

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS - UFMG  
ESCOLA DE VETERINÁRIA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

SÊMEN REFRIGERADO E SEU POTENCIAL DE USO NA INSEMINAÇÃO  
ARTIFICIAL DE BÚFALAS (*Bubalus bubalis*)

JACI DE ALMEIDA

Belo Horizonte  
Escola de Veterinária - UFMG  
2018

JACI DE ALMEIDA

SÊMEN REFRIGERADO E SEU POTENCIAL DE USO NA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL DE  
BÚFALAS (*Bubalus bubalis*)

Tese apresentada à Universidade Federal de Minas,  
como requisito parcial para a obtenção do grau de  
Doutor em Ciência Animal.

Programa: Ciência Animal  
Área de Concentração: Reprodução Animal  
Orientador: Prof. Dr. Marc Roger Jean Marie Henry

Co-orientador: Prof. Dr. Alan Maia Borges  
Supervisor externo: Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli

Belo Horizonte  
Escola de Veterinária - UFMG  
2018

A447s Almeida, Jaci de, 1977-  
Sêmen refrigerado e seu potencial de uso na inseminação artificial de búfalas (*Bubalus bubalis*) / Jaci de Almeida. – 2018.  
195 p. : il.

Orientador: Marc Roger Jean Marie Henry  
Co-orientador: Alan Maia Borges  
Supervisor externo: Pietro Sampaio Baruselli  
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária  
Inclui bibliografia

1. Búfalo – Reprodução – Teses. 2. Sêmen – Análise – Teses. 3. Inseminação artificial – Teses. 4. Reprodução animal – Teses. I. Henry, Marc Roger Jean Marie. II. Borges, Alan Maia. III. Baruselli, Pietro Sampaio. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. V. Título.

CDD – 636.293 089 26

## FOLHA DE APROVAÇÃO

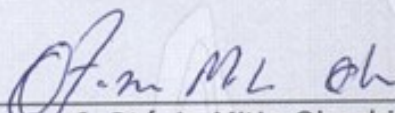
JACI DE ALMEIDA

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração em REPRODUÇÃO ANIMAL.

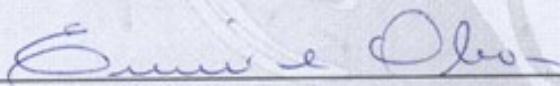
Aprovada em 25 de Abril de 2018, pela banca constituída pelos membros:



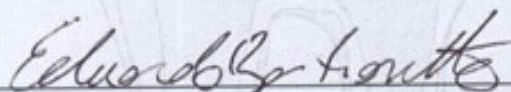
Prof. Marc Roger Jean Marie Henry  
Presidente - Orientador



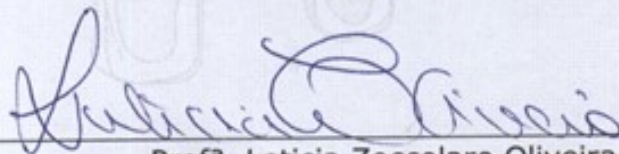
Prof. Otávio Mitio Ohashi  
Universidade Federal do Pará - UFPA



Profª. Eunice Oba  
Universidade Estadual Paulista - UNESP



Prof. Eduardo Bastianetto  
Escola de Veterinária - UFMG



Profª. Leticia Zoccolaro Oliveira  
Escola de Veterinária - UFMG

## DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Jaci de Almeida nasceu na Fazenda Antinha, Rancho Grande - Distrito de Bananal estado de São Paulo, em 12 de março de 1977. Em agosto de 2002 ingressou no curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário de Barra Mansa (UBM, Barra Mansa, RJ). Em outubro de 2005, defendeu a Monografia em Reprodução de Grandes Animais sob orientação do Prof. Osvaldo Almeida Resende, como parte do requisito para conclusão do curso de graduação em agosto de 2007. No período de agosto a dezembro de 2006, foi monitor das disciplinas de Patologia Clínica da Reprodução Animal II (Machos), Biotecnologias da Reprodução Animal, Patologia Clínica da reprodução Animal I (Fêmeas) e Obstetrícia no Centro Universitário de Barra Mansa (Barra Mansa, RJ) sob orientação do Prof. Osvaldo Almeida Resende, onde desenvolveu atividades relacionadas ao controle farmacológico do ciclo reprodutivo, IATF, ultrassonografia reprodutiva de vacas de leite, exames andrológicos e criopreservação de sêmen. Durante o período de abril de 2008 a dezembro de 2013 foi contratado como professor de Reprodução Animal no Centro Universitário de Barra Mansa - SOBEU, onde ministrou aulas de Fisiopatologia da Reprodução Animal I e II, Obstetrícia, Patologia Clínica da Reprodução I e II e Biotécnicas da Reprodução Animal. Em agosto de 2008 ingressou no curso de Mestrado, do Programa de Medicina Veterinária, Área de Concentração Patologia e Ciências Clínicas, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ - Seropédica, sob orientação do Prof. Dr. Marco Roberto Bourg de Mello, concluindo-o em dezembro de 2010. Prestou serviços como controlador oficial de leite para a Associação Brasileira de Criadores de Zebu - ABCZ (2009 - 2013) e Associação de Criadores de Girolando (2010 - 2012). Em março de 2014, ingressou no curso de Doutorado, da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais - EV/UFMG, Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias (Ciência Animal - Área de concentração em Reprodução Animal), sob a orientação do Prof. Dr. Marc Henry, desenvolveu pesquisas com búfalos nas áreas de reprodução, trabalhando com protocolos hormonais na IATF, ultrassonografia, FIV, Andrologia, Refrigeração e Criopreservação de sêmen e desenvolvimento de novos diluidores para sêmen bubalino, concluindo em abril de 2018.

