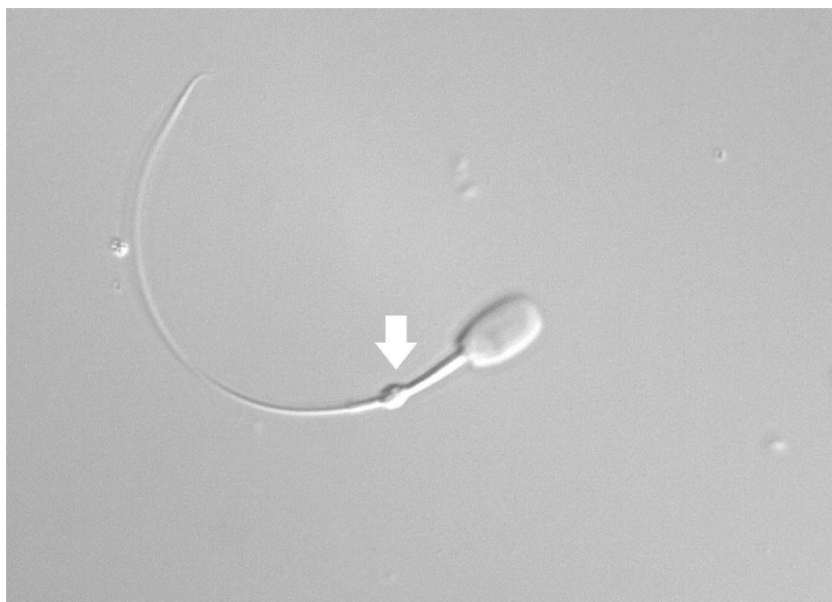


Figura 6. Indicado pela seta branca um espermatozoide com gota citoplasmática distal observado em microscopia de interferência diferencial (DIC, aumento de 100X) em sêmen bubalino.

Trabalho Científico

10. Trabalho Científico

Trabalho a ser enviado para a revista Veterinária e Zootecnia.

Aspectos físicos e morfológicos do sêmen de bubalinos da raça Murrah em maturidade sexual

Mariana Furtado Zorzetto¹
Yamê Fabres Robaina Sancler da Silva¹
Saulo Zocca²
Gabriel Augusto Monteiro³
Stephane Cássia Vexenat⁴
Ian Martin⁵
Eunice Oba⁶

mary-zorze@hotmail.com.br; telefone (16) 3942 5195; Departamento de Reproducao Animal e Radiologia Veterinaria, Faculdade de Medicina Veterinaria e Zootecnia (FMVZ) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Distrito de Rubiao Junior, s/n, CEP: 18618-000 Botucatu-SP.

¹ Mestranda em Reproducao Animal pelo Departamento de Reproducao Animal e Radiologia Veterinaria, da Faculdade de Medicina Veterinaria e Zootecnia (FMVZ) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Distrito de Rubiao Junior, s/n, CEP: 18618-000, Botucatu-SP.

² Graduando em Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinaria e Zootecnia (FMVZ) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Distrito de Rubiao Junior, s/n, CEP: 18618-000, Botucatu-SP.

³ Doutorando em Reproducao Animal pelo Departamento de Reproducao Animal e Radiologia Veterinaria, da Faculdade de Medicina Veterinaria e Zootecnia (FMVZ) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Distrito de Rubiao Junior, s/n, CEP: 18618-000, Botucatu-SP.

⁴ Mestre em Reproducao Animal pelo Departamento de Reproducao Animal e Radiologia Veterinaria, da Faculdade de Medicina Veterinaria e Zootecnia (FMVZ) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Distrito de Rubiao Junior, s/n, CEP: 18618-000, Botucatu-SP.

⁵ Mestre em Reproducao Animal pelo Departamento de Reproducao Animal e Radiologia Veterinaria, da Faculdade de Medicina Veterinaria e Zootecnia (FMVZ) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Distrito de Rubiao Junior, s/n, CEP: 18618-000, Botucatu-SP.

⁶ Professora Titular do Departamento de Reproducao Animal e Radiologia Veterinaria, da Faculdade de Medicina Veterinaria e Zootecnia (FMVZ) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Distrito de Rubiao Junior, s/n, CEP: 18618-000, Botucatu-SP.

