



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA  
INSTITUTO DA SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL  
COORDENADORIA DO CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**MARINA BEZERRA MACEDO**

**ANÁLISE ESPERMÁTICA DE SÊMEN CONGELADO DE  
BUBALINO ATRAVÉS DA MICROSCOPIA DE  
INTERFERÊNCIA DIFERENCIAL**

**BELÉM - PARÁ  
2019**

**MARINA BEZERRA MACEDO**

**ANÁLISE ESPERMÁTICA DE SÊMEN CONGELADO DE  
BUBALINO ATRAVÉS DA MICROSCOPIA DE  
INTERFERÊNCIA DIFERENCIAL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao de Curso de Medicina Veterinária e ao Instituto da Saúde e Produção Animal (ISPA) da Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), como requisito para obtenção ao grau de Bacharel em Medicina Veterinária. Área de Concentração: Reprodução Animal.

**Orientador: Haroldo Francisco Lobato Ribeiro.**

**BELÉM - PARÁ  
2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Bibliotecas da Universidade Federal  
Rural da Amazônia

Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

Macedo, Marina Bezerra

Análise espermática de sêmen congelado de bubalino através da microscopia de interferência diferencial / Marina Bezerra Macedo. – Belém, 2019.

42 f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina Veterinária) - Campus universitário de Belém, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2019.

Orientador: Dr. Haroldo Francisco Lobato Ribeiro.

1. Bufálos 2. Bulbalinocultura 3. Bubalinos - Espermas – Criopreservação 4. Bufálos - Espermas I. Ribeiro, Haroldo Francisco Lobato, *orient.* II. Título.

---

**CDD - 636.292**

**MARINA BEZERRA MACEDO**

**ANÁLISE ESPERMÁTICA DE SÊMEN CONGELADO DE BUBALINO  
ATRAVÉS DA MICROSCOPIA DE INTERFERÊNCIA DIFERENCIAL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural da Amazônia como requisito para obtenção do grau de bacharel em Medicina Veterinária, Área de concentração: Reprodução Animal.

**12/07/2019**

---

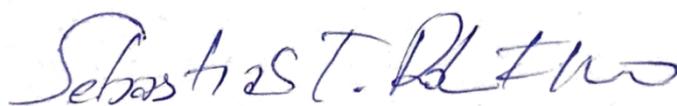
**Data da aprovação:**

**Banca examinadora:**



\_\_\_\_\_  
Orientador e Presidente

**Prof. Dr. Haroldo Francisco Lobato Ribeiro**  
Professor Titular do Setor de Reprodução Animal/Universidade Federal Rural da Amazônia



\_\_\_\_\_  
Membro Titular

**Prof. Dr. Sebastião Tavares Rolim Filho**  
Setor de Reprodução Animal/Universidade Federal Rural da Amazônia



\_\_\_\_\_  
Membro Titular

**Dr. Henry Daniel Manrique Ayala**  
Médico Veterinário

Aos meus pais **Ana Paula Bezerra Macedo** e  
**Ubiracildo da Silva Macedo**  
Pelo amor, dedicação por nunca me deixar faltar  
nada e por ser a minha base.  
A vocês toda a minha gratidão e é por vocês que eu  
consegui chegar no final dessa jornada.  
Meu amor eterno a vocês.  
**Dedico**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por tudo, por ele sempre ter sido maravilhoso comigo e por ter me ajudado nos momentos de dificuldade, que não fizeram desistir da minha jornada. A ele todo o meu amor!

Agradeço aos meus pais, Ubiracildo da Silva Macedo e Ana Paula Bezerra Macedo. Minha mãe sempre me dando os melhores conselhos, que me deu muito amor e que eu me espelho nela para algum dia chegar perto da mulher e mãe maravilhosa que ela é. Meu pai que sempre me protegeu quando eu precisei e que cuidou de mim no momento que eu mais precisava, demonstrando o seu amor em uma simples bom dia todos os dias durante esses cinco anos. Para vocês eu quero ser motivo de orgulho. Amo muito vocês!

Aos meus irmãos Saulo Bezerra Macedo e Paula Bezerra Macedo, que me encham de orgulho por quem eles se tornaram e que são os melhores amigos que alguém pode ter. Muita admiração por vocês!

Agradeço ao meu orientador Prof, Dr. Haroldo Francisco Lobato Ribeiro pela oportunidade de bolsa de iniciação científica, por todos os conselhos dados e pelos puxões de orelha que eu recebi ao longo desses cinco anos. Sem você nada disso seria possível, meu estágio na reprodução e os anos de aprendizado.

Ao professor Dr. Sebastião Tavares Rolim Filho, todo o meu reconhecimento e amizade, ele que sempre me ajudou com conselhos ajudando na minha vida pessoal e acadêmica, corrigindo os trabalhos, e que se tornou um segundo pai para mim, por ter um coração de ouro.

Aos meus amigos do Setor de Reprodução Animal, meu agradecimento eterno. São pessoas maravilhosas, que ajudam quem precisar e é aquele grupo que me completa. SRA e GERAP, vocês fizeram parte da minha história. Aos amigos Luis Américo, Ramon, Jessica Camurça, Danilo, Iago, Carol, Paulo, Diego, Louise, Eliene e todos os amigos estagiários da reprodução, obrigada, a amizade de vocês foi muito importante.

Anelise, eu te agradeço pela sua paciência em me ensinar como fazer meu tcc e aos ensinamentos compartilhados ao longo desses anos. Você é dez! Meus agradecimentos também aos residentes que já saíram e aos que ainda estão na reprodução. Obrigada Wilton, Alvaro, e Cláudia pelos ensinamentos compartilhados. Obrigada Victor pelos puxões de orelha, pela ajuda no meu estágio e por sua amizade. Ao Raphael por sempre me explicar aqueles casos mais complexos do hospital. Obrigada a todos!

Ao Gustavo Alighiere Lopes da Silva, o meu agradecimento e admiração nesses anos de graduação em que ele me ajudou em trabalhos da reprodução me ensinando e me proporcionando estágios nessa área. Foi uma parte importante na minha graduação e na minha vida. Obrigada!

Agradeço a família Bezerra que me ajudou muito desde que vim morar em Belém, sendo meu suporte quando meus pais não estavam aqui e que sempre me apoiaram em tudo. Obrigada vovó Celita por tudo e familiares, amo vocês! Agradeço também a família Macêdo que me acompanhou de longe mas sempre torcendo pelo meu sucesso. Obrigada vó Odaléia, a senhora não sabe o quanto faz falta!

Agradeço aos meus amigos que eu tenho desde o início da graduação e que me ajudaram nos trabalhos da UFRA e me aconselhando na vida. Esse sim são amigos que eu vou levar no meu coração. Obrigada Ariel, Camila, Luanna, Josiélen, Rosicléia, Liliane, Helder, Adriel, Rosekelly, Jessica Andrade, Ronaldo e todos os amigos do happy hour de sexta-feira.

Meu agradecimento ao Laboratório de pesquisa Carlos Azevedo, e ao professor Edilson Matos e ao doutorando Diego, por ceder o local e o microscópio para a realização da pesquisa.

E por fim, agradeço a todos os animais que me ajudaram a seguir a carreira da Medicina Veterinária e aos amigos e familiares que me apoiaram direta ou indiretamente para que eu pudesse levar para frente o meu sonho nesses cinco anos vividos pela UFRA de me tornar enfim Médica Veterinária. Minha eterna gratidão a todos!

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”  
(José de Alencar)

## RESUMO

**MACEDO, M. B. Análise espermática de sêmen congelado de bubalino através da microscopia de interferência diferencial.** [Spermal analysis of bubalino frozen semen through differential interference microscopy]. 2019. 42 f. Monografia (TCC em Reprodução Animal) – Coordenadoria do Curso de Medicina Veterinária, Instituto da Saúde e Produção Animal, Universidade Federal Rural da Amazônia, Pará, 2019.

Objetivou-se com esse trabalho avaliar o efeito dos diluidores TES-TRIS, TRIS, Citrato e Lactose na criopreservação seminal de bubalinos, através da microscopia de interferência diferencial. Foram utilizados quatro bubalinos da raça Murrah em plena atividade sexual. O sêmen foi coletado por vagina artificial em duas coletas com um total de 32 amostras e após a colheita, cada amostra foi submetida a análises qualitativas e quantitativas. Os ejaculados foram fracionados e diluídos nos quatro diluidores. O sêmen diluído foi envasado em palhetas de 0,25 ml e submetidos a um tempo de equilíbrio de quatro horas a 5°C com posterior congelamento em nitrogênio líquido. As amostras foram descongeladas a 37° C por 30 segundos e avaliadas quanto a motilidade, vigor e morfologia espermática. Após a descongelamento do sêmen, observou-se diferença estatística na motilidade espermática, sendo que no sêmen *in natura* se observou 91±0,1% reduzindo para 53% ± 0,2 em TES-TRIS, 36% ± 0,1 em TRIS, 22% ± 0,1 em citrato e 40% ± 0,2 em lactose e ao comparar entre os quatro diluidores, apenas o TES-TRIS e o citrato mostraram diferenças estatísticas significativas com TES-TRIS com melhor resultado. Após o descongelamento, o vigor espermático teve diferença estatística entre citrato com 1,6 ± 1,1 e TES-TRIS com 3,3 ± 1,2, apresentando o TES-TRIS como melhor diluidor em relação ao vigor. Quanto as principais patologias encontradas, a única que teve diferença estatística foi cauda fortemente dobrada entre TRIS (10,1 ± 8,7) e citrato (2,3 ± 1,4), onde o citrato apresentou melhores resultados com menor número de cauda fortemente dobrada. Diante dos resultados observados, é possível concluir que o melhor resultado quanto a morfologia espermática foi o citrato e em relação as características físicas (motilidade e vigor) o melhor resultado foi o TES-TRIS utilizados como criopreservador de sêmen bubalino. A avaliação pela microscopia de interferência diferencial foi considerada uma boa ferramenta para análise de sêmen criopreservado de búfalos, mostrando resultados satisfatórios.