*“Se alguém conseguiu eu também sou capaz.  
O que pode fazer a diferença é tempo gasto  
para atingir o mesmo objetivo, pois algumas  
pessoas têm mais facilidade que outras, assim  
gastaram menos tempo”.*

*(Oswaldo Almeida Resende).*

## DEDICATÓRIA

*A Deus e Nossa Senhora Aparecida em primeiro lugar, por guiar meu caminho e estar sempre presente em minha vida, me fortalecendo nas horas difíceis e sempre me atenderem quando os chamei.*

*Aos meus pais José Correia de Almeida e Joaquina Luíza de Almeida, pelo amor, carinho, apoio, pelos sacrifícios, pelos exemplos de determinação e honestidade, por me ensinarem que com caráter, perseverança e humildade nada é impossível e tudo pode ser alcançado, permitindo a realização deste sonho.*

*Ao meu irmão Jaime de Almeida, por em determinado momento de sua vida, ter aberto mão de seus sonhos, para que eu pudesse realizar o meu. Com você tenho uma dívida que talvez nunca consiga quitar.*

*Ao meu tio Osvaldo Resende Almeida, pela amizade, direcionamento, troca de experiência, pelo apoio e suporte financeiro, sempre incondicional, nunca permitindo que me faltassem recursos para a realização deste curso de pós-graduação, a quem devo boa parte dos meus estudos, conhecimento e formação profissional, pois sem você nada disso teria acontecido.*

*Dedico essa conquista em especial aos meus Avôs José Resende de Almeida e Sebastiana Luíza de Almeida que infelizmente não estão aqui para comemorar comigo mais essa vitória.*

*A amiga e colega Paola Andrea Oviedo Peñuela, pela ajuda na fase final dos experimentos de campo e laboratório, assim como, pelo companheirismo, momentos de descontração, conversas e passeios que tornaram o fim dessa caminhada prazeroso e agradável.*

*Amo todos vocês!*

## AGRADECIMENTOS

- Ao Dr. Osvaldo Resende Almeida pelos ensinamentos, exemplo de ética, postura, profissionalismo e amizade. Muito obrigado pela confiança!!!
- Ao professor Rômulo Cerqueira Leite por fazer a ponte até meu orientador professor Marc Henry, o que permitiu que eu conhecesse um pouco mais a espécie bubalina e tivesse novas experiências.
- Ao meu professor e orientador Dr. Marc Jean Marie Henry pelo privilégio de ter sido seu aluno e por admirar seu trabalho em prol da Medicina Veterinária, nunca medindo esforços para ajudar seus orientados.
- Ao meu professor e Co-orientador Dr. Álan Maia Borges pelas sugestões e orientações durante minhas qualificações, o que permitiram realizar um trabalho cada vez mais consistente.
- Ao Dr. Pietro Sampaio Baruselli pela Co-orientação e por fornecimento de parte de material dos experimentos de campo, pelas valorosas contribuições na pesquisa e sugestões importantes que contribuíram para execução e conclusão do trabalho.
- Aos professores Vicente Ribeiro do Vale Filho, Antônio de Pinho Marques Júnior, José Monteiro da Silva Filho, Antônio Último de Carvalho e Elias Jorge Facury Filho. Minha admiração pelos profissionais de tão elevada capacidade, aos quais devo a oportunidade de grandes ensinamentos na Clínica e Reprodução.
- Aos demais professores e funcionários da Escola de Veterinária da UFMG pelos ensinamentos, ajuda e amizade. A todos os colegas da pós-graduação e a todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho, mas que, injustamente, por um lapso de memória não foram citados.
- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa, fator indispensável para o andamento e finalização do curso.
- Ao Laboratório LANAGRO de Pedro Leopoldo, que através do uso de suas instalações e equipamentos, tornou possível a produção da LDL para a preparação dos meios diluidores.
- Aos funcionários do Laboratório LANAGRO de Pedro Leopoldo (Devanir, Clério, Maurício, Carla, Emanuel e Ana Cláudia), que, sempre me ajudaram produzindo água destilada e água Milli-Q<sup>®</sup> autoclavada, tornando possível a produção dos meios diluidores.
- Ao Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias setor de Reprodução Animal da EV/UFMG Belo Horizonte/MG, em nome de todos os seus professores e funcionários. Em especial a Eliane, técnica de laboratório, pela paciência e auxílio nas avaliações de pH e osmolaridade durante a preparação dos diluidores seminais.
- As Fazendas Modelo (Pedro Leopoldo - MG) e Pedreiras (Oliveira - MG), em nome de seus proprietários e funcionários, pelo apoio a pesquisa fornecendo os animais para a prática experimental.
- Ao Marcelino, Afonso, Sorim e Vanderlei funcionários e amigos da Fazenda Modelo da UFMG em Pedro Leopoldo/MG por toda a ajuda, esforço, paciência e experiência passada, sem a qual eu não conseguiria realizar o experimento, meu sincero obrigado.



- Ao senhor Marcelo Vargas Leão e João Vargas Leão, proprietários da Fazenda Pedreiras e Laticínio Bom Destino, por cederem os animais, moradia, alimentação para mim e equipe, assim como parte do material para os experimentos. Agradeço pela confiança e amizade, sem a qual dificilmente teria conseguido realizar as pesquisas.
- Ao senhor Maruzan gerente da Fazenda Pedreiras em Oliveira/MG pela amizade, ensinamentos, troca de experiências, e pela ajuda durante todo o experimento e apoio em horas difíceis.
- Aos funcionários da Fazenda Pedreiras em Oliveira/MG (Pedro, Getúlio, Gilmar, Jaime, Carlão, Diego, Marcelo, João Pedro e Sávio), pela ajuda no manejo, contenção, aplicação dos fármacos utilizados nos protocolos de indução e sincronização de cio das búfalas. Assim, como pela ajuda condicionamento dos touros bubalinos e coleta do sêmen com vagina artificial. Agradeço de coração a paciência, pelos momentos de muito trabalho, mas também de alegria e descontração.
- À amiga Géssica Helena Oliveira Viana, pela acolhida em sua residência durante os experimentos na Fazenda em Oliveira/MG e após o mesmo. Agradeço de coração a paciência, pelos momentos de alegria e descontração.
- Aos Médicos Veterinários Mayara Ferreira Brito, Beatriz Parzewski Neves, Guilherme de Oliveira Andrade, Patrícia Alencar Auler, Verônica Alexandra Becerra Becerra e Patrícia Alves Dutra, Débora Freitas Silva e Luiza Bergmann Vasconcelos Cunha pela inestimável contribuição para o desenvolvimento desse trabalho.
- À Mayara Ferreira Brito pelas conversas que tornavam o dia de trabalho, com coletas de sêmen, menos árduos e por ser sempre tão prestativa e amiga.
- Aos amigos do curso de pós-graduação e companheiros de moradia na Fazenda Modelo da UFMG, Cahê Francisco Rosa Paz e Alvaro de Paula Lage de Oliveira pelo apoio nas horas de desabaços, dificuldades por estarem sempre ao meu lado e ainda pela convivência, amizade e troca de experiências.
- Aos amigos Raphael Ruas Gouvêa, Natália Solicito, Rodrigo Valadares, Sérgio Silva Rocha Junior e Marcus Vinicius Vieira Gomes pela amizade, conversas, risadas e todo o apoio.
- Aos estagiários, Paola Andrea Oviedo Peñuela, Camila Maria Leite Morais e João Pedro Lopes, por toda a ajuda durante o experimento na fazenda Pedreiras, por serem sempre tão prestativos e amigos.
- As colegas de profissão e amigas Patrícia Alves Dutra, Débora Freitas Silva e Luiza Bergmann Vasconcelos Cunha, por sempre se mostraram dispostas a colaborar e ajudar nos trabalhos de campo com as inseminações e exames de ultrassonografia em búfalas. Com as quais pude desfrutar de grande amizade, companheirismo, valiosas conversas e pelos momentos de descontração que me trouxeram alegria nessa fase tão conturbada.
- Ao Giancarlo Nappi e Luiz Heneine membros dos laboratórios de Pesquisa e Desenvolvimento da Fundação Ezequiel Dias por sugestões e preparo das concentrações dos antioxidantes.
- Ao laboratório BH embriões e em nome de seus funcionários Robson F. Freitas, Lílian G. Lacerda e Lira S. Grapiuna, pela ajuda nos trabalhos de OPU e pela realização da fertilização *in vitro*. Pessoas com as quais tive o prazer de trabalhar e construir uma grande amizade.