Aspectos físicos e morfológicos do sêmen de bubalinos da raça Murrah em maturidade sexual

RESUMO

Os programas que visam aumentar a incorporação de biotecnologias reprodutivas a fim de se obter um incremento genético dos rebanhos bubalinos existentes no país e aumento da produtividade dos mesmos. Assim sendo, o objetivo do presente estudo foi avaliar as características morfológicas, a concentração, aspecto, cor, densidade e a integridade da membrana plasmática dos ejaculados de touros de diferentes idades no momento a fresco. No presente estudo foram utilizados 4 touros bubalinos para colheitas seminais utilizando vagina artificial. O sêmen fresco foi analisado quanto ao seu volume, aspecto, cor, concentração (câmara de Neubauer), morfologia realizada por microscopia de interferência diferencial (DIC) e a cinética espermática pelo sistema CASA. Em búfalos o aspecto seminal esta relacionado à concentração espermática, sendo que altas concentrações espermáticas estão relacionadas ao aspecto leitoso e baixas concentrações espermáticas ao aspecto aquoso.

Palavras-chave: Sêmen, Búfalos, Morfologia espermática.

Physical and morphological aspects of the semen of Murrah buffaloes in sexual maturity

ABSTRACT

These programs aim to increase the incorporation of reproductive biotechnologies in order to obtain a genetic increment of buffalo herds to increase their productivity. Therefore, the main aim of all semen analysis is get accuracy, objectively, fast and affordable to predict the fertility of the sample. In the present study, were used four buffalo bulls for semen collection using artificial vagina. The fresh semen was analyzed for volume, appearance, color, concentration (Neubauer chamber), morphology performed by differential interference microscopy (DIC) and sperm kinetics by CASA system. In the buffalo seminal aspect is related to sperm concentration, and in higher sperm concentrations are related to milky aspect and lower sperm concentration to the watery aspect.

Keywords: Semen, Buffalos, Sperm Morphology.

Estos programas destinados a aumentar la incorporación de la biotecnología reproductiva con el fin de obtener una mayor rebaño búfalo genética en el país y el aumento de la productividad de los mismos. Por consiguiente, el objetivo de este estudio fue evaluar las características morfológicas, la concentración, la apariencia, el color, la densidad y la integridad de la membrana plasmática de toroeyacula de diferentes edades en el momento que se enfríe. En el presente estudio, hemos utilizado 4 torosbúfalo seminales de los cultivos utilizando vagina artificial. El semen fresco se analizó para determinar el volumen, aspecto, color, concentración (cámara de Neubauer), morfología realizado por microscopía de interferencia diferencial (DIC) y la cinética de esperma por el sistema CASA. En el aspecto seminal búfalo está relacionada con la concentración de esperma, y el aumento de las concentraciones de espermatozoides están relacionadas con las concentraciones de espermatozoides lechosas y bajar el aspecto acuoso.

Palabras clave: Semen, búfalos, morfología de los espermatozoides

1 INTRODUÇÃO

2 A importância da espécie bubalina está ligada a sua dupla habilidade de
3 produção (carne e leite) e sua força de tração, levando notoriedade a espécie no cenário
4 econômico mundial e a investimentos em programas tecnológicos semelhantes aos
5 aplicados em bovinos. Estes programas visam aumentar a incorporação de
6 biotecnologias reprodutivas a fim de se obter um incremento genético dos rebanhos
7 bubalinos existentes no país e aumento da produtividade dos mesmos.

8 Portanto, o principal objetivo de todas as análises de sêmen é obter precisão, de
9 forma objetiva e rápida podendo prever a fertilidade da amostra (GILLAN et al., 2005).

10 O volume de sêmen deve ser medido imediatamente após a colheita. Varia
11 dependendo da raça, idade, tamanho, números de saltos, métodos de colheita, nutrição
12 do animal, saúde e ambiente (NAZIR, 1988). Vale (1994) e Almaguer et al. (2007)
13 sugeriram que em touros na puberdade o volume é de cerca 1 mL e de 3 mL após
14 atingirem a maturidade.