**Palavras-chave:** Bubalinocultura, criopreservação, diluidor, morfologia, microscopia.

## ABSTRACT

MACEDO, M. B. **Spermal analysis of bubalino frozen semen through differential interference microscopy.** [Análise espermática de sêmen congelado de bubalino através da microscopia de interferência diferencial.]. 2019. 42 f. Monografia (TCC em Reprodução Animal) – Coordenadoria do Curso de Medicina Veterinária, Instituto da Saúde e Produção Animal, Universidade Federal Rural da Amazônia, Pará, 2019.

The objective of this work was to evaluate the effect of TES-TRIS, TRIS, Citrate and Lactose diluents on the seminal cryopreservation of buffaloes, through differential interference microscopy. Four buffalo of the Murrah breed were used in full sexual activity. The semen was collected by artificial vagina in two collections with a total of 32 samples and after the harvest, each sample was submitted to qualitative and quantitative analyzes. The ejaculates were fractionated and diluted in the four diluents. The diluted semen was filled into 0.25 ml vats and subjected to an equilibration time of four hours at 5 ° C with subsequent freezing in liquid nitrogen. Samples were thawed at 37 ° C for 30 seconds and evaluated for motility, vigor and sperm morphology. After semen thawing, a statistically significant difference was observed in sperm motility, with  $91 \pm 0.1\%$  being observed in semen in natura, reducing to  $53\% \pm 0.2$  in TES-TRIS,  $36\% \pm 0.1$  in TRIS,  $22\% \pm 0.1$  in citrate and  $40\% \pm 0.2$  in lactose and when comparing the four diluents, only TES-TRIS and citrate showed statistically significant differences. After thawing, sperm vigor had a statistical difference between citrate with  $1.6 \pm 1.1$  and TES-TRIS with  $3.3 \pm 1.2$ , presenting the TES TRIS as the best diluent in relation to vigor. As for the main pathologies found, the only statistically significant difference was a strongly folded tail between TRIS ( $10.1 \pm 8.7$ ) and citrate ( $2.3 \pm 1.4$ ), where citrate presented better results with lower tail number heavily folded. Considering the observed results, it is possible to conclude that the best result regarding sperm morphology was citrate and in relation to the physical characteristics (motility and vigor) the best result was the TES-TRIS used as a buffalo semen cryopreservant. Differential interference microscopy was considered a good tool for the analysis of cryopreserved semen of buffalo, showing satisfactory results.

**Keyword:** Bubalinoculture, cryopreservation, thinner, morphology, microscopy.

**LISTA DE ILUSTRAÇÕES**

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Coleta de sêmen por método de vagina artificial.....	26
<b>Figura 4.</b> Descongelção de palheta de sêmen em banho-maria a 37°C.....	28
<b>Figura 5.</b> Anormalidades morfológicas observadas no sêmen de bubalinos em microscopia de interferência diferencial com aumento de 100 X. A) Normal; B) Cauda dobrada; C) Gota citoplasmática proximal; D) Cauda fortemente enrolada. ....	29
<b>Figura 6.</b> Espermatozoide com peça intermediária dupla no DIC.....	29
<b>Figura 8.</b> Espermatozoide com implantação abaxial no DIC.....	30
<b>Figura 10.</b> Microscópio de interferência diferencial AX10 Scope A.1.....	31
<b>Figura 11.</b> Imagem de microscopia de interferência diferencial durante avaliação de sêmen bubalino, em aumento de 40 X.....	32

**LISTA DE TABELAS**

	<b>Pág.</b>
<b>Tabela 1.</b> Motilidade e vigor espermático do sêmen de búfalos congelado com diferentes tipos de diluidores.....	33
<b>Tabela 2.</b> Principais patologias encontradas nos espermatozoides de sêmen bubalino descongelado. ....	35
<b>Tabela 3.</b> Defeito maior, defeito menor e defeito total encontradas no sêmen de búfalos criopreservado com diferentes diluidores.....	36

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

<b>ASMA:</b>	Análise computadorizada da morfometria espermática
<b>ATP:</b>	Adenosina trifosfato
<b>CASA:</b>	Computer Assisted Sperm Analysis
<b>DIC:</b>	Microscopia de Contraste Diferencial de Interferência
<b>DMSO:</b>	Dimetilsulfóxido
<b>km:</b>	Kilômetro
<b>mg:</b>	Miligrama
<b>ml:</b>	Mililitro
<b>mOsm:</b>	Miliosmol
<b>PSA:</b>	Antígeno Prostático Específico
<b>RPM:</b>	Rotações por minuto
<b>SRA:</b>	Setor de Reprodução Animal
<b>UFRA:</b>	Universidade Federal Rural da Amazônia

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	17
<b>2.1 Geral</b> .....	17
<b>2.2 Específicos</b> .....	17
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	18
<b>3.1 Criopreservação de sêmen bubalino</b> .....	18
<b>3.2 Diluidores de sêmen (TES-TRIS, TRIS, Citrato e Lactose)</b> .....	20
<b>3.3 Avaliação seminal de bubalinos</b> .....	22
<b>3.4 Microscopia de interferência diferencial</b> .....	23
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	25
<b>4.1 Animais e local</b> .....	25
<b>4.2 Coleta e avaliação do sêmen <i>in natura</i></b> .....	25
<b>4.3 Diluidores de sêmen</b> .....	26
<b>4.4 Criopreservação</b> .....	27
<b>4.5 Avaliação pós-criopreservação</b> .....	27
<b>4.6 Defeitos maiores e menores</b> .....	28
<b>4.7. Microscopia de interferência diferencial</b> .....	31
<b>4.8 Análise estatística</b> .....	32
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	33
<b>5.1 Motilidade e vigor</b> .....	33
<b>5.2 Principais patologias</b> .....	35
<b>5.3 Defeitos maiores e menores</b> .....	36
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	37
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	38

## 1 INTRODUÇÃO

A espécie bubalina apresenta grande importância no cenário econômico nacional e mundial, devido sua dupla habilidade de produção (carne e leite) e sua força de tração, ocasionando cada vez mais investimentos em programas tecnológicos semelhantes aos aplicados em bovinos. Estes programas que usam as biotecnologias reprodutivas como forma de obter um maior ganho genético nos rebanhos bubalinos existentes no país, aumentam a produtividade dos mesmos (ZORZETTO et al., 2016).

Segundo dados do MAPA (2016), o Brasil apresenta uma população total de 1,29 milhões de bubalinos, sendo que a maior população desses animais é encontrada no estado do Pará com 491 mil cabeças, seguido do Amapá com 271 mil e São Paulo com 95 mil. Estes animais foram introduzidos no Brasil no final do século passado, inicialmente na ilha do Marajó, no Pará, sendo as raças mais comuns no território nacional são: Mediterrâneo, Murrah, Jafarabadi e Carabao.

Devido a sua capacidade de adaptação, o búfalo doméstico (*Bubalus bubalis*) pode ser encontrado em vários países do mundo e criado em diferentes condições geográficas e climáticas. Como em outros animais, a criação de búfalo depende principalmente de técnicas de reprodução bem-sucedidas (PHOGAT et al., 2016). As variações nas características reprodutivas e produtivas são expressões resultantes de fatores genéticos e ambientais. Em geral as causas genéticas têm individualmente menor influência em comparação aos fatores ambientais, incluindo-se o clima, manejo, nutrição e doenças (TORRES-JUNIOR, 2016).

A participação da espécie bubalina na produção de alimento nas áreas tropicais e subtropicais aumenta consideravelmente. A criação de búfalos destaca-se por ser uma atividade capaz de incluir pequenos produtores no cenário produtivo, já que estes animais apresentam capacidade de sobreviver em locais inóspitos aos bovinos, docilidade, alto valor agregado em seus produtos derivados e maior rendimento industrial do leite de búfalos em relação ao de bovino (VIEIRA et al., 2011). O leite de búfala contém maior teor de proteínas, vitaminas A, D e B2, além de lipídeos, porém com menor teor de colesterol. Já a carne de búfalo por sua vez é considerada tendo 40% menos colesterol, 12 vezes menos gorduras totais, 55% menos calorias, 11% a mais de proteínas e 10 % a mais de minerais, se comparada a carne bovina (ABCB, 2013).

Esse crescimento na bubalinocultura provoca aumento da necessidade por animais selecionados e geneticamente capazes de alavancar a produtividade dos rebanhos.

Todavia, para esse incremento se tornar viável, uma das alternativas mais promissoras é a utilização de biotécnicas aplicadas à reprodução animal, como meio disseminador de características genéticas desejáveis a fim de melhorar a eficiência reprodutiva e produtiva dos animais (OHASHI et al., 2003).

Com a descoberta há 50 anos atrás do uso do glicerol como crioprotetor, o armazenamento de sêmen foi revolucionado. De acordo com Holt (2000), essa inovação possibilitou que os espermatozoides pudessem ser congelados por um período mais prolongado e depois usados com sucesso na inseminação artificial e mais tarde, em programas de produção *in vitro* de embriões (LEIBFRIED-RUTLEGE, 1999).

Apesar dessas e de outras vantagens do uso da criopreservação, sabe-se que alguns processos de congelamento podem afetar o potencial de fertilidade em muitos aspectos, como no decréscimo da motilidade, na alteração da membrana celular, na diminuição da integridade do acrossomo e na indução da fragmentação de DNA (CIPRIANO; FREITAS, 2013)

Por isso, para minimizar esses efeitos, é necessário que se apliquem protocolos e meios diluidores adequados. Esses protocolos irão variar de acordo com as características intrínsecas do sêmen da espécie em questão, pois existem variações de perfil de lipídeos, concentrações de sais, entre outros, no plasma seminal e membranas espermáticas que proporcionarão exigências diferentes entre as espécies (WATSON, 2000).

Nesse contexto, novos diluidores vêm sendo testados especialmente porque muitas das substâncias utilizadas são importadas e tem um preço elevado. Enquanto alguns procedimentos para a conservação do sêmen são relativamente simples, outros como a criopreservação tornam-se mais complexos e requerem um conhecimento da fisiologia do trato genital masculino e dos espermatozoides, bem como o uso de diferentes compostos produtos químicos que podem servir como substratos, crioprotetores para agentes antimicrobianos, nutrição e proteção do sêmen durante as diferentes etapas do processo, a fim de obter células viáveis no pós-congelamento (VALE, 2011). Frente ao exposto, o presente estudo objetivou avaliar o efeito dos diluidores TES TRIS, TRIS, citrato e lactose na criopreservação seminal de bubalinos, utilizando a microscopia de interferência diferencial.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Avaliar o efeito dos diferentes diluidores na criopreservação do sêmen de búfalos, através da microscopia de interferência diferencial.