- E por último, porém não menos importante, à minha imensa família que me deu todo o apoio logístico e financeiro para que eu pudesse galgar esse título de doutor. Aos meus tios Benedito *in memoriam* e Maria (pela acolhida em sua casa durante o ensino médio), meus tios Ivani, Neide, Osvaldo e Luiza, Moacir e Zelina (pelo apoio financeiro e logística de deslocamento, durante toda a jornada até a graduação), minhas primas Edi, Sandra, Maria e tia Manuelina (pela ajuda e presença em importantes fases de minha trajetória até a faculdade), aos primos Antônio e Sônia (por me acolherem em sua casa nos primeiros anos de faculdade), a minha tia Deolinda e tio Darci (pelo apoio a meus pais na fazenda, o que me permitiu tranquilidade para sair e descobrir o imenso mundo além das divisas de minha casa) e todos os primos e primas que sempre torceram por mim.
- Agradeço, por fim, aos caminhos da vida que nos trazem a lugares inusitados, nos levam ao convívio, à abdição, ao desentendimento e a reconciliação com as mais diversas e amadas pessoas. Hoje noto que nada é por acaso e que tudo tem seu tempo e acontece na hora certa.

DEDICO, HOMENAGEIO e AGRADEÇO!



## UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

### CEUA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

#### **CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo n.º 368/2015, relativo ao projeto intitulado “Diluidores em sêmen bubalino refrigerado e sua eficiência em programas de inseminação artificial”, que tem como responsável Marc Roger Jean Marie Henry, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 23/02/2016. Este certificado espira-se em 23/02/2021.

#### **CERTIFICATE**

We hereby certify that the Protocol n.º 368/2015, related to the Project entitled “Thinners refrigerated buffalo semen and efficiency in artificial insemination programs”, under the supervision of Marc Roger Jean Marie Henry, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 23/02/2016. This certificate expires in 23/02/2021.

Cleuza Maria de Faria Rezende  
Coordenador(a) da CEUA/UFMG  
Belo Horizonte, 23/02/2016.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG  
<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil  
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592  
[www.ufmg.br/bioetica/cetea](http://www.ufmg.br/bioetica/cetea) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)

---

## SUMÁRIO

---

<b>RESUMO</b> .....	<b>24</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>25</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>26</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>28</b>
<b>2.1. Objetivo geral</b> .....	<b>28</b>
<b>2.2. Objetivos específicos</b> .....	<b>28</b>
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>28</b>
<b>3.1. Comportamento bubalino</b> .....	<b>28</b>
<b>3.1.1. Coleta de sêmen com vagina artificial</b> .....	<b>28</b>
<b>3.1.2. Comportamento da fêmea</b> .....	<b>29</b>
<b>3.1.2.1. Sazonalidade</b> .....	<b>29</b>
<b>3.1.2.2. Manifestação do estro</b> .....	<b>30</b>
<b>3.1.2.3. Ciclo estral</b> .....	<b>30</b>
<b>3.1.2.4. Dinâmica folicular</b> .....	<b>31</b>
<b>3.2. Espermatozoides</b> .....	<b>32</b>
<b>3.3. Membrana plasmática do espermatozoide</b> .....	<b>33</b>
<b>3.4. Capacitação espermática</b> .....	<b>34</b>
<b>3.5. Reação acrossômica</b> .....	<b>35</b>
<b>3.6. Características físicas e bioquímicas do sêmen bubalino</b> .....	<b>35</b>
<b>3.7. Princípios da refrigeração do sêmen</b> .....	<b>36</b>
<b>3.8. Princípios da congelação do sêmen</b> .....	<b>39</b>
<b>3.9. Extensores</b> .....	<b>40</b>
<b>3.9.1. Gema de ovo</b> .....	<b>41</b>
<b>3.9.2. Leite</b> .....	<b>43</b>
<b>3.9.3. Lipoproteínas de baixa densidade (LDL)</b> .....	<b>43</b>
<b>3.9.4. Diferentes tipos de extensores</b> .....	<b>45</b>
<b>3.9.4.1. Tris-gema</b> .....	<b>45</b>
<b>3.9.4.2. TES</b> .....	<b>46</b>
<b>3.9.4.3. TES-TRIS</b> .....	<b>46</b>
<b>3.9.4.4. Botu-Bov®</b> .....	<b>47</b>
<b>3.9.4.5. Lecitina de soja</b> .....	<b>47</b>
<b>3.10. Antioxidantes</b> .....	<b>48</b>
<b>3.11. Análise espermática assistida por computador (CASA)</b> .....	<b>49</b>
<b>3.12. Integridade de membrana plasmática pelo teste hiposmótico (HOST)</b> .....	<b>50</b>
<b>3.13. Fertilidade em búfalos</b> .....	<b>51</b>
<b>3.13.1. Monta natural</b> .....	<b>51</b>
<b>3.13.2. Inseminação artificial</b> .....	<b>51</b>
<b>3.13.2.1. Inseminação artificial com uso de sêmen congelado</b> .....	<b>51</b>
<b>3.13.2.2. Inseminação artificial com uso de sêmen refrigerado</b> .....	<b>52</b>
<b>3.14. Protocolos de sincronização</b> .....	<b>52</b>
<b>3.14.1. Protocolo para IATF em búfalas durante o período reprodutivo favorável</b> .....	<b>53</b>
<b>3.14.2. Protocolo para IATF em búfalas durante o período reprodutivo desfavorável</b> .....	<b>54</b>
<b>3.15. Normatização para utilização do sêmen</b> .....	<b>55</b>
<b>3.16. Fertilização in vitro (FIV)</b> .....	<b>55</b>
<b>4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>56</b>
<b>Capítulo 1 - PARTICULARIDADES DO CONDICIONAMENTO DE TOUROS BUBALINOS EM COLETA DE SÊMEN COM VAGINA ARTIFICIAL CONVENCIONAL PARA USO EM ESTAÇÕES REPRODUTIVAS FAVORÁVEL E DESFAVORÁVEL</b> .....	<b>84</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>84</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>84</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>85</b>