15 Koonjaenak e Rodriguez (2007) encontraram o volume de 3-4 mL em ejaculados
16 de búfalos da raça Nili-Ravi, que é semelhante ao descrito por Sajjad et al. (2007). O
17 volume de ejaculado varia dependendo da idade do touro, encontrando-se um aumento
18 de volume entre 4 a 12 anos (PANT et al., 2003). Corroborando para esses achados,
19 Nordin et al. (1990) encontraram um volume maior de ejaculado em touros adultos do
20 que nos jovens. De forma oposta, Javed et al. (2000) não encontraram diferenças
21 significativas no volume de sêmen de touros em idades diferentes.

22 A cor do ejaculado pode variar caso haja urina, sangue ou pus presente, ou
23 ainda, devido à dieta do animal. A coloração pode variar desde um acinzentado até o
24 amarelo citrino (HAFEZ, 2004).

25 A densidade do sêmen depende das variações na concentração de
26 espermatozoides. Sêmen geralmente varia do branco leitoso ao creme, com um tom
27 claro de azul, com a densidade do sêmen variando de um aquoso, leitoso, leitoso-
28 cremoso, até cremoso (CANIZALES, 2011).

29 Vale (1994) encontrou diferenças significativas na densidade entre
30 espermatozoides íntegros ou lesados. Koonjaenak e Rodriguez (2007) encontraram
31 diferenças significativas na cor e densidade no sêmen do reprodutor bubalino e estas
32 foram afetadas pela idade dos touros.

1 O número de espermatozoides é expresso em milímetros cúbicos, para se
2 determinar tal número são usados métodos tais como: contagem em câmara de
3 Neubauer e espectrofotometria (PANT et al, 2003.). A concentração espermática tem
4 grande variação (600 - 1500 milhões de células por mL) e este parâmetro é afetado por
5 condições sazonais, nutricionais e a idade dos búfalos reprodutores (LOHACHIT,
6 1987).

7 Medições mais rotineiras da concentração são feitas por um espectrofotômetro.
8 Em búfalos criados na Bahia (Brasil) foram observadas concentrações de $1166,3 \pm 17,5$
9 $\times 10^6$ espermatozoides/mL (AGUIAR, 1994). Em búfalos da raça Murrah criados na
10 Índia, Kumar et al., (1993) encontraram concentrações de $524,1 \pm 20,7$ - $1031,4 \pm 28,7 \times$
11 10^6 espermatozoides/mL. Resultados semelhantes foram observados por Rattan (1990)
12 na raça Nili-Ravi, Koonjaenak e Rodriguez (2007).

13 Javed et al. (2000) observaram menores concentrações de espermatozoides em
14 búfalos mais velhos comparados com animais mais jovens. No entanto, Younis (1996)
15 não encontrou nenhuma diferença significativa na concentração de espermatozoides
16 entre búfalos jovens e velhos.

17 O teste de viabilidade avalia a percentagem de espermatozoides íntegros e
18 lesados em um ejaculado e avalia a integridade da membrana plasmática do
19 espermatozoide. O corante preferivelmente usado é eosina-nigrosina (KOONJAENAK
20 et al., 2007).

21 A morfologia espermática avalia a percentagem de espermatozoides normais e
22 anormais em uma dada amostra. Palacios (2005) observou que a morfologia dos
23 espermatozoides é um fator determinante na capacidade de fertilização do
24 espermatozoide, uma vez que existe uma correlação entre os defeitos do esperma e a
25 infertilidade.

26 Os espermatozoides podem conter alguns defeitos de conformação, estas
27 alterações são devido à espermiogênese defeituosa, sendo por herança, enfermidade,
28 estresse por calor ou frio, exposição a condições ambientais adversas, repouso sexual
29 prolongado (mais de 60 dias), e técnicas inadequadas de manipulação do sêmen
30 (SAEED et al., 1994).

31 A maioria dos estudos que avaliaram anormalidades acrossomais foram
32 realizados utilizando a coloração de Giemsa (RAMAKRISHNAN e ARIFF, 1994). Mais
33 de 90% dos espermatozoides foram observados com acrossoma intacto em touros da
34 raça Murrah, aonde o sêmen foi avaliado com o corante Giemsa (AGUIAR, 1994;

KUMAR, 1993). Talevi et al. (1994) reportaram resultados semelhantes utilizando a fluorescência lectina.