### **2.2 Específicos**

Avaliar os efeitos deletérios de diferentes diluidores (TES-TRIS, TRIS, citrato e lactose) na morfologia espermática de búfalos;

Avaliar o efeito de diferentes diluidores nas características físicas do sêmen de búfalos.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Criopreservação de sêmen bubalino

O processo de criopreservação, possibilita a utilização por um longo período (refrigeração) ou indeterminado (congelamento), reduzindo assim, riscos e custos com aquisição e transporte de reprodutores, ainda favorece a difusão rápida do material genético entre locais distantes (CASTELO et al., 2008). Todavia, a criopreservação de sêmen gera um grande estresse celular, impondo aos espermatozoides condições extremamente desfavoráveis à manutenção de sua viabilidade (PURDY, 2006).

Os danos causados aos espermatozoides durante o processo de criopreservação podem resultar na redução de células viáveis. Iniciam-se na membrana plasmática atingindo posteriormente a membrana acrossomal e por último as membranas mitocondriais afetando o movimento progressivo dos espermatozoides e consequentemente a fertilidade (WATSON, 2000).

Além do melhoramento genético, o congelamento de sêmen serve como banco de reserva genética para animais de alto padrão racial e comercial, propiciando maior intercâmbio entre criatórios das mais variadas regiões e países e selecionando indivíduos e linhagens quanto à sua fertilidade e congelabilidade. A criopreservação também contribui para minimizar perdas econômicas advindas da morte de reprodutores de alto valor comercial ou que participem de programas de revitalização de raças, para a preservação contra a extinção de raças nativas e conservação de espécies ameaçadas (WATSON, 2000).

O primeiro congelamento bem-sucedido de sêmen de búfalo foi relatado por Roy (1957) e Basirov (1964) sendo o primeiro a relatar prenhez de bubalino com sêmen descongelado. O princípio básico para o congelamento de sêmen em bubalinos é semelhante às demais espécies domésticas. Portanto é necessário que o ejaculado seja diluído com meios diluidores ou extensores, e seja submetido a uma curva de resfriamento e tempo de equilíbrio, para posteriormente ser realizada uma curva de congelamento e então armazenamento em nitrogênio líquido. Correto binômio tempo/temperatura também são muito importantes no descongelamento para obtenção de um sêmen de boa qualidade (BRITO, 2014).

No processo de congelamento, quando uma suspensão de espermatozoides é resfriada abaixo de 0°C, cristais de gelo extracelulares começam a se formar. Isso resulta

em aumento da concentração de sais no líquido extracelular. A proporção de água cristalizada como gelo e conseqüentemente a osmolaridade da solução remanescente, dependem da temperatura. Inicialmente a água do interior do espermatozóide não se congela, mas é resfriada abaixo do ponto de congelamento. A água se move do interior do espermatozóide para o meio extracelular, desidratando progressivamente a célula. Se a velocidade de congelamento é muito lenta, a alta concentração de sais intracelulares causada pela desidratação pode danificar o espermatozóide; se a taxa de congelamento for muito rápida, cristais de gelo intracelular podem se formar. A taxa de congelamento adequada é um equilíbrio entre esses fatores (MAZUR, 1984).

Se a redução do volume celular atingir um nível mínimo crítico, a bicamada de fosfolípídeos da membrana celular fica muito comprimida e sua estrutura se quebra. Com isso, as funções de transporte e proteção da membrana não podem ser mantidas. Ao mesmo tempo, rupturas da membrana promovem uma ponte para entrada do gelo extracelular para o interior da célula. Dessa forma, para que uma substância tenha boa ação crioprotetora, deve atuar elevando a osmolaridade intracelular, para controlar a desidratação e ainda interagir com a membrana celular, estabilizando-a (AMANN; PICKETT, 1987).

Os crioprotetores podem ser classificados como penetrantes (micromoléculas) ou não penetrantes (macromoléculas) de acordo com sua capacidade de atravessar as membranas celulares (HAMMERSTEDT, 1990). O glicerol e outras substâncias como metanol, etilenoglicol, 1,2-propanodiol, butanodiol, acetamida e DMSO são enquadrados como penetrantes, pois agem no interior da célula (HOLT, 2000).

O efeito protetor do glicerol nos espermatozóides parece estar associado as suas propriedades coligativas, a redução do ponto de congelamento e a conseqüente redução da concentração de eletrólitos na fração não congelada da célula. Isto ajudaria a conter o prejudicial “efeito solução”, que é causado pelo aumento da pressão osmótica no meio extracelular, em função da concentração de solutos na porção de água ainda não congelada, que ocorre durante o processo de congelamento. Ou seja, o glicerol penetrando na célula, provoca rápida saída de água intracelular seguido de lento retorno do volume interno inicial (HOLT, 2000).

O grupo dos crioprotetores não penetrantes inclui as proteínas, açúcares de elevado peso molecular, polivinilpirrolidona, entre outros, que atuam através de mecanismo osmótico promovendo a desidratação celular, durante o congelamento e

impedindo a formação de cristais de gelo no interior da célula, por restaurar o percentual de água ao redor dos grupos polares da cabeça dos fosfolipídios (HOLT, 2000).

### **3.2 Diluidores de sêmen (TES-TRIS, TRIS, Citrato e Lactose)**

Os diluidores devem ser capazes de proteger as diferentes estruturas do espermatozoide em todas as etapas do processo de criopreservação. Portanto, além da diminuição do plasma seminal, os diluidores possuem componentes que mantêm a osmolaridade adequada e o equilíbrio eletrolítico do meio, controlam o crescimento bacteriano, proporcionam o tamponamento de pH e fornecem nutrientes como fonte de energia aos espermatozoides. Os diluidores seminais também possibilitam aumento do volume do ejaculado, protegem os espermatozoides (membranas plasmáticas) dos efeitos danosos das mudanças térmicas (choque térmico) e facilitam a visualização da motilidade espermática (HOLT, 2000; AISEN, 2008).

Quanto aos diluidores utilizados no congelamento do sêmen da espécie bubalina, diversos já tem sido testado, na maioria das vezes diluidores já utilizados para o congelamento de sêmen de bovinos que tentam ser adaptados para utilização em bubalinos (ANDRABI, 2009; VALE, 2011).

Um dos mais comuns é o TES-TRIS (N-Tris (hidroximetil) metil-2-aminoetanossulfonato), um diluente que tem sido utilizado há mais de 20 anos, específico para búfalo, que contém constituintes que permitem resultados pós-criopreservação homogêneos (VALE et al., 1984; RASUL et al., 2000; SILVA et al., 2002). Hoje, o TES-TRIS ainda é amplamente utilizado e até serve como um diluente de controle em experimentos avaliando o uso de outros diluentes para o congelamento de sêmen de búfalo (MOOSE et al., 2007; GONÇALVES et al., 2011; BRITO, 2014).

Segundo Brito (2014), o TES-TRIS trata-se de um diluidor com o segundo melhor resultado de motilidade total pós-descongelamento e com fórmula conhecida. Em seu estudo, Reis et al. (2017) constatou que uma maior porcentagem de espermatozoides com membranas plasmáticas intactas foi observada com o diluidor TES-TRIS quando comparado ao diluidor a base de água de coco em pó, o ACP-112® em sêmen de bubalinos.

Miyasaki (2014), ao comparar TRIS com leite desnatado na mensuração do vigor espermático de bubalinos, constatou que houve uma diminuição nos valores do vigor na fase de pré-congelação se comparada a de pós-congelação. Este baixo decréscimo pode

estar relacionado com o maior consumo de substratos pelo meio celular, principalmente a frutose, havendo uma redução da atividade metabólica dos espermatozoides no decorrer do processo, além de uma maior metabolização de ATP (ABDEL-GHAFFAR et al., 1994; KAMP et al., 2003). Assim sendo, Miyasaki (2014) pode inferir a importância da presença de substâncias tampões, como no caso o TRIS, na redução do metabolismo da frutose, contribuindo para a preservação da energia das células espermáticas (SILVA, 2005).

Segundo Miyasaki (2014), também na mensuração da motilidade espermática de bubalinos, o diluidor TRIS foi o que apresentou melhor média com  $70 \pm 6,92$ , em comparação ao Ringer-Lactato, Lactose/ TRIS e Leite Desnatado.

O citrato já é encontrado no metabolismo das células espermáticas. Ele juntamente com enzimas e PSA, formam um fluido produzido pela próstata e esse fluido é essencial para a fecundação. Esse líquido corresponde a um terço do total do sêmen, sendo eliminado durante a ejaculação, cuja função é ativar os espermatozoides (MARIEB; HOEHN, 2009).

Dias (2010) em seu estudo, comparando o diluidor citrato de sódio com o TRIS e o Ringer lactato em sêmen descongelado de caprinos, obteve menor porcentagem de células íntegras (através do teste supravital), e também menores valores de motilidade e vigor nos diluidores testados.

Segundo Kumar et al. (1994), os açúcares quando presentes ao redor da membrana celular, parecem dar proteção a célula. Por isso, açúcares permeáveis como a frutose, manose, glicose e açúcares não-permeáveis como a rafinose, sacarose e lactose, têm sido selecionados para fornecer crioproteção as células espermáticas durante a congelação; bem como açúcares de peso molecular mais alto, como por exemplo a rafinose, lactose e frutose. Segundo Lusignan et al. (2011), a lactose é o açúcar mais abundante no leite (4,8%) e parece melhorar a eficiência dos diluidores, embora não seja capaz de proteger os espermatozoides isoladamente

Quanto aos diluidores utilizados no congelamento do sêmen da espécie bubalina, diversos já tem sido testados na maioria das vezes diluidores já utilizados para o congelamento de sêmen de bovinos que tentam ser adaptados para utilização em bubalinos (ANDRABI, 2009; VALE, 2011).