<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>86</b>
<b>4. CONCLUSÕES .....</b>	<b>95</b>
<b>AGRADECIMENTOS.....</b>	<b>95</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>95</b>

**Capítulo 2 - VIABILIDADE DOS ESPERMATOZOIDES REFRIGERADOS A 5°C POR 120 HORAS: EFICIÊNCIA DE DIFERENTES EXTENSORES NA MANUTENÇÃO DO SÊMEN BUBALINO PARA UTILIZAÇÃO NA IATF .....**

<b>RESUMO .....</b>	<b>98</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>98</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>99</b>
2.1. <i>Ética</i> .....	99
2.2. <i>Local da execução do experimento</i> .....	100
2.3. <i>Animais</i> .....	100
2.4. <i>Coleta e processamento do sêmen</i> .....	100
2.5. <i>Reagentes</i> .....	100
2.6. <i>Avaliação espermática</i> .....	100
2.7. <i>Concentração espermática</i> .....	101
2.8. <i>Morfologia espermática</i> .....	101
2.9. <i>Avaliação da integridade de membrana plasmática</i> .....	101
2.10. <i>Delineamento e Análise estatística</i> .....	101
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>101</b>
<b>4. CONCLUSÕES .....</b>	<b>108</b>
<b>AGRADECIMENTOS.....</b>	<b>108</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>108</b>

**Capítulo 3 - USO DE SÊMEN BUBALINO REFRIGERADO COMO ESTRATÉGIA PARA INCREMENTAR AS TAXAS DE CONCEPÇÃO EM PROGRAMAS DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO, DURANTE O PERÍODO REPRODUTIVO DESFAVORÁVEL.....**

<b>RESUMO .....</b>	<b>112</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>112</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>114</b>
2.1. <i>Ética</i> .....	114
2.2. <i>Local do experimento</i> .....	114
2.3. <i>Reprodutores utilizados</i> .....	114
2.4. <i>Coleta do sêmen</i> .....	114
2.5. <i>Concentração e processamento do sêmen</i> .....	114
2.6. <i>Transporte do sêmen</i> .....	115
2.7. <i>Matrizes utilizadas</i> .....	115
2.8. <i>Distribuição das fêmeas para inseminação artificial</i> .....	115
2.9. <i>Protocolo de sincronização</i> .....	115
2.10. <i>Diagnóstico de gestação</i> .....	116
2.11. <i>Análise estatística</i> .....	116
<b>3. RESULTADOS.....</b>	<b>116</b>
3.1. <i>Caracterização da atividade ovariana</i> .....	116
3.2. <i>Caracterização do diâmetro folicular (<math>\emptyset</math>)</i> .....	117
3.3. <i>Efeito ano</i> .....	117
3.4. <i>Tipo de sêmen utilizado (refrigerado e congelado)</i> .....	117
3.5. <i>Efeito dias pós-parto</i> .....	118
3.6. <i>Efeito do escore de condição corporal (ECC)</i> .....	118
3.7. <i>Concepção geral por diâmetro folicular</i> .....	119
3.8. <i>Efeito touro</i> .....	119
3.9. <i>Logística final mista</i> .....	120
3.10. <i>Teste de comparação de proporções</i> .....	120

<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	<b>120</b>
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	<b>124</b>
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>124</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>124</b>

**Capítulo 4 - USO DE SÊMEN BUBALINO REFRIGERADO COMO ESTRATÉGIA PARA INCREMENTAR A TAXA DE CONCEPÇÃO EM PROGRAMAS DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO DURANTE O PERÍODO REPRODUTIVO FAVORÁVEL.....127**

<b>RESUMO</b> .....	<b>127</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>127</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>129</b>
2.1. <i>Ética</i> .....	129
2.2. <i>Local do experimento</i> .....	129
2.3. <i>Reprodutores utilizados</i> .....	129
2.4. <i>Coleta do sêmen</i> .....	129
2.5. <i>Concentração e processamento do sêmen</i> .....	129
2.6. <i>Distribuição das fêmeas para inseminação artificial</i> .....	130
2.7. <i>Protocolo de sincronização</i> .....	130
2.8. <i>Diagnóstico de gestação</i> .....	130
2.9. <i>Análise estatística</i> .....	130
<b>3. RESULTADOS</b> .....	<b>131</b>
3.1. <i>Caracterização da atividade ovariana</i> .....	131
3.2. <i>Caracterização do diâmetro folicular (<math>\emptyset</math>)</i> .....	131
3.3. <i>Taxas de concepção total por tipo de sêmen utilizado (refrigerado e congelado)</i> .....	131
3.4. <i>Efeito dias pós-parto</i> .....	132
3.5. <i>Efeito escore de condição corporal (ECC) e tipo de sêmen utilizado</i> .....	132
3.6. <i>Concepção por atividade cíclica em diferentes ovários</i> .....	133
3.7. <i>Efeito muco genital</i> .....	133
3.8. <i>Efeito touro</i> .....	134
3.9. <i>Logística final mista</i> .....	134
3.10. <i>Teste de comparação de proporções</i> .....	134
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	<b>134</b>
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	<b>138</b>
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>138</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>138</b>