Em estudos de Saeed et al. (1994) em touros da raça Murrah, a maior parte das alterações foram encontradas na cabeça do espermatozoide ($5,78 \pm 2,1\%$), enquanto que as anormalidades de peça intermediária foram menor que 1% e outras anormalidades variaram de $3,92 \pm 1,0\%$ a $5,7 \pm 0,4\%$. O aparecimento de gota citoplasmática foi inferior a 1%. Proporções semelhantes de anormalidades foram observadas no sêmen de búfalos da raça Murrah do Brasil (AGUIAR et al. 1994, KUMAR, 1993).

Sajjad et al. (2007) em touros da raça Nili-Ravi com idade entre 12 a 15 anos mostrou alterações de $11,67 \pm 0,90\%$, semelhantes resultados foram encontrados por Saeed (1990).

Koonjaenak e Rodriguez (2007) encontraram menos de 15% de anormalidades em espermatozoides de búfalos, onde a anormalidade mais comum foi à cabeça piriforme, seguida de acrossomas Knobbed, que é a presença de um grânulo no acrossomo, sendo de origem hereditária e está ligado diretamente com a infertilidade do animal quando encontrado em grande quantidade. A terceira anormalidade mais encontrada foi à gota citoplasmática proximal e em seguida caudas dobradas, estes resultados foram detectados por contraste de fase em microscopia de luz. Além disso, determinaram que a idade do búfalo reprodutor teve efeito significativo sobre a incidência geral de anormalidades de cabeça, defeitos do acrossoma, gota citoplasmática proximal e defeitos de cauda totais.

Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar as características morfológicas, a concentração espermática, o aspecto, a cor e a densidade dos ejaculados de búfalos de diferentes idades á fresco.

MATERIAL E MÉTODOS

Local do experimento

O experimento foi conduzido na Universidade Estadual Paulista, Fazenda Experimental Lageado, FMVZ – UNESP/Botucatu. Os animais permaneceram confinados em piquete coberto com sombrite, cercado com cerca elétrica, contendo bebedouro com fornecimento de água *ad libitum* e comedouro.

1 **Animais**

2 Dois meses antes do início do experimento sete animais mestiços da raça
3 Murrah, foram condicionados a condução por cabresto, estimulação do salto e colheita
4 de sêmen com vagina artificial. Foi utilizada uma fêmea da mesma espécie e raça como
5 manequim para o momento da colheita; e a estimulação do estro foi induzida com a
6 administração de 2,0 ml via intramuscular de Cipionato de Estradiol - ECP[®]. O cio foi
7 observado 48h após a aplicação do hormônio.

8 Para o experimento apenas quatro animais dos setes condicionados inicialmente
9 foram colhidos, pois três animais não apresentaram libido e se recusavam a montar.

10

11 **Alimentação**

12 Os sete machos ficaram confinados em baia coletiva e receberam a mesma dieta
13 composta por concentrado comercial (18% PB), sal mineral *ad libitum* e feno (Tifton
14 tipo A). A dieta foi fornecida duas vezes ao dia, pela manhã (8h) e tarde (16h),
15 mantendo sobra diária referente a 5% do fornecido.

16

17 **Colheita de sêmen**

18 Previamente ao início do experimento, os animais foram submetidos a um
19 período de adaptação de 30 dias onde foram condicionados à colheita de sêmen (duas
20 vezes por semana) e ao cabresto, sendo que após este período deu-se início ao
21 experimento. No período experimental também foram realizadas duas colheitas
22 semanais durante um mês com a finalidade de melhorar a qualidade do sêmen. A
23 colheita de sêmen foi realizada com vagina artificial modelo Botucatu (OBA, 1993)
24 com temperatura entre 42 a 46 °C, preconizada por Vale et al. (1984) e Vale (1994).
25 Durante o período experimental as colheitas foram realizadas entre os meses de agosto e
26 setembro.

27

28 **Análises do Ejaculado**

29 Na avaliação dos ejaculados foram consideradas as características macro e
30 microscópicas, sendo, portanto, as seguintes análises realizadas:

- 31 • Mensuração do volume em tubo de ensaio graduado;
- 32 • Avaliação visual do aspecto e cor;

- Contagem da concentração espermática utilizando a câmara hematocitométrica de Neubauer, em diluição de 1:200.
- Amostras de sêmen (10µl de sêmen) foram conservadas em eppendorfs contendo 1,0 mL formol salina em geladeira (4°C) para realização da porcentagem de alterações morfológicas espermáticas (cauda, cabeça, acrossoma e peça intermediária) em microscopia de interferência diferencial (DIC), observado com lâmina e lamínula na objetiva de 100X.