### 3.3 Avaliação seminal de bubalinos

A avaliação andrológica dos animais domésticos visa determinar a aptidão reprodutiva de um indivíduo. Um dos parâmetros importantes para a determinação da análise do ejaculado na avaliação andrológica é a motilidade espermática. Deve ser avaliada imediatamente após a coleta, de forma subjetiva, em microscópio, ou por metodologia computadorizada, CASA. Segundo escala elaborada por Vale (2011) um ejaculado pode ser considerado de muito boa motilidade quando apresentar acima de 80% de espermatozoides móveis e de pobre motilidade quando se apresentar abaixo de 20%. Outros parâmetros importantes analisados são o vigor e o número de espermatozoides morfolologicamente normais, cujos valores desejáveis são  $\geq 3$  e  $\geq 70\%$ , respectivamente (CBRA, 2013).

De acordo com Palacios (2005), 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. A classificação da morfologia espermática segundo Bloom (1972), é dividida em dois grupos: defeitos maiores e defeitos menores. No primeiro grupo se encaixam defeitos com patologias de cabeça, acrossomo e peça intermediária, como cabeça isolada anormal, cabeça piriforme, gota citoplasmática proximal, cauda fortemente dobrada, entre outros. Já no segundo grupo de defeitos menores, se encaixam: cabeça isolada normal, defeitos de implantação, cauda dobrada, gota citoplasmática distal, entre outros (CBRA, 2013).

Outro importante parâmetro que avalia a qualidade do ejaculado é a percentagem de espermatozoides vivos na amostra. Segundo Sansone et al. (2000) uma amostra de sêmen com mais de 30% de espermatozoides mortos, antes do resfriamento, não pode ser aceita para o processo de criopreservação. A avaliação de viabilidade pode ser realizada por coloração com Eosina. Nessa coloração os espermatozoides vivos irão se apresentar claros ou sem coloração, enquanto os mortos terão forte tonalidade rósea (VALE, 2011).

Segundo Miyasaki (2014), em seu trabalho ele pode concluir que a excelente qualidade dos ejaculados obtidos demonstraram claramente o excepcional status reprodutivo dos animais estudados, sem dúvida fruto da grande seleção a que são submetidos, já que são criados dentro de padrões zootécnicos e sanitários recomendados, além dos critérios técnicos de manejo reprodutivo utilizados dentro do processamento e da criopreservação do sêmen.

### 3.4 Microscopia de interferência diferencial

Assim como na microscopia de contraste de fase, o microscópio de contraste de interferência diferencial tem a imagem produzida a partir de diferenças de densidade do objeto observado. Ele é útil para o trabalho com materiais de até mais de 100  $\mu\text{m}$  de espessura, que são inadequados para o contraste de fase, ou quando se está visualizando pequenos detalhes sem corar, cujo halo de contraste de fase esteja causando distorções na imagem. Além de ser a mais popular, a microscopia de contraste de interferência diferencial ainda tem uma vantagem sobre a técnica anteriormente citada: é a de maior resolução e sensação de relevo (VIEIRA, 2015).

Por isso, a microscopia de contraste de fase e microscopia de contraste de interferência diferencial – DIC, são ideais para a técnica de preparação úmida, na qual os espermatozoides não são corados, em virtude dessa microscopia ser capaz de destacar os contornos celulares, (JOHNSON et al., 1997; CELEGHINI, 2005). A metodologia com lâmina úmida em microscopia de contraste de interferência diferencial deve ser priorizada pela melhor observação dos defeitos espermáticos, uma vez que esfregaços corados apresentam mais artefatos de técnica aumentando os defeitos de cauda, peça intermediária e cabeça isolada. Adicionalmente, lâminas coradas exibem uma diminuição da observação de alguns defeitos maiores como alterações de acrossoma, vacúolos e gotas citoplasmáticas (FRENEAU et al., 2010).

Segundo Barnabe et al. (1981), a microscopia de contraste de interferência diferencial permite avaliar características da morfologia dos espermatozoides em preparações úmidas de sêmen utilizando formol salino tamponado ou 0,2% de glutaraldeído em tampão fosfato salino, o que seria inviável utilizar esfregaços por serem prejudiciais aos espermatozoides. O glutaraldeído permite a fixação das amostras de sêmen prevenindo lesões celulares e possibilitando o armazenamento da amostra em mais de 29 dias.

Em estudo comparativo Barnabe et al. (1981), obteve porcentagens mais altas de alterações no acrossomo e de defeitos maiores em amostra de sêmen fixadas com glutaraldeído em tampão fosfato salino examinado em microscopia de contraste de interferência diferencial se comparada a solução de formol salino tamponado em microscopia de contraste de fase em sêmen congelado de bovinos. Já em relação aos defeitos menores, os dois métodos não diferiram quanto as anormalidades. No entanto, devido a halos de interferência em torno do espermatozoide, a resolução não é tão boa

quanto a obtida com o microscópio de contraste de interferência diferencial. Essa técnica fornece exame com um excelente método para examinar diretamente amostras de espermatozoides para anormalidades com alto grau de precisão, o que melhorou muito o programa de controle de qualidade do sêmen congelado.

Pelo fato dos espermatozoides fixados no glutaraldeído não serem tão afetados por lesões celulares ou no tempo de armazenamento em mais de 29 dias, amostras seminais podem ser fixadas e enviadas para avaliação em laboratórios onde a microscopia de contraste por interferência diferencial esteja disponível. As alterações de acrossomo mais encontradas são: perda da crista apical, inchaço da capa acrossomal anterior com formação do segmento equatorial à deterioração e perda do capuz acrossomal anterior. Os defeitos maiores mais comuns eram cabeças anormais e gotas proximais, enquanto defeitos menores foram principalmente as caudas enroladas. A vantagem do uso da microscopia de interferência diferencial é que pode ser feita sem coloração de esfregaços de sêmen, o que economiza tempo na preparação das lâminas e reduz as chances de artefatos geralmente produzidos em preparações mortas (BARNABE et al., 1981).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Animais e local

O presente estudo foi realizado na Fazenda Rotak, localizada no município de Viseu – PA, localizado no nordeste paraense (01° 11' 48" de latitude (S) e 46° 08' 24" de longitude (W), distante aproximadamente 330 km da cidade de Belém. Foram utilizados como doadores de sêmen quatro touros bubalinos (*Bubalus bubalis*), clinicamente sadios, da raça Murrah, com maturidade sexual, idade média de três anos. Os animais eram mantidos em sistema intensivo próximo ao local de colheita, com alimentação ofertada duas vezes ao dia, composta por ração a base de milho e soja, forragem verde (*Brachiaria humidicola*, *Pennisetum purpureum* e *Panicum maximum*). Todos os animais tinham acesso *ad libitum* a água e suplementação com sal mineral.

### 4.2 Coleta e avaliação do sêmen *in natura*

O sêmen foi coletado por meio do método de vagina artificial, adaptada para espécie bubalina com temperatura interna variando entre 42°C a 46° C (OHASHI et al., 2011), três vezes durante a semana no horário entre cinco e sete horas da manhã, com utilização de uma fêmea bubalina como manequim. Previamente à coleta, os touros foram devidamente higienizados, sendo realizada uma falsa monta para estimulação sexual. Os ejaculados foram coletados em tubos graduados tipo Falcon acoplados a vagina artificial.

Para evitar choque térmico e alterações das características seminais, o laboratório, foi mantido em temperatura ambiente e os materiais que entraram em contato com o sêmen permaneceram a 37°C com auxílio de mesa aquecedora, platina aquecedora e banho-maria.

Foi determinado o volume de sêmen, expresso em mililitros (mL), a avaliação visual da cor e aspecto do ejaculado e o pH seminal por meio de fitas comerciais específicas. Por conseguinte, foi avaliada as características físicas e morfológicas dos ejaculados individualmente, iniciando-se pelo turbilhonamento (0-5), motilidade progressiva (0-100%), vigor (0-5) e concentração espermática (contagem das células em câmara de Neubauer). Todos os dados referentes às análises pré e pós-criopreservação foram registradas em fichas individuais.

**Figura 1.** Coleta de sêmen por método de vagina artificial.



**Fonte:** Gonçalves (2016).

### 4.3 Diluidores de sêmen

Foram testados quatro diluidores: o TES TRIS, o TRIS, o citrato e a lactose. O TES TRIS é composto por 24,5 g de TES; 5,03 g de TRIS; 1,08 g de D-Frutose; 700 mg de estreptomicina, 70 mg de penicilina G potássica; 600 ml de água Milli-Q; e 11 g de leite desnatado (GARCIA, 2010).

O TRIS (hidroximetil-aminometano) é constituído por 12,11 g de TRIS; 6,8 g de ácido cítrico; 2,05 g de D-frutose; 2,05 g de lactose; 1 mg/ml de sulfato de estreptomicina e 1.000 UI/ml de Penicilina G-Potássica; e 500 ml de água Milli-Q (RAMOS, 2016).

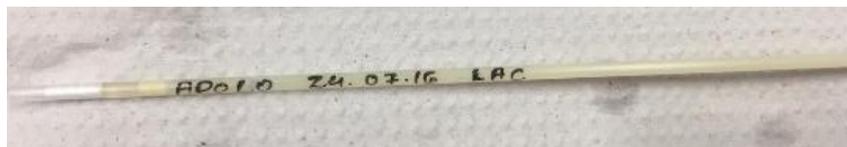
O terceiro diluidor é o CITRATO, composto por 73 ml de citrato de sódio a 2,94%; 1 g de D-frutose, 1 mg/ml de estreptomicina; 1.000 UI/ml de Penicilina-G-Potássica; e 500 ml de água Milli-Q. O último diluidor foi a LACTOSE composto por 73 ml de lactose a 11%; 1 g de D-frutose; 1 mg/ml de estreptomicina e 1.000 UI/ml de Penicilina-G-Potássica; e 500 ml de água Milli-Q (RAMOS, 2016). Em todos os quatro diluidores foram adicionados 7 ml de glicerol e 20 ml de gema de ovo, e posteriormente foram centrifugados a 3.500 RPM por 15 minutos para sedimentar elementos mais pesados. E por último, foram aliquotados em Eppendorfs e mantidos congelados em freezer (-20°C). A osmolaridade dos diluidores foi padronizada em  $290 \pm 5$  mOsm e Ph de 6,8 a 7,0.