**Capítulo 5 - EFICÁCIA DA ASSOCIAÇÃO TES-TRIS E TRIS COM LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE SOBRE A LONGEVIDADE *IN VITRO* DE SÊMEN REFRIGERADO DE BÚFALOS.....143**

<b>RESUMO</b> .....	<b>143</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>143</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>144</b>
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>145</b>
<b>4. CONCLUSÕES</b> .....	<b>150</b>
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>151</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>151</b>

**Capítulo 6 - AVALIAÇÃO DA LONGEVIDADE ESPERMÁTICA EM SÊMEN REFRIGERADO DE BÚFALOS (*BUBALUS BUBALIS*) À 5°C, NO EXTENSOR TRIS COM 10% LDL, EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE LECITINA DE SOJA.....154**

<b>RESUMO</b> .....	<b>154</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>154</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>155</b>
2.1. <i>Ética</i> .....	151

2.2. Local da execução do experimento.....	155
2.3. Animais .....	156
2.4. Coleta e processamento do sêmen .....	156
2.5. Reagentes .....	156
2.6. Envase do sêmen.....	156
2.7. Refrigeração .....	156
2.8. Avaliação da motilidade .....	157
2.9. Avaliação da integridade de membrana plasmática.....	157
2.10. Análise estatística .....	157
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>157</b>
<b>4. CONCLUSÕES .....</b>	<b>165</b>
<b>AGRADECIMENTOS.....</b>	<b>166</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>166</b>
<b>Capítulo 7 - MEIO DILUIDOR A BASE DE LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE A 10%, LECITINA DE SOJA A 0,5% E ACETILCISTEÍNA A 10 mM COMO UMA OPÇÃO PARA FERTILIZAÇÃO DE BÚFALAS.....</b>	<b>170</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>170</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>170</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>171</b>
2.1. Ética.....	171
2.2. Local do experimento.....	171
2.3. Animais utilizados.....	171
2.4. Coleta do sêmen.....	172
2.5. Produção do extensor .....	172
2.6. Concentração espermática .....	172
2.7. Morfologia espermática.....	172
2.8. Processamento do sêmen .....	173
2.9. Avaliação espermática computadorizada (CASA).....	173
2.10. Avaliação da integridade de membrana plasmática.....	173
2.11. Aspiração folicular guiada por ultrassom.....	173
2.12. Processamento dos oócitos .....	174
2.13. Maturação.....	174
2.14. Fertilização <i>in vitro</i> .....	174
2.15. Sêmen usado .....	175
2.16. Cultivo.....	175
2.17. Análise estatística .....	175
<b>3. RESULTADOS.....</b>	<b>175</b>
<b>4. DISCUSSÃO.....</b>	<b>177</b>
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>180</b>
<b>AGRADECIMENTOS.....</b>	<b>180</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>180</b>
<b>6. CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>184</b>
<b>7. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....</b>	<b>185</b>
<b>8. ANEXOS .....</b>	<b>187</b>

---

## LISTA DE TABELAS

---

Tabela 1 -	Médias da duração e amplitude do ciclo estral, estro e momento da ovulação após o final do cio de fêmeas bubalinas, em diferentes países.....	30
Tabela 2 -	Características físicas e bioquímicas do sêmen de animais doméstico .....	36
Tabela 3 -	Taxas de prenhez por IA de búfalas submetidas ao protocolo Ovsynch durante o período reprodutivo favorável (outono e inverno).....	53
Tabela 4 -	Taxas de prenhez por IA de búfalas submetidas ao protocolo de IATF à base de P <sub>4</sub> , E <sub>2</sub> e eCG, durante a estação reprodutiva desfavorável (primavera e verão).....	55
Tabela 5 -	Biometria testicular e ponderal, e características físicas e morfológicas do sêmen de búfalos (30 animais) coletados durante o condicionamento com vagina artificial por até 15 minutos (12 sessões/animal), valores referentes ao melhor ejaculado obtido de cada touro.....	88
Tabela 6 -	Frequências médias dos eventos relacionados ao comportamento sexual de touros bubalinos (n=30), durante condicionamento para coletas de sêmen com vagina artificial por até 15 minutos (12 sessões/animal), nas estações reprodutivas favoráveis (outono e inverno) e desfavoráveis (primavera e verão) de 2014 a 2017.....	89
Tabela 7 -	Coefficientes de correlações lineares fenotípicas entre as características de comportamento sexual em touros bubalinos (n=30), adultos, submetidos a coleta de sêmen com vagina artificial durante as estações reprodutivas favoráveis (outono e inverno) e estações reprodutivas desfavoráveis (primavera e verão) entre os anos de 2014 e 2017.....	90
Tabela 8 -	Logística final mista para variáveis associadas com a coleta de sêmen de 30 touros bubalinos em 12 sessões (n=360) entre os anos de 2014 e 2017.....	93
Tabela 9 -	Desempenho sexual geral de touros bubalinos (n=30) em 12 sessões de coleta (n=360) durante os anos de 2014 a 2017.....	93
Tabela 10 -	Características dos ejaculados de búfalos da raça Murrah (n=11) avaliadas imediatamente pós-coleta.....	102
Tabela 11 -	Efeitos de diferentes extensores utilizados para o sêmen de 11 búfalos (1 ejaculado/doador), pós-diluição (T1 horas - temperatura ambiente), e refrigerado à 5°C (T24, T48, T72, 96 e 120 horas) para os parâmetros de cinética espermática.....	103
Tabela 12 -	Efeitos de diferentes extensores utilizados para o sêmen de 11 búfalos (1 ejaculado/doador), pós-diluição (T0 horas - temperatura ambiente), e refrigerado à 5°C (T1, T24, T48 e T72 horas), para a integridade de membrana espermática (HOST).....	106
Tabela 13 -	Estruturas ovarianas das búfalas submetidas ao exame ginecológico antes da indução e sincronização do cio para inseminação artificial em tempo fixo, somatório dos anos de 2014 a 2017.....	116