Análise Estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo procedimento GLM descrito no SAS 9.2 (2011). E as diferenças entre médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($p < 0,05$), sendo considerada as seguintes causas de variações idade (48, 72 e 84 meses), aspecto (aquoso e leitoso) e cor (amarela e marfim).

RESULTADOS

O volume dos ejaculados nos búfalos utilizados no presente estudo variou entre 3,14 a 4,46 mL. Quanto aos defeitos maiores, os mais encontrados no presente estudo para os espermatozoides de búfalos foram cauda fortemente dobrada ou enrolada, seguido dos defeitos de acrossoma; já para os defeitos menores, os mais frequentes foram cauda dobrada ou enrolada e gota citoplasmática distal.

A Tabela 1 apresenta os valores médios, desvio padrão e coeficiente de variância do volume, concentração espermática e defeitos maiores e menores dos espermatozoides em relação ao aspecto.

O aspecto foi significativo apenas para concentração, sendo que o ejaculado com a maior concentração de espermatozoides apresentou aspecto leitoso e a menor aspecto aquoso, para volume, defeitos maiores e menores não houve significância (Tabela 1).

Tabela 1. Valores médios, desvio padrão e coeficiente de variância, das características: Volume (VOL), concentração (CONC), defeitos maiores (DMAI), defeitos menores (DMEN) em relação ao aspecto seminal.

ASPECTO	Variáveis			
	VOL (mL)	CONC ($\times 10^9$ / mL)	DMAI (%)	DMEN (%)
Aquoso	2,25	0,35 ^b	18,75	5,07
Leitoso	3,29	0,85 ^a	20,50	5,25
Média $\pm$ DP	3,16 $\pm$ 1,06	35,41 $\pm$ 76,11	20,28 $\pm$ 9,03	5,09 $\pm$ 3,83
CV%	33,74	214,96	44,54	75,12

* Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$)

A Tabela 2 apresenta os valores médios, desvio padrão e coeficiente de variância do volume, concentração espermática e defeitos maiores e menores dos espermatozoides em relação à cor do ejaculado.

A cor foi significativa para volume e concentração espermática, sugerindo que o ejaculado de cor amarela tem relação com maior volume e concentração espermática, e a cor marfim com menores volume e concentração espermática (Tabela 2).

Tabela 2. Valores médios, desvio padrão e coeficiente de variância, das características: Volume (VOL), concentração (CONC), defeitos maiores (DMAI), defeitos menores (DMEN) em relação a cor do ejaculado.

COR	Variáveis			
	VOL (mL)	CONC ($\times 10^9$ / mL)	DMAI (%)	DMEN (%)
Marfim	2,96 ^b	0,70 ^b	20,59	5,00
Amarela	5,00 ^a	1,57 ^a	17,33	6,00
Média $\pm$ DP	3,16 $\pm$ 1,06	35,41 $\pm$ 76,11	20,28 $\pm$ 9,03	5,09 $\pm$ 3,83
CV%	33,74	214,96	44,54	75,12

* Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$)

DISCUSSÃO

O volume variou entre 3,55 a 4,46 mL, apresentando dentro da normalidade para touros bubalinos em maturidade sexual. Vale (1994) e Almaguer et al. (2007) sugerem que touros na puberdade apresentam volume de cerca 1 mL e após atingirem a maturidade de 3 mL. No presente estudo todos os animais utilizados estavam maduros sexualmente e, portanto, o volume está de acordo com o preconizado pelos autores acima citados. Para corroborar com os resultados do presente estudo, Koonjaenak e Rodriguez (2007) e Sajjad et al. (2007) relataram volumes entre 3 a 4 mL em ejaculados da raça Nili-Ravi. O volume do ejaculado varia dependendo da idade do touro,

1 encontrando um maior volume em animais de 4 a 12 anos (PANT et al., 2003). Esses
2 resultados condizem com os resultados obtidos nesse estudo, aonde touros de 4, 6 e 7
3 anos apresentaram volumes entre 3,55 a 4,46 mL, como citado acima. Também
4 corroborando com nossos achados, Nordin et al. (1990) encontraram um maior volume
5 de ejaculado em touros adultos do que nos jovens. Entretanto, Javed et al. (2000) não
6 encontraram diferenças no volume de sêmen de touros em diferentes idades.