#### 4.4 Criopreservação

O sêmen *in natura* analisado sob microscopia óptica (Nikon®, modelo E 200, com aumento de 400 X), sendo que os ejaculados com motilidade progressiva  $\geq 70\%$  e vigor  $\geq 3$  foram criopreservados (CBRA, 2013). As alíquotas seminais foram individualmente separadas e pré-diluídas em quatro diferentes diluidores (TES-TRIS, TRIS, Citrato e Lactose) e submergidas, em tubos tipo Falcon graduados, no banho-maria a uma temperatura de 37°C. Para a diluição final os diluidores foram adicionados com o objetivo de obter uma concentração de  $30 \times 10^6$  espermatozoides por dose.

Posteriormente a diluição, o sêmen foi envasado manualmente em palhetas de 0,25 ml previamente identificadas e armazenadas em refrigerador a 5°C, a uma taxa decrescente de temperatura de 0,25°C/minuto, somando um total de tempo de equilíbrio de quatro horas. Ao fim da fase de resfriamento as palhetas foram transferidas em posição horizontal para uma plataforma contendo vapor de nitrogênio líquido (-130°C) por um período de 20 minutos. Em seguida, as palhetas foram submergidas diretamente no nitrogênio líquido (-196°C) e condicionado em “racks” especiais, armazenadas em botijões criogênicos até sua utilização.

**Figura 2.** Palheta de sêmen após a descongelação.



**Fonte:** Arquivo pessoal.

#### 4.5 Avaliação pós-criopreservação

Para as avaliações, foi preparado dois microtubos (eppendorfs - 2 ml) com 400  $\mu$ l de Talp-fiv ou Fert-talp em cada. Uma palheta de cada ejaculado contendo os diluidores TES-TRIS, TRIS, CITRATO e LACTOSE dos 4 touros foi descongelada em banho maria a 37° C durante 30 segundos (MIYASAKI, 2012) e colocada em um microtubo (eppendorf - 2 ml). Dessa amostra de semen descongelada, foi retirado 400  $\mu$ l e adicionado no microtubo com Talp-fiv que posteriormente foi submetido a centrifugação de 3.000 rpm durante 5 minutos.

Após esse processo, foi retirado 40  $\mu\text{l}$  do pellet de sêmen e colocado em outro microtubo contendo 400  $\mu\text{l}$  de Talp-fiv. e submetido a uma segunda centrifugação com mesma rotação e tempo. Logo após a centrifugação, foi retirado 25  $\mu\text{l}$  de sêmen e colocado em um microtubo vazio. Foi retirada dessa amostra, 10  $\mu\text{l}$  de sêmen e colocado em lâmina e lamínula para análise de motilidade e vigor. Com o restante da amostra foi adicionado 300  $\mu\text{l}$  de formol salino tamponado para a contagem da morfologia espermática, de acordo com Bloom (1972).

**Figura 3.** Descongelamento de palheta de sêmen em banho-maria a 37°C.

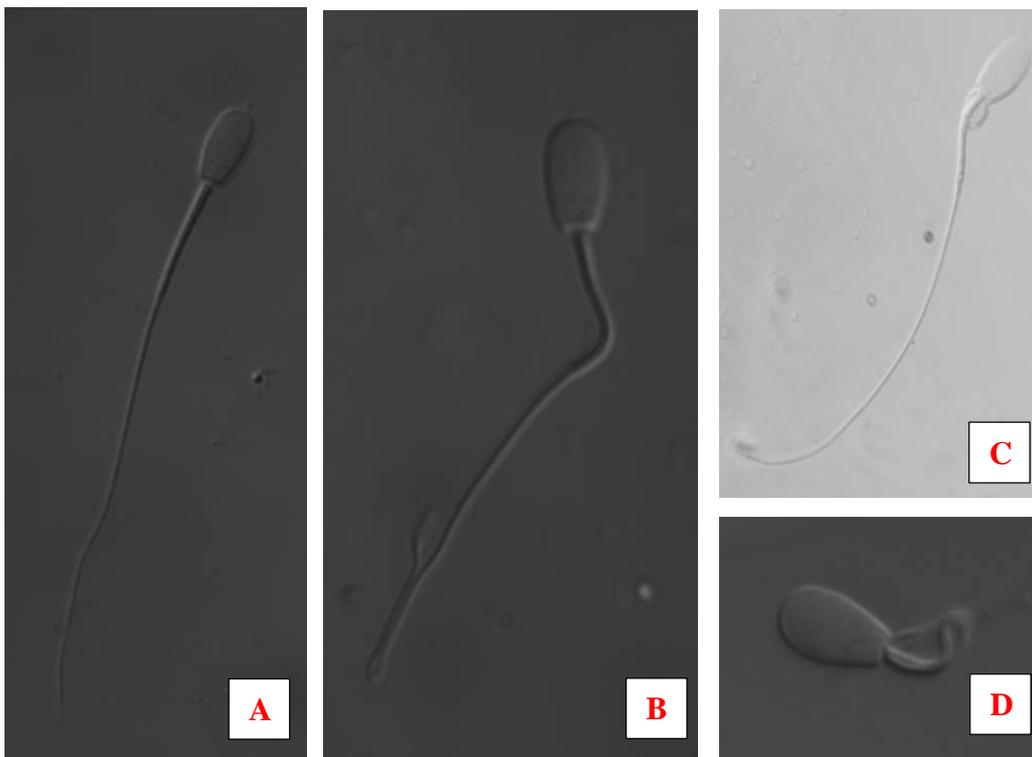


**Fonte:** Arquivo pessoal.

#### **4.6 Defeitos maiores e menores**

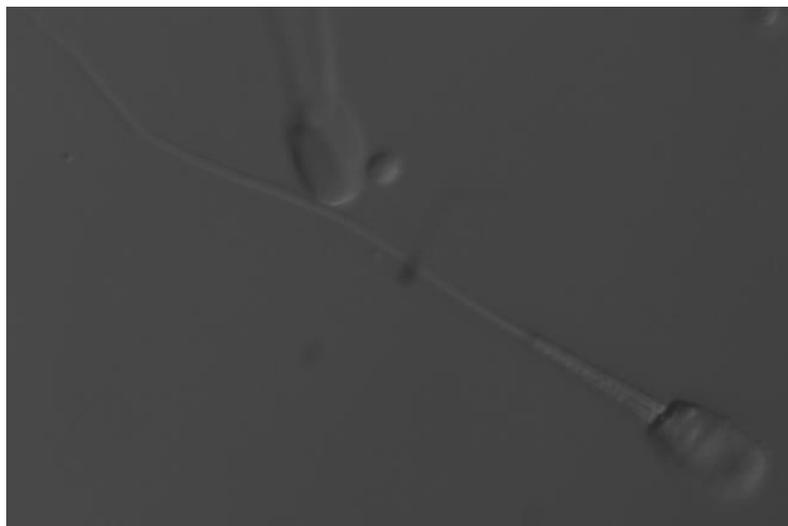
Em relação aos defeitos, o estudo foi dividido em três grupos, o de defeitos maiores, o de defeitos menores e o último grupo que é de defeito total que é a soma dos dois primeiros. No grupo de defeitos maiores se incluem: cauda fortemente dobrada, cauda fortemente enrolada, gota citoplasmática proximal, grânulo do acrossoma, diadema, cauda dupla, peça intermediária em saca-rolhas, peça intermediária fraturada e cabeça pequena anormal. Já a classificação do grupo de defeitos menores é: cauda dobrada, cauda enrolada, gota citoplasmática distal, cauda dobrada com gota citoplasmática proximal, cabeça isolada normal e implantação abaxial (BLOM, 1972).

**Figura 4.** Anormalidades morfológicas observadas no sêmen de bubalinos em microscopia de interferência diferencial com aumento de 100 X. A) Normal; B) Cauda dobrada; C) Gota citoplasmática proximal; D) Cauda fortemente enrolada.



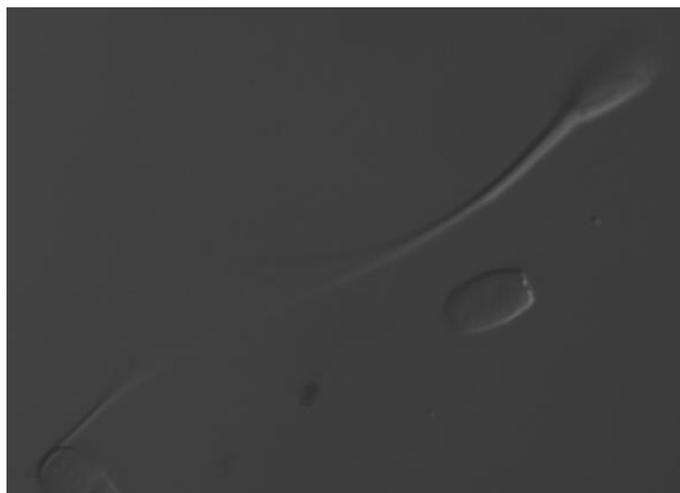
**Fonte:** Arquivo pessoal.

**Figura 5.** Espermatozoide com peça intermediária dupla no DIC.



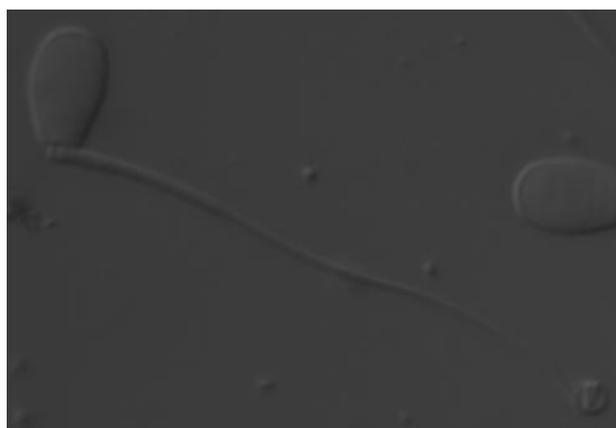
**Fonte:** Arquivo pessoal.