Tabela 14 -	Valores médios de diâmetro folicular das búfalas submetidas ao exame ginecológico antes da indução e sincronização do cio para inseminação artificial em tempo fixo, durante os anos de 2014 a 2017.....	117
Tabela 15 -	Taxas médias de concepção total de acordo com o ano, entre búfalas que foram submetidas a IATF (sêmen refrigerado e congelado), durante o período reprodutivo desfavorável (outubro a dezembro) entre os anos de 2014 a 2017.....	117
Tabela 16 -	Taxas médias de concepção de acordo com o ano, em búfalas que foram submetidas a IATF, durante o período reprodutivo desfavorável (outubro a dezembro), utilizando sêmen refrigerado ou congelado nos anos de 2014 a 2017.....	118
Tabela 17 -	Taxas médias de concepção de acordo com o número de dias pós-parto, em búfalas que foram submetidas a IATF, durante o período reprodutivo desfavorável (outubro a dezembro), utilizando sêmen refrigerado ou congelado, somatório dos anos de 2014 a 2017.....	118
Tabela 18 -	Taxas médias de concepção de acordo com o escore de condição corporal (ECC) em búfalas submetidas à IATF, no período reprodutivo desfavorável (outubro a dezembro) de 2014 a 2017.....	119
Tabela 19 -	Taxas médias de concepção das búfalas submetidas a IATF, de acordo com o diâmetro folicular, durante os anos de 2014 a 2017 de acordo com o diâmetro folicular durante os anos de 2014 a 2017.....	119
Tabela 20 -	Taxas médias de concepção na IATF de búfalas com sêmen refrigerado e congelado por touro (n=8), durante os períodos reprodutivos desfavoráveis (outubro a dezembro) de 2014 a 2017.....	119
Tabela 21 -	Resultados do fator de risco ( <i>Razão de Odds Ratio</i> ) para a taxa de concepção bubalina, com o uso do sêmen refrigerado e congelado, em protocolos de sincronização contendo progesterona, estrógeno e eCG, durante o período reprodutivo desfavorável (outubro a dezembro).....	120
Tabela 22 -	Taxas médias de concepção e probabilidade de prenhez após a sincronização estral em função do tipo de sêmen utilizado para búfalos.....	120
Tabela 23 -	Características das estruturas ovarianas das búfalas submetidas ao exame ginecológico e utilizadas na inseminação artificial com o protocolo Ovsynch durante o período reprodutivo favorável (maio a junho).....	131
Tabela 24 -	Taxas de concepção das búfalas submetidas a inseminação artificial com sêmen refrigerado ou congelado de acordo com o diâmetro folicular, submetidas a sincronização com o protocolo Ovsynch.....	131
Tabela 25 -	Taxas de concepção com sêmen refrigerado ou congelado em búfalas submetidas a IATF com Ovsynch, durante o período reprodutivo favorável (maio a junho).....	132
Tabela 26 -	Taxas de concepção de acordo com o número de dias pós-parto em búfalas no período reprodutivo favorável (maio a junho), utilizando sêmen refrigerado e congelado, submetidas a sincronização com o protocolo Ovsynch.....	132

Tabela 27 - Taxas médias de concepção de acordo com o ECC das búfalas, durante o período reprodutivo favorável (maio a junho), submetidas a IATF com Ovsynch.....	132
Tabela 28 - Taxas de concepção para cada tipo de sêmen de acordo com o ECC, entre búfalas durante o período reprodutivo favorável (maio a junho), submetidas a IATF com Ovsynch.....	133
Tabela 29 - Taxas de concepção com sêmen refrigerado ou congelado em búfalas submetidas a IATF com Ovsynch, durante o período reprodutivo favorável (maio a junho) de acordo com a presença de corpo lúteo nos ovários direito e esquerdo.....	133
Tabela 30 - Taxas de concepção das búfalas inseminadas com sêmen refrigerado ou congelado de acordo com presença ou ausência de muco no momento da IATF, utilizando o protocolo Ovsynch.....	133
Tabela 31 - Taxas de concepção de búfalas (n=90) utilizando sêmen refrigerado ou congelado, por touro (n=2), durante o período reprodutivo favorável (maio a junho) com a IATF usando Ovsynch.....	134
Tabela 32 - Resultados do fator de risco ( <i>Razão de Odds Ratio</i> ) para a taxa de concepção bubalina, com o uso do sêmen refrigerado ou congelado em protocolos de sincronização com Ovsynch durante o período reprodutivo favorável (maio a junho).....	134
Tabela 33 - Taxa de concepção e probabilidade de prenhez após a sincronização estral em função do tipo de sêmen utilizado para búfalos.....	134
Tabela 34 - Características físicas e morfológicas dos ejaculados de búfalos da raça Murrah (n=11) avaliados imediatamente pós-coleta.....	146
Tabela 35 - Efeitos de diferentes diluidores, utilizados para sêmen de búfalos (n=11, 1 ejaculado/doador), pós-diluição (T1 hora - temperatura ambiente) e refrigeração à 5°C (T24, T48 e T72 horas), nos parâmetros de cinética espermática pela análise computadorizada (CASA).....	147
Tabela 36 - Efeitos de diferentes diluidores, utilizados para sêmen de búfalos (n=11, 1 ejaculado/doador), pós-diluição (T1 hora) e refrigeração à 5°C (T24, T48 e T72 horas), na integridade de membrana espermática pelo Teste Hiposmótico (HOST).....	149
Tabela 37 - Características físicas e morfológicas dos ejaculados de búfalos da raça Murrah (n=11) avaliados imediatamente pós-coleta.....	158
Tabela 38 - Efeitos do extensor TRIS com 10% LDL com diferentes concentrações de lecitina de soja (LS), utilizados para o sêmen de 11 búfalos (1 ejaculado/doador), pós-diluição (T1 horas - temperatura ambiente), e refrigerado à 5°C (T24, T48, T72, 96 e 120 horas) nos parâmetros de cinética espermática.....	159