7 Quanto aos defeitos maiores, observou-se nesse estudo um predomínio de cauda
8 fortemente dobrada ou enrolada, seguido dos defeitos de acrossoma. Os defeitos
9 menores mais encontrados foram de cauda dobrada ou enrolada e de gota citoplasmática
10 distal. Esses resultados contradizem Saeed et al. (1994), que relataram em touros da
11 raça Murrah, maior incidência de alterações de cabeça do espermatozoide ($5,78 \pm$
12 $2,1\%$), enquanto que as anormalidades de peça intermediária foram menor que 1% .
13 Esses mesmos autores relataram que o aparecimento de gota citoplasmática foi inferior
14 a 1%, o que difere do presente estudo onde a gota citoplasmática distal foi o segundo
15 maior defeito encontrado entre os defeitos menores.

16 Isso pode ter ocorrido caso a idade, tratamento, protocolos, número de colheitas
17 de sêmen e manejo usados pelos autores, sejam diferentes do utilizado no experimento,
18 influenciando em alterações diferentes nos espermatozoides dos búfalos. Porém ambos
19 os trabalhos apresentam percentagens de defeitos morfológicos espermáticos dentro da
20 faixa da normalidade (30%).

21 Semelhante aos dados obtidos neste estudo, Koonjaenak e Rodriguez (2007)
22 determinaram que a idade do búfalo reprodutor tem efeito significativo sobre a
23 incidência geral de anormalidades de cabeça, defeitos do acrossoma, gota citoplasmática
24 proximal e defeitos de cauda totais. Neste estudo foi observada uma maior incidência de
25 alterações morfológicas em animais mais velhos. Contudo, os animais mais velhos
26 empregado nesse estudo tinham apenas sete anos, o que é compatível com touros em
27 reprodução normal (OBA, 1993) e o quadro espermático observado estão dentro dos
28 valores normais de patologia espermática.

29 O aspecto foi significativo apenas para concentração, sendo observado que a
30 maior concentração de espermatozoides apresentou aspecto leitoso (HAFEZ, 2004).

31 A cor foi significativa para volume e concentração espermática, inferindo que o
32 ejaculado de cor amarela tem relação com volume e concentrações maiores, e a cor
33 marfim com volume e concentrações menores. De forma similar ao presente estudo
34 Canizales (2011) relatou que a densidade do sêmen depende das variações na

concentração de espermatozoides. Esse mesmo autor relatou que o sêmen geralmente varia do branco leitoso ao creme, com um tom claro de azul, com a densidade do sêmen variando de um aquoso, leitoso, leitoso-cremoso, até cremoso. É sabido que a coloração do sêmen varia de acordo com a idade, alimentação e presença de outros elementos (HAFEZ, 2004) e não foi encontrado na literatura nenhum trabalho que relacionasse a cor com o volume e a concentração seminal.

CONCLUSÃO

Em búfalos o aspecto seminal está relacionado à concentração espermática, sendo que altas concentrações espermáticas estão relacionadas ao aspecto leitoso e baixas concentrações espermáticas ao aspecto aquoso.

REFERÊNCIAS

- ALMAGUER, P., 2007. El búfalo una opción de la ganadería. **Revista electrónica de Veterinaria VIII**: 8.
- AGUIAR, P., ANDRADE, V., ABREU, J. GOMEZ, A., 1994. Physical and morphological semen characteristics of buffaloes aged from four to eight years old. **Proc. 4th Int. Buffalo Congr.**, Sao Paulo, Brazil. 3: 486–488
- CANIZALES, S.A. Características seminales del Búfalo de agua (*Bubalus bubalis*). **Revista Colombiana de Ciencia Animal** , Vol. 4, N. 1, p.95-102 , 2011.
- GILLAN, L., EVANS, G., MAXWELL, W.M.C., 2005: Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. **Theriogenology** 63, 445–457.
- HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**. 7ed. Barueri: Editora Manole Ltda, 2004. 107 e 369 a 394 p.
- JAVED, M. T., KHAN, J.R., KAUSAR, P., 2000 Effect of age and season on some semen parameters of Nili- Ravi buffalo (*Bubalus bubalis*) bulls. **Vet. Arhiv.** 70: 83- 94.
- KOONJAENAK, S., RODRIGUEZ-MARTINEZ. M., 2007. Assessment of semen quality in Swamp Buffalo AI Bulls in Thailand. **Ital J Anim Sci.** 6(Suppl. 2): 701-704.