**Figura 6.** Espermatozoide com cabeça isolada normal no DIC.



**Fonte:** Arquivo pessoal.

**Figura 7.** Espermatozoide com implantação abaxial no DIC.



**Fonte:** Arquivo pessoal.

**Figura 8.** Espermatozoide com grânulo do acrossomo no DIC.



**Fonte:** Arquivo pessoal.

#### 4.7. Microscopia de interferência diferencial

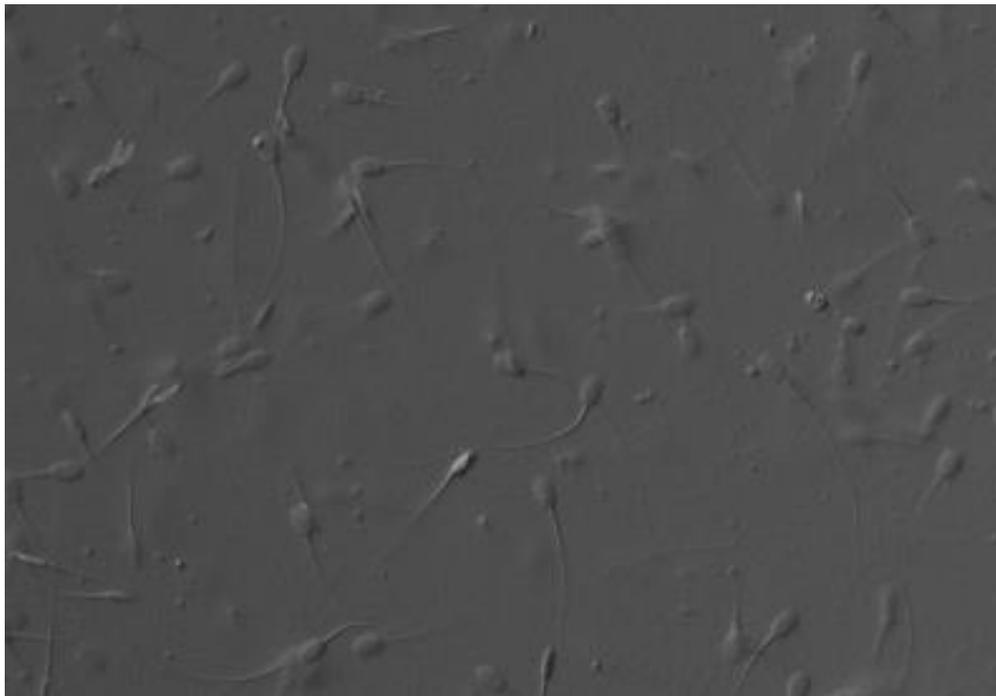
As análises foram realizadas no laboratório de pesquisa Carlos Azevedo (LPCA) da Universidade Federal Rural da Amazônia, com o microscópio do modelo AX10 Scope A.1, da marca Zeiss. A primeira análise pós-criopreservação foi de motilidade e vigor em lâmina e lamínula com objetiva de 40 x, e a segunda análise foi feita com a objetiva de 100 x com lâmina e lamínula adicionando o óleo de imersão, com o recurso utilizado de bater fotos durante a análise para comprovação dos dados.

**Figura 9.** Microscópio de interferência diferencial AX10 Scope A.1.



**Fonte:** Arquivo pessoal.

**Figura 10.** Imagem de microscopia de interferência diferencial durante avaliação de sêmen bubalino, em aumento de 40 X.



**Fonte:** Arquivo pessoal.

#### **4.8 Análise estatística**

Os dados foram alocados em planilhas eletrônicas e posteriormente avaliados através de software especializado SAS University Edition (2019). As média e desvios foram calculados através do procedimento PROC MEANS e para avaliação de variação entre as mesmas foram submetidas ao teste de Análise de Variância (ANOVA) e as médias desiguais foram comparadas pelo Teste de Tukey, com 5 % de significância.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Motilidade e vigor

Na tabela 1 pode-se verificar que houve somente diferença estatística entre os diluidores TES TRIS e CITRATO em relação a motilidade e vigor. O TES TRIS apresentou  $53\% \pm 0,2$  de motilidade e  $3,3 \pm 1,2$  para vigor, já o CITRATO obteve médias de  $22\% \pm 0,1$  para motilidade e  $1,6 \pm 1,1$  para vigor, sendo assim o diluidor que se apresentou mais eficaz em relação a motilidade e vigor foi o TES-TRIS.

**Tabela 1.** Motilidade e vigor espermático do sêmen de búfalos congelado com diferentes tipos de diluidores e o sêmen fresco.

	Fresco	Citrato	Lactose	TES-TRIS	TRIS
<b>Motilidade</b>	91±0,1%	22% ± 0,1 <sup>A,C</sup>	40% ± 0,2 <sup>A</sup>	53% ± 0,2 <sup>A,B</sup>	36% ± 0,1 <sup>A</sup>
<b>Vigor</b>	4	1,6 ± 1,1 <sup>A,C</sup>	2,1 ± 1,2 <sup>A</sup>	3,3 ± 1,2 <sup>A,B</sup>	2,2 ± 1,2 <sup>A</sup>
<b>Volume</b>	2,5±0,9%				
<b>Turbilhonamento</b>	3,3 ± 0,7%				

Letras iguais na mesma linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Provavelmente o diluidor TES-TRIS se diferiu estatisticamente do CITRATO em relação a motilidade e vigor espermáticos, devido possuir a combinação de dois açúcares, a lactose já presente no leite e a frutose, agindo externamente na membrana celular e sendo preferencialmente utilizada pelo espermatozoide, por algum substrato naturalmente presente no plasma seminal (YASEEN IBRAHIM, 1975) e também por esse diluidor possuir as micelas de caseína que fornecem proteção adicional para o espermatozoide (MANJUNATH, 2012).

O TES-TRIS é um diluidor onde são reportadas motilidades pós-descongelamento variando de 20 a 73% (BRITO, 2014), dentro das médias encontradas no presente estudo. Os valores encontrados para motilidade espermática no meio TES-TRIS, imediatamente após o descongelamento, estão próximos daqueles descritos por Brito (2014), onde a motilidade foi  $37,13 \pm 10,12$  para búfalos e próximos também aos resultados encontrados por Moose (2007), cuja motilidade foi de  $35,65 \pm 3,80$  também em sêmen de bubalinos no teste de termo-resistência (TTR) a zero hora.

Esse estudo corroborou com Pessoa (2011), que teve médias de motilidade de  $39,5 \pm 23,8$  em sêmen bubalino congelado com TES-TRIS. Porém foram inferiores aos

descritos por Guimarães (2010) com valor de  $80,4 \pm 7,8$  para criopreservação de sêmen ovino com TES TRIS.

Em relação ao vigor com o diluidor TES-TRIS, resultados semelhantes foram encontrados com Moose (2007), com médias de  $3,41 + 0,29$  em teste de termo-resistência a zero hora com sêmen de bubalino. Entretanto foram inferiores aos resultados pós-descongelção encontrados por Pessoa (2011), com valores de  $2,4 \pm 0,6$  para bubalinos e Guimarães (2010) com valores de  $4,4 \pm 5,3$  para ovinos.

Swelum (2011) em seu estudo, obteve valores de  $50.25 \pm 0.85$  de motilidade a 0 hora quando utilizou o TRIS centrifugado com gema de ovo e glicerol, acima do encontrado no presente estudo.

Dias (2010), em sua pesquisa com sêmen de caprinos descongelado apresentou motilidade de  $32,8 \pm 1,4$  para TRIS e  $26,3 \pm 2,4$  para CITRATO, já no vigor apresentou  $3,2 \pm 0,1$  para TRIS e  $2,5 \pm 0,2$  para o CITRATO, semelhante aos valores encontrados na presente pesquisa.

Ao analisar parâmetros de motilidade e vigor espermáticos com o diluidor TRIS utilizando garranhões na raça Mangalarga Marchador, Costa (2014) encontrou parâmetros de motilidade de  $17,26 \pm 11,40$  e vigor de  $1,62 \pm 0,96$ , valores inferiores ao encontrados na presente pesquisa para o mesmo diluidor TRIS.

Felipe-Silva et al. (2011), ao utilizar o diluidor Nagase (a base de LACTOSE) obteve médias de 37,50% de motilidade e 3,56 de vigor, sendo semelhante ao valor encontrado nessa pesquisa para motilidade porém se diferindo em relação ao vigor, com valores acima da presente pesquisa.

## 5.2 Principais patologias

De acordo com a tabela 2, houve somente diferença estatística entre TRIS e CITRATO na patologia de cauda fortemente dobrada. O citrato apresentou melhores resultados com menor número de cauda fortemente dobrada com  $2,3 \pm 1,4$ , já o TRIS teve médias e desvio padrão de  $10,1 \pm 8,7$ . Nesse contexto, podemos afirmar de acordo com Salviano et al. (2008) que o ácido cítrico e o TRIS (hidroximetil-aminometano) são utilizados como base ou principal componente de vários diluentes, e ambos têm função de tamponar o meio com papel importante na manutenção do equilíbrio osmótico. O citrato foi o que obteve menores quantidades de patologias, e isso pode ter acontecido devido esse diluidor favorecer a entrada mais lenta do crioprotetor glicerol no interior da célula espermática, auxiliando na regulação do equilíbrio osmótico durante o processo de congelação e também a presença de açúcares (D-frutose) na sua formulação que servirá como fonte de energia (MACHADO; SIMPLICIO, 1995).