Tabela 39 -	Efeitos do extensor TRIS com 10% LDL com diferentes concentrações de lecitina de soja (LS), utilizados para o sêmen de 11 búfalos (1 ejaculado/doador), pós-diluição (T0 horas - temperatura ambiente), e refrigerado à 5°C (T0, T24, T48 e T72 horas) para a integridade de membrana espermática (HOST).....	163
Tabela 40 -	Características físicas e morfológicas dos ejaculados de búfalos da raça Murrah (n=3) avaliados imediatamente pós-coleta.....	175
Tabela 41 -	Médias e desvios padrão dos parâmetros de cinética espermática do sêmen de búfalos (n=3) nos tempos: 0hs (pós-diluição à 37°C), 4hs (equilíbrio até 5°C), 4 à 24hs (refrigeração à 5°C) e pós-congelamento (-196°C) para uso na PIVE.....	176
Tabela 42.-	Médias e desvios padrão dos espermatozoides com membrana plasmática íntegra ao teste hiposmótico, para os espermatozóides de touros búfalos (n=3) diluído em meio TRIS 10% LDL + 0,5% Lecitina de soja + 10 mM Acetilcisteína do processamento ao pós-descongelamento, durante os tempos pós-diluição (37°C), pós-equilíbrio (37 a 5°C), 24 hs de refrigerado (5°C) e pós-congelamento (-196°C).....	176
Tabela 43 -	Variáveis de OPU - PIVE realizadas em três sessões (intervalo de 30 dias - durante os meses de setembro a novembro, respectivamente) em búfalas ( <i>Bubalus bubalis</i> ) Belo Horizonte - MG, 2017.....	177
Tabela 44 -	Efeitos da aspiração folicular (intervalo de 30 dias entre as OPU - durante os meses de setembro a novembro, respectivamente) na recuperação e qualidade dos oócitos para a produção de embriões <i>in vitro</i> em búfalas ( <i>Bubalus bubalis</i> ), utilizando o sêmen refrigerado e congelado, Belo Horizonte - MG, 2017.....	177

---

**LISTA DE FIGURAS**

---

Figura 1 -	Vagina Artificial (Modelo CBB - EV/UFMG.....	29
Figura 2 -	Membrana plasmática do espermatozoide.....	33
Figura 3 -	Choque térmico e formação da estrutura hexagonal na membrana plasmática.....	37
Figura 4	Efeito solução e formação de cristais de gelo no espermatozoide durante o processo de congelamento.....	39
Figura 5	Mecanismo de proteção do espermatozoide por gema de ovo e leite.....	41

---

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

ABCB: Associação Brasileira de Criadores de Búfalos;  
ABIEC: Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne;  
ACP-112<sup>®</sup>: Diluidor de sêmen comercial água de coco;  
ALT: Amplitude do Deslocamento Lateral de Cabeça;  
AMPc: Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico;  
BB: Botu-Bov<sup>®</sup>;  
BCF: Frequência de Batimentos de Cauda;  
BE: Benzoato de Estradiol;  
Botu-Bov<sup>®</sup>: Diluidor comercial para sêmen bovino;  
BSPs: Proteínas do Plasma Seminal;  
Ca<sup>2+</sup>: Íon cálcio;  
CASA: Computer-Assisted Semen Analysis (Análise Computadorizada do Sêmen);  
CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior;  
CBB: Central de Biotecnologia em Bubalinocultura;  
CBRA: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal;  
CCPS: Centro de Coleta e Processamento de Sêmen;  
CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais;  
CL: Corpo Lúteo;  
CLOD: Corpo Lúteo Ovário Direito;  
CLOE: Corpo Lúteo Ovário Esquerdo;  
cm: Centímetro;  
DM: Defeitos maiores;  
DT: Defeitos totais;  
DNA: Ácido Desoxirribonucleico;  
DP: Desvio Padrão;  
D0: Dia Zero;  
ECC: Escore de Condição Corporal;  
eCG: Gonadotrofina Coriônica Equina;  
EROS: Espécies Reativas de Oxigênio;  
EV: Escola de Veterinária;  
E<sub>2</sub>: Estrógeno;  
FMVZ: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia;  
FAO: Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura;  
FIV: Fertilização *in vitro*;  
FSH: Hormônio Folículo Estimulante;  
g: Grama;  
GnRH: Hormônio liberador de gonadotrofina;  
H<sub>2</sub>O: Água;  
H<sup>+</sup>: Íons de hidrogênio;  
HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>: Bicarbonato;  
HOST: Teste Hiposmótico;  
Hs: Horas;  
Hz: Hertz;  
IA: Inseminação Artificial;  
IATF: Inseminação Artificial em Tempo-Fixo;  
IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística;  
ICSI: Injeção Intracitoplasmática;  
INCT: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia;  
K<sup>+</sup>: Íons de potássio;  
L: Litro;  
LH: Hormônio luteinizante;  
LIN: Linearidade;  
LDL: Low Density Lipoprotein (Lipoproteína de Baixa Densidade);

LS: Lecitina de Soja;  
MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento;  
MG: Minas Gerais;  
MT: Motilidade Total;  
MP: Motilidade Progressiva;  
N: Normais;  
mm: Milímetro;  
mL: Mililitro;  
 $\mu\text{m}$ : Micrômetro;  
min.: Minutos;  
 $\mu\text{M}$ : Micromolar;  
Mot. Total: Motilidade Total;  
Mot. Progressiva: Motilidade Progressiva;  
NAC: N-acetilcisteína;  
 $\text{PGF}_2\alpha$ : Prostaglandina;  
pH: Potencial hidrogeniônico;  
 $\text{P}_4$ : Progesterona;  
PE: Perímetro Escrotal;  
PIB: Produto Interno Bruto;  
PIVE: Produção *in vitro* de embriões;  
ROS: Espécie Reativas de Oxigênio;  
S: Sul;  
SOF: Fluido Sintético do Oviduto;  
SPTZ: Espermatozoides;  
STR: Retilinearidade;  
Tel: Telefone;  
TES: Hidroxi-metil amino etano-sulfônico;  
TRIS: Tris (hidroximetil-aminometano) gema de ovo-frutose;  
UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais;  
USP: Universidade de São Paulo;  
UV: Ultra-violeta;  
VRA: Departamento de Reprodução Animal;  
W: Oeste;  
VAP: Velocidade de Trajeto;  
VCL: Velocidade Curvilínea;  
VSL: Velocidade Progressiva;  
WOB: Índice de Oscilação;  
UI: Unidade Internacional;  
ZP3: Glicoproteína da zona pelúcida;