- 1 KUMAR, S., SAHNI, K.L., BENJAMIN, B.N., MOHAN, G., 1993. Effect o various
2 levels of yolk on deep freezing and storage of buffalo semen in different diluters
3 without adding glycerol. **Buffalo J.** 1: 79–85.
- 4 LOHACHIT, C., 1987. Anatomy and clinical examination on female reproductive org
5 of swamp buffalo reproduction. **Ed Thailand.** 93-1001
- 6 NAZIR, M., 1988. Semen evaluation and sperm morphology. Monograph on
7 Reproductive Pattern of Riverine Buffaloes and Recommendations to Improve Their
8 Reproductive Performance at Small Farmer Level. **Pakistan Agri. Res. Council,**
9 Islamabad, Pakistan.
- 10 NORDIN, W., HILMI, M., BONGSO, T. A., 1990. Semen characteristics related to age
11 in growing swamp buffalo (*Bubalus babalis*). **Buffalo J.** 2: 161-6.
- 12 OBA, E.; FUCK, E.J.; BICUDO,S.D.;PAPA, F.O.; OHASHI,O.M. Estudo preliminar
13 de diferentes meios para congelação de sêmen de búfalos. **Congresso Brasileiro de**
14 **Medicina Veterinária**, 10, Belo Horizonte. Anais... Belo Horizonte: Colégio Brasileiro
15 de Reprodução Animal, 1993, v.2, p.337
- 16 PALACIOS, C., 2005. Técnicas para la evaluación de la capacidad fecundante de
17 espermatozoides. **Memorias posgrado de reproducción bovina.** CGR Colombia.
- 18 PANT, H. C., SHARMA, R. K., PATEL, S. H., SHUKLA, H. R., MITTAL, A. K.,
19 KASIRAJ,R., MISRA, A. K., PRABHAKAR, J. H., 2003. Testicular develop- ment and
20 its relationship to semen production in Murrah buffalo bulls. **Theriogenology.** 60: 27-
21 34.
- 22 RAMAKRISHNAN, P., ARIFF, M., 1994. Effect of glycerol level and cooling rate on
23 post-thaw semen quality of Malaysian swamp buffalo. **Proc. 4th Int. Buffalo Congr.,**
24 Sao Paulo, Brazil. 3: 540–542.
- 25 RATTAN, P.J.S., 1990. Physico–chemical constituents of buffalo bull semen. In:
26 Acharya, R.M. Lokeshwar, R.R., Kumar, S. Eds. **Recent Advances in Buffalo**
27 **Research.** 3: 26–30.

- 1 SAEED, A., CHAUDHRY, R., KHAN, I.H., KHAN, N.U., 1990. Morphology of
2 semen buffalo bulls of different age groups. In: Acharya, R.M. **Recent Advances in**
3 **Buffalo Research**. 3: 17–19.
- 4 SAJJAD, S. AKHTER., ANDRABI H., 2007. Blood Serum Testosterone Level and its
5 Relationship With Scrotal Circumference and Semen Characte-
6 ristics in Nili-Ravi Bufalo Bulls. **Pakistan Vet. J.** 27(2): 63-66
- 7 TALEVI, R., PELOSI, S., SANSONE, G., GRASSO, F., MATASSINO, D., 1994.
8 Effects of different pre-freezing rates on buffalo sperm. Motility and ultrastructure
9 preservation. **Proc. 4th Int. Buffalo Congr.**, Sao Paulo, Brazil. 3: 537–539.
- 10 VALE, W.G. Collection, processing and deep freezing of buffalo semen. **Buffalo**
11 **Journal**, v.2, p . 65-81. 1994.
- 12 VALE, W.G.; RIBEIRO, H.F.L.; SOUSA, J.S.; OHASHI, O.M. Inseminação artificial
13 em búfalos(*Bubalus bubalis*) na região amazônica. **Congresso Brasileiro de Medicina**
14 **Veterinária**, 19, Belém. Anais...1984, p. 91.
- 15 YOUNIS, M., 1996. Studies on semen quality, freezability and fertility of buffalo bulls
16 during low and peak breeding seasons. PhD Thesis, **Univ. Agri. Faisalabad, Pakistan**
- 17
- 18
- 19
- 20
- 21
- 22
- 23
- 24
- 25
- 26
- 27