**Tabela 2.** Principais patologias encontradas nos espermatozoides de sêmen bubalino descongelado.

	Fresco	TES-TRIS	TRIS	Citrato	Lactose
<b>Cauda dobrada</b>	$20 \pm 1,9$	$42,8 \pm 26,3^A$	$35,8 \pm 22,8^A$	$25,6 \pm 8,2^A$	$47,5 \pm 24,5^A$
<b>Cauda fortemente dobrada</b>	$15,8 \pm 14,2$	$4,4 \pm 3,9^A$	$10,1 \pm 8,7^{A,C}$	$2,3 \pm 1,4^{A,B}$	$6,4 \pm 3,6^A$
<b>Cauda enrolada</b>	$0,3 \pm 0,5$	$2 \pm 0^A$	$0 \pm 0^A$	$0 \pm 0^A$	$1 \pm 0^A$
<b>Cauda fortemente enrolada</b>	$0,2 \pm 0,2$	$2,8 \pm 1,6^A$	$2,2 \pm 0,9^A$	$3,1 \pm 1,9^A$	$3,1 \pm 1,4^A$
<b>Gota citoplasmática proximal</b>	$0,7 \pm 0,1$	$1,8 \pm 1,2^A$	$2,7 \pm 1,4^A$	$3,6 \pm 2,7^A$	$4,4 \pm 3^A$
<b>Gota citoplasmática distal</b>	$0,2 \pm 0,4$	$24,7 \pm 16,8^A$	$28,4 \pm 22,6^A$	$16,2 \pm 11^A$	$24,8 \pm 15,3^A$

Letras iguais na mesma linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Valores superiores ao dessa pesquisa foram encontrados por Silva (2005), em espermatozoides com cauda dobrada de bovinos jovens da raça Gir leiteiro utilizando o diluidor Nagase (a base de LACTOSE) com médias de 10,75%.

Em relação a microscopia de interferência diferencial, para Saacke et al. (1998), embora a identificação de espermatozoides portadores de defeitos de cabeça seja possível por meio do DIC, a observação de elementos, como o formato da cabeça do espermatozoide, requer o emprego de métodos mais objetivos, como a análise computadorizada da morfometria espermática (ASMA), técnica que pode proporcionar a identificação de touros com problemas de fertilidade (PARRISH; FOOTE, 1987).

### 5.3 Defeitos maiores e menores

Na tabela 3 está representado as médias e desvio padrão em relação a morfologia espermática (defeitos maiores, menores e totais) e os quatro diluidores testados, onde não foi encontrada diferença estatística entre os defeitos e os quatro diluidores testados. Porém foi encontrada diferença matemática entre os quatro diluidores onde o Citrato obteve menores valores de defeito total com  $49,1 \pm 13$ , se apresentando como melhor diluente nessa categoria. De acordo com Leite et al. (2011), um sistema tampão deve ser um dos constituintes do diluidor para neutralizar os íons hidrogênio produzidos pelo metabolismo dos espermatozoides, mantendo o pH da solução próximo à neutralidade (6,8 a 7,1). Os meios tampões mais utilizados nos diluentes para sêmen são o CITRATO, pois suas propriedades tamponantes melhoram a solubilidade das frações proteicas da gema do ovo.

**Tabela 3.** Defeito maior, defeito menor e defeito total encontradas no sêmen de búfalos criopreservado com diferentes diluidores.

	<b>TES-TRIS</b>	<b>TRIS</b>	<b>Citrato</b>	<b>Lactose</b>
<b>Defeito maior</b>	$8,4 \pm 5,1$	$15,2 \pm 9,1$	$7,8 \pm 4,7$	$12,8 \pm 6,4$
<b>Defeito menor</b>	$64 \pm 23,1$	$59,3 \pm 29,7$	$41,2 \pm 11,5$	$68,2 \pm 19,4$
<b>Defeito total</b>	$72,4 \pm 26,6$	$74,5 \pm 31,8$	$49,1 \pm 13$	$81,5 \pm 23,4$

Dias (2013), ao testar o diluidor citrato de sódio em sêmen caprino descongelado obteve médias inferiores de defeitos maiores com  $5,68 \pm 3,98$  e de defeitos menores  $4,77 \pm 7,45$ . Se comparado ao presente estudo, Miyasaki (2014) também obteve médias inferiores de defeito maior comparando o diluidor TRIS com  $15,18 \pm 4,7$  para sêmen bubalino descongelado.

Gonçalves et al. (2014), ao suplementar bubalinos com óleo de palma em sua alimentação obteve médias de defeito maior de  $13,4 \pm 3,8$  nos ejaculados, semelhante ao valor encontrado nos defeitos maiores com o diluidor LACTOSE de  $12,8 \pm 6,4$  no presente estudo. Por sua vez diferiu dos resultados de defeito menor dessa pesquisa, com médias de  $10,1 \pm 3,4$  para ejaculados de bubalinos suplementados com óleo de palma.

Emerick (2010), reportou média de 10,5% para defeitos maiores em tourinhos Tabapuã com semen criopreservado com o diluidor lactose-gema, e 5,2% para defeitos menores, assemelhando-se aos valores da pesquisa em defeitos maiores porém diferindo em defeitos menores.

Ao comparar 2 diferentes diluidores na criopreservação seminal de touros da raça Gir leiteiro, Felipe-Silva (2011) obteve valores de 24,5% para o diluidor Nagase (a base de LACTOSE) e 27,87%, para o diluidor Bioxcell (a base de lecitina) para defeito total. Portanto, o valor se diferiu do presente estudo em relação ao diluidor LACTOSE.

## **6 CONCLUSÃO**

Com base nos resultados do presente estudo, é possível concluir que utilizando quatro diluidores diferentes (TES-TRIS, TRIS, citrato e lactose) na congelação de sêmen de búfalos, o diluidor TES TRIS apresentou melhores resultados para motilidade e vigor e o CITRATO apresentou menores quantidades de patologias e defeito total após a criopreservação do sêmen bubalino. Foi possível observar também que a microscopia de interferência diferencial é uma boa ferramenta para a análise de sêmen criopreservado de búfalos, mostrando resultados satisfatórios na pesquisa.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABCB (Associação brasileira de criadores de búfalos). Derivados de leite de búfala. Disponível em: <http://www.bufalo.com.br>. Acesso em: 20 de jun. 2019.

ABDEL-GHAFFAR, A. E., EL-AZAB A.I.; EL-DAWY, K. H. Rabbit semen metabolism. **Cahiers Options Mediterraneennes**, Paris, v. 8, p. 305-312. 1994.

AISEN, E. G. **Reprodução ovina e caprina**. 1. ed. São Paulo: MedVet, 2008. 203 p.

AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, EUA, v. 7, n. 3, p.145-173. 1987.

ANDRABI, S, M. Factors affecting the quality of cryopreserved buffalo (*Bubalus Bubalis*) bull spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, Germany, v. 44, n. 3, p. 552-569, jun. 2009.

BARNABE, V. H.; BARNABE, R. C.; VISINTIN, J. A.; VIANA, W. G.; CASAGRANDE, J. F.; ALMEIDA, C. A. Comparative study between phase contrast and differential interference contrast microscopies for evaluation of frozen bull semen. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**. São Paulo, v. 18, n. 1, p. 55-59. 1981.

BASIROV, E. B. The biology of reproduction and artificial insemination of buffaloes. *In: International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, 1964, Milan. Proceedings [...]. Milan, 1964. p. 4-10.*

BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. *In: Symposium Internationale de Zootechnie, 1972, Milan. Proceedings [...]. Milan, 1972.*

BRITO, M. F. **Criopreservação do sêmen de búfalos (*Bubalus bubalis*) em diluidores contendo lipoproteínas de baixa densidade, em substituição a gema de ovo**. 2014. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Belo Horizonte, 2014.

CASTELO, T. S.; FROTA, T. R.; SILVA, A. R. Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos. **Acta Veterinaria Brasilica**, Mossoró, v. 2, n. 3, p. 67-75, out. 2008.

CELEGHINI, E. C. C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes**. 2005. Dissertação de (Mestrado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

CIPRIANO, V. T. F.; FREITAS, G. C. O impacto da criopreservação na qualidade seminal. **Reprodução & Climatério**. São Paulo, v. 28, n. 3, p. 112-116, jul. 2013.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL - CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3 ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013. 104 p.

COSTA, D. N. M.; SILVA, D. A. M.; BOAKARI, Y. L.; FERREIRA, S. B.; BRANCO, M. A. C.; SOUZA, J. A. T. Eficiência dos diluidores TRIS e BOTU-CRIO® sobre os parâmetros seminais de garranhões das raças quarto de milha e mangalarga marchador. **Ciência animal brasileira**, Goiânia, v. 15, n. 3, p. 322-329, jul./set. 2014.

DIAS, J. C. O. **Adição de ringer lactato, citrato de sódio 2,92% e solução TRIS em sêmen caprino descongelado**. 2010. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2010.

FELIPE SILVA, A. S.; VALE FILHO, V. R.; FERREIRA, M. B. D.; CORREA, G. S. S.; SILVA, M. A.; VERAS, M. M.; ANDRADE, V. J. Efeitos do diluidor na viabilidade espermática pós-criopreservação em tourinhos da raça Gir Leiteiro aos 25 meses de idade, pré-selecionados pela classificação andrológica por pontos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Minas Gerais, v.63, n.1, p.81-86, jan. 2011.

FRENEAU, G. E.; CHENOWETH, P. J.; ELLIS, R.; RUPP, G. Sperm morphology of beef bulls evaluated by two different methods. **Animal Reproduction Science**, Manchester, v.118, n. 2-4, p.176-181, apr. 2010.

GARCIA, A. R. **Procedimento operacional padrão - POP LRA 08 – Preparo do diluidor TES TRIS**. Embrapa. Encarte técnico. Versão 2. 2010.

GONÇALVES, A. A.; CASTRO, S. R. S.; GARCIA, A. R.; SANTOS, A. S.; SILVA, G. R.; BARROS, D. V. Efeito de substâncias antioxidantes no sêmen criopreservado de búfalos (*Bubalus bubalis*). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES (SBTE), 25., 2011, Porto Alegre. **Anais [...]**. Porto Alegre: SBTE, 2011. p. 451.

GONÇALVES, A. A.; GARCIA, A. R.; ARRUDA, R. P.; JUNIOR, W. B.; JUNIOR, J. B. L.; KAHWAGE, P. R.; SILVA, G. R. A suplementação alimentar com ácidos graxos insaturados melhora a qualidade do sêmen criopreservado de búfalos (*Bubalus bubalis*) pós descongelamento, **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 35, n. 5, p. 2467-2484, set/out. 2014.

GUIMARÃES, A. A. **Avaliação de diferentes diluentes na criopreservação do sêmen ovino (*Ovis aries*)**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Pará, Belém, 2010.