---

## LISTA DE SÍMBOLOS

---

$\alpha$ : Alfa;  
@: Arroba;  
\*: Asterisco;  
/: Barra;  
 $\beta$ : Beta;  
[ ]: Colchete;  
&: Comercial;  
 $\emptyset$ F: Diâmetro folicular;  
°: Grau;  
°C: Graus Celsius;  
-: Hífen;  
=: Igual;  
 $\kappa$ : Kappa;  
 $\geq$ : Maior ou igual;  
 $\pm$ : Mais ou menos;  
®: Marca registrada;  
 $\leq$ : Menor ou igual;  
 $\mu$ L: Microlitro;  
': Minuto;  
 $\times$ : Multiplicador;  
( ): Parênteses;  
%: Percentagem;  
": Segundos;

## RESUMO

A exploração da bubalinocultura tem crescido constantemente nos últimos anos. Neste contexto, o uso de biotécnicas da reprodução como a inseminação artificial em tempo fixo (IATF), aspiração folicular (OPU) e produção *in vitro* de embriões (PIVE), têm se mostrado factíveis em bubalinos, embora ainda com uma eficiência reduzida e com pouca aplicação comercial comparado a outras espécies animais. Isto se deve a características particulares da espécie, como dificuldade de identificação do estro e à complicação em condicionar touros para a coleta de sêmen com a vagina artificial, principalmente animais adultos. Somados a isto, mesmos os animais após o condicionamento e coleta de sêmen, não mantêm uma constância na produção de ejaculados com qualidade, chegando mesmo a interromper a produção de sêmen sem um motivo aparente. Em parte, esses problemas foram solucionados com a elaboração de protocolos que permitam o uso da IA sem a necessidade de detecção do estro, ou seja, em tempo fixo (IATF). Já o conhecimento da dinâmica folicular nessa espécie possibilitou o desenvolvimento de protocolos para controlar as fases folicular e luteínica do ciclo estral e, por fim, a ovulação. A combinação destes tratamentos de sincronização da ovulação permite o uso da inseminação artificial durante todo o ano, possibilitando o ganho genético e a distribuição da concepção e dos partos conforme a demanda do mercado. No entanto, a inseminação artificial em bubalinos, que tem como base o uso do sêmen congelado, apresenta alguns gargalos como: a falta de sêmen no mercado nacional; touros com genética superior, mas que não resistem ao processo de congelamento; injúrias causadas aos espermatozoides durante o processo de congelamento, que pode causar um decréscimo de até 60% na viabilidade da população espermática em bubalinos e a existência de deficiências básicas de manejo nas propriedades. Face ao exposto, esse estudo tem o objetivo de testar a eficácia do sêmen refrigerado e congelado na IATF nos períodos reprodutivos favorável e desfavorável, assim como na fertilização *in vitro* para melhorar as taxas de fertilidade, estudar a expressão dos comportamentos sexuais de touros bubalinos e, a aplicação de técnicas de manejo racional durante o período de coleta de sêmen com a vagina artificial, visando facilitar o condicionamento e coleta de sêmen, bem como desenvolver novos extensores para o sêmen de búfalos. Os resultados obtidos com as inseminações artificiais durante o período reprodutivo favorável e desfavorável mostraram taxa de prenhez superior para o sêmen refrigerado. Resultado este que também foi obtido com a PIVE. Quanto ao comportamento dos touros, verificou-se que estes animais são passíveis de condicionamento para a coleta de sêmen com vagina artificial á campo. Após diversos testes foi verificado que o diluidor TRIS com 10% de LDL, acrescido de 0,5% de lecitina de soja e com a adição de 10 mM do antioxidante acetilcisteína apresentou os melhores resultados de longevidade e fertilidade *in vitro*.

**Palavras chave:** Análise de esperma assistida por computador, espermatozoides de búfalo, fertilidade *in vivo*.



## ABSTRACT

Bubalinoculture exploitation has been growing steadily in recent years. In this context, the use of reproductive biotechniques such as fixed-time artificial insemination (FTAI), follicular aspiration (OPU) and *in vitro* embryo production (IVP) have been shown to be feasible in buffaloes, although still with reduced efficiency and with little commercial application compared to other animal species. This is due to particular characteristics of the species, such as difficulty in identifying the estrus and the complication in conditioning bulls for the collection of semen with the artificial vagina, mainly adult animals. Added to this, even the animals after the conditioning and collection of semen, does not maintain a constancy in the production of ejaculates with quality, even interrupting the production of semen without an apparent reason. In part, these problems have been solved with the elaboration of protocols that allow the use of AI without the need of detection of estrus, that is, in fixed time (FTAI). Already the knowledge of the follicular dynamics in this species allowed the development of protocols to control the follicular and luteal phases of the estrous cycle and, finally, ovulation. The combination of these ovulation synchronization treatments allows the use of artificial insemination throughout the year, allowing the genetic gain and distribution of conception and delivery according to market demand. However, artificial insemination in buffaloes, which is based on the use of frozen semen, presents some bottlenecks such as: the lack of semen in the national market; bulls with superior genetics, but that do not resist the freezing process; injuries caused to the spermatozoa during the freezing process, which can cause up to 60% decrease in the viability of the sperm population in buffaloes and the existence of basic management deficiencies in the properties. In the light of the above, this study aims to test the efficacy of refrigerated and frozen semen on FTAI in favorable and unfavorable reproductive periods, as well as *in vitro* fertilization to improve fertility rates, to study the expression of sexual behavior of buffalo bulls and, the application of rational management techniques during the period of collection of semen with the artificial vagina, aiming to facilitate the conditioning and collection of semen, as well as to develop new extensors for buffaloes semen. The results obtained with the artificial inseminations during the favorable and unfavorable reproductive period showed superior pregnancy rate for the refrigerated semen. This result was also obtained with IVP. Regarding the behavior of the bulls, it was verified that these animals can be conditioned for the collection of semen with artificial vagina in the field. After several tests it was verified that the TRIS diluent with 10% LDL plus 0.5% soy lecithin and with the addition of 10 mM of the antioxidant acetylcysteine showed the best longevity and fertility results *in vitro*.

**Keywords:** Computer-assisted sperm analysis. buffalo spermatozoa. *in vivo* fertility.

## 1. INTRODUÇÃO

Os búfalos (*Bubalus bubalis*) foram introduzidos no Brasil a partir do final do século XIX, usualmente em pequenos lotes originários da Ásia, Europa (Itália) e Caribe. Por ser uma espécie de elevada rusticidade, capacidade de grande adaptabilidade aos mais variados ambientes, elevada fertilidade e longevidade produtiva, possibilitaram que o rebanho