1 Normas da revista Veterinária e Zootecnia

2

3 Diretrizes para Autores

4 • Artigos Científicos

5 Devem ser estruturados de acordo com os seguintes itens:

6 **1. Página de rosto, com:** Título do trabalho em português, em inglês e em espanhol,
7 fonte Times New Roman, tamanho 12, com espaçamento simples, em negrito e
8 centralizado, em letra maiúscula. Quando necessário, indicar a entidade financiadora da
9 pesquisa, como primeira chamada de rodapé;

10 Em caso de envolvimento de seres humanos ou animais de experimentação,
11 encaminhar o parecer da Comissão de Ética ou equivalente, assinalando, no trabalho,
12 antes das referências, a data de aprovação.

13

14 **2. Página com resumo, abstract e resumen:** Tanto o resumo, como o abstract e o
15 resumen devem ser seguidos do título do trabalho, no respectivo idioma, e conter no
16 máximo 400 palavras cada um, com informações referentes à introdução, metodologia,
17 resultados e conclusões. O texto deve ser justificado e digitado em parágrafo único e
18 espaço simples, começando por RESUMO. O abstract, e o resumen devem ser tradução
19 fiel do resumo. Independente da língua em que o artigo for apresentado, deverá conter o
20 resumo em português, inglês e espanhol.

21 Devem conter, no máximo, cinco palavras-chave, keywords, e palabras clave
22 que identifiquem o conteúdo do texto.

23

24 **3. A estrutura do artigo deverá conter:**

25

26 **Introdução:** Deve ser clara, objetiva e relacionada ao problema investigado e à
27 literatura pertinente, bem como aos objetivos da pesquisa. A introdução estabelece os
28 objetivos do trabalho.

29

30 **Material e Métodos:** Deve oferecer informações de reprodutibilidade da pesquisa, de
31 forma clara e concisa, como variáveis, população, amostra, equipamentos e métodos
32 utilizados, inclusive os estatísticos.

33

1 **Resultados:** Apresentação dos resultados obtidos, que devem ser descritos sem
2 interpretações e comparações. Poderá ser sob a forma de tabelas, no máximo de cinco,
3 ordenadas em algarismos arábicos e encabeçadas pelo título, de acordo com as normas
4 de apresentação tabular da ABNT/WBR 6023/2000 da Associação Brasileira de Normas
5 Técnicas, identificadas no texto como Tabela; sob a forma de figuras, nos casos de
6 gráficos, fotografias, desenhos, mapas, etc., ordenadas em algarismos arábicos, até no
7 máximo de seis, e citadas no texto como Figura.

8

9 **Discussão:** Deve ser entendida como a interpretação dos resultados, confrontando com
10 a literatura pertinente, apresentada na introdução. Se julgar conveniente, os resultados e
11 a discussão poderão ser apresentados conjuntamente.

12

13 **Conclusões:** É a síntese final, fundamentada nos resultados e na discussão.

14

15 **Referências:** Devem ser apresentadas de acordo com as normas Vancouver
16 (<http://www.icmje.org/>).

17

18 Deverão ser editorados em Microsoft Word for Windows, para edição de textos,
19 Excel (qualquer versão) para gráficos, formato JPEG ou GIF (imagem) para fotografias,
20 desenhos e mapas, formato A4 (21,0 x 29,7 cm), em espaço simples, mantendo margens
21 de 2,5 cm, nas laterais, no topo e pé de cada página, fonte Times New Roman, tamanho
22 12 e numeração consecutiva das páginas em algarismos arábicos, a partir da folha de
23 identificação. Deverão também apresentar numeração nas linhas, reiniciando a
24 contagem a cada nova página. Ilustrações e legendas devem ser apresentadas no
25 decorrer do texto. Não serão fornecidas separatas. Os artigos estarão disponíveis no
26 formato PDF no endereço eletrônico da revista. Para as demais seções da revista são
27 válidas as normas anteriores. Não devem exceder a 15 páginas. Abreviaturas não usuais
28 devem ser empregadas após escritas por extenso na primeira utilização.