HAMMERSTEDT, R. H.; GRAHAM, J. K.; NOLAN, J. P. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. **Journal of Andrology**, EUA, v. 11, n.1, p.73-88, jan/feb. 1990.

HOLT, W. V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. **Theriogenology**, New York, v. 43, n. 1, p.47-58, jan. 2000.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. Diretoria de Pesquisas, Coordenação e Agropecuária. Pesquisa da Pecuária Municipal em 2016. Disponível em: [www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br). Acesso em 22 de jun. 2019.

JOHNSON, W. The significance to bull fertility of morphologically abnormal sperm. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, EUA, v.13, n. 2, p. 255-270, jul. 1997.

KAMP, G.; BUSSELMANN, G.; JONES, N.; WIESNER, B.; LAUTERWEIN, J. Energy metabolism and intracellular pH in boar spermatozoa. **Reproduction**, Cambridge, v. 126, n. 4, p. 517-525, oct. 2003.

KUMAR, S.; SAHNI, K. L.; MOHAN, G. Freezing of buffalo semen in different dilutions with different concentration of glycerol and different sugars in absence of yolk. **Indian Journal Dairy Science**, New Delhi, v. 47, n. 8, p. 635-639. 1994.

LEIBFRIED-RUTLEGE, M.L. Factors determining competence of in vitro produced cattle embryos. **Theriogenology**, New York, v. 51, n. 2, p.473-485, jan. 1999.

LEITE, P. A.; SCHREDER, G. G.; ALMEIDA, C. R. L.; ZUCCARI, C. E. S.; SILVA, E. V. C. Criopreservação do sêmen bovino. **UNOPAR Científica Ciências Biológica e da Saúde**, Paraná, v. 13, n. 4, p. 279-286, maio. 2011.

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**, Manchester, v. 20, p. 31-38. 2010.

LUSIGNAN, M. F.; BERGERON, A.; LAFLEUR, M.; MANJUNATH, P. The major proteins of bovine seminal plasma interact with caseins and whey proteins of milk extender. **Biology Reproduction**, Oxford, v. 85, n. 3, p. 457-464. 2011.

MACHADO, R.; SIMPLÍCIO, A. A. Inseminação artificial em caprinos no Brasil: estado atual. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 1, p. 61-72. 1995.

MANJUNATH, P. New insights into the understanding of the mechanism of sperm protection y extender components. **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v. 9, n. 4, p.809-815, oct./dec. 2012

MARIEB, E. N.; HOEHN, K. **Anatomia e fisiologia**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 1072 p.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **The American Journal of Physiology**, EUA, v. 247, n. 3, p.125-142, sept. 1984.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Dados de rebanho bovino e bubalino no Brasil – 2016**. 2016. Disponível em: <http://www.Agricultura.gov.br/assuntos/saude-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/arquivos-programas-sanitarios/RebanhoBovdeo2016.pdf>. Acesso em: 20 jun. 2019.

MIYASAKI, M. Y. A. **Comparação entre o TRIS, Lactose/ TRIS, ringer-lactato e leite desnatado como diluidores na criopreservação do sêmen bubalino.** 2012. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) – Universidade Federal do Pará, Belém, 2012.

MIYASAKI, M. Y. A.; VALE, W. G.; BAÍA, F. A. C.; MINERVINO, A. H. H.; RIBEIRO, H. F. L.; MIYASAKI, M. T. A. Comparação entre o TRIS, Lactose/ TRIS, ringer-lactato e leite desnatado como diluidores na criopreservação do sêmen bubalino. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 36, n. 1, p. 1-10, jan/mar. 2014.

MOOSE, G.; CARVALHO, J. B. P.; SANTO DE CAMPOS, B. D. E.; NOGUEIRA, J. R.; REICHERT, R. H. Efeito de diferentes diluidores na congelção e pós descongelção de sêmen bubalino, submetido ao teste de termo-resistência. **Boletim de Indústria Animal**, Nova Odessa, v. 64, n. 3, p. 233-239, jul/set. 2007.

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

OHASHI, O. M.; SANTOS, S. S. D.; MIRANDA, M. S.; CORDEIRO, M. S.; COSTA, M. M.; SILVA, T. V. G. Morfologia do sistema genital, distúrbio reprodutivo e manejo de macho bubalino (*Bubalus bubalis*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 35, n. 2, p. 88-94, abril/jun. 2011.

PALACIOS, C. 2005. Técnicas para la evaluación de la capacidad fecundante de espermatozoides. **Investigación agraria. Producción y sanidad animal**, Espanha, v. 16, n. 1, agosto. 2001.

PARRISH, J. J.; FOOTE, R. H. Quantification of bovine sperm separation by swim-up method – relationship to sperm motility, integrity of acrosomes, sperm migration in polyacrylamide gel and fertility. **Journal of Andrology**, EUA, v.8, p.259-266. 1987.

PESSOA, J. S.; GARCIA, A. R.; NAHUM, B. S.; CASTRO, S. R. S.; SANTOS, A. X. **Avaliação da fertilidade a campo de sêmen bubalino congelado com antioxidantes: resultados preliminares para inseminação artificial em tempo fixo.** Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2011, 4 f. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/41200/1/OK-Resumo-expandido-Jakeline-pessoa-PIBIC-2011-15-07-2011-erisor.pdf>. Acesso em: 07 de jul. 2019.

PHOGAT, J. B.; PANDEY, A. K.; SINGH, I. Seasonality in buffaloes reproduction. **International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences**, Houston, v. 6, n. 2, p.46-54, abr/jun. 2016.

PURDY, P. H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v.63, n. 3, p.215-225. 2006.

RAMOS, A. S.; BARRETO, N. C.; ROLIM FILHO, S. T.; RIBEIRO, H. F. L.; ARAUJO, E. B.; OHASHI, O. M.; AYALA, H. D. M.; SANTOS, A. X.; GONÇALVES, A. A.; MILEO, V. C. Avaliação espermática de bubalinos criopreservado em diferentes

diluidores com uso de sondas fluorescentes. *In: XXX REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES*, 241., 2016, Foz do Iguaçu. **Anais** [...] Foz do Iguaçu: SBTE, 2016. p. 332.

RASUL, Z.; AHMAD, N.; ANZAR, M. Effect of buffering systems on post-thaw motion characteristics, plasma membrane integrity, and acrosome morphology of buffalo spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, Manchester, v. 59, n. 1-2, p. 31-41, apr. 2000.

REIS, A. N.; MIRANDA, M. S.; SILVA, L. K. X.; SILVA, A. O. A.; DE SOUSA, J. S.; DE MORAIS, E.; GARCIA, A. R.; DOMINGUES, S. F. S.; DA SILVA, J. K. R.; RIBEIRO, H. F. L. Comparative evaluation between the extenders TES-TRIS and ACP112® and the association of Sálva Marajó oil (*Lippia origanoides*) in the quality of cryopreserved buffalo sperm. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 38, n. 6, p. 3613-3628, nov./dez. 2017.

ROY, A. Egg-yolk coagulating enzyme in the semen and Cowper's gland of the goat. **Nature**, Reino Unido, p.179-318. 1957.

SAACKE, R. G.; DEJARNETTE, J. M.; BAME, J. H.; KARABINUS, D. S.; WHITMAN, S. S. Can spermatozoa with abnormal heads gain access to the ovum in artificially inseminated super- and single-ovulation cattle. **Theriogenology**, New York, v.50, p.117-128. 1998.

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

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

SILVA, A. R. **Criopreservação do sêmen canino diluído em Tris: Avaliação morfológica, funcional e de suas interações com oócitos homólogos**. 2005 Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2005.

SWELUM, A. A.; MANSOUR, H. A.; ELSAYED, A. A.; AMER, H. A. Comparing ethylene glycol with glycerol for cryopreservation of buffalo bull semen in egg-yolk containing extenders. **Theriogenology**, New York, v. 76, p. 833-842, apr. 2011.

TORRES-JUNIOR, J. R. S.; RIBEIRO, D. R. S.; PEREIRA, H. G.; FRANÇA, I. G. Sazonalidade reprodutiva de bubalinos (*Bubalus bubalis*) em regiões equatorial e temperada. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 40, n. 4, p.142-147, out./dez. 2016.

VALE, W. G.; RIBEIRO, H. F. L.; SOUSA, J. S.; OHASHI, O. M. Inseminação artificial em búfalos (*Bubalus bubalis*) na Região Amazônica. *In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA*, 21., 1984, Belém. **Anais** [...]. Belém: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 1984. p. 91.

VALE, W. G. Avances biotecnológicos em reprodução de búfalos. **Tecnología en Marcha**, Costa Rica, v. 24, n. 5, p. 89-90, nov. 2011.

VIEIRA, F. S. Microscópio ótico: resolução e modalidades de observação. 2015. 13 p. Disponível em: [http://www.cesadufs.com.br/ORBI/public/uploadCatalogo/09070820092012 Introducao\\_a\\_Microscopia\\_Aula\\_2.pdf](http://www.cesadufs.com.br/ORBI/public/uploadCatalogo/09070820092012%20Introducao_a_Microscopia_Aula_2.pdf). Acesso em: 30 de jun. 2019.

VIEIRA, J. N.; TEIXEIRA, C. S.; KUABARA, M. Y.; DE OLIVEIRA, D. A. A. Bubalinocultura no Brasil – short communication. **Pubvet**, Londrina, v. 5, n. 2, p. 1-7, jun. 2011.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, Manchester, v. 60-61, n. 2, p.481-492, jul. 2000.

YASEEN, A. M.; IBRAHIM, M. A. Semen characteristic of first and second ejaculate of buffalo bull with and without sexual stimulation. **Nigerian Journal of Animal Production**. Nigeria, v. 2, n. 1. 1975.

ZORZETTO, M. F.; SILVA, Y. F. R. S.; ZOCCA, S.; MONTEIRO, G. A.; VEXENAT, S. C.; MARTIN, I.; OBA, E. Aspectos físicos e morfológicos do sêmen de bubalinos da raça Murrah em maturidade sexual. **Periódicos Brasileiros em Medicina Veterinária e Zootecnia**, São Paulo, v. 23, n. 4, p. 647-655. 2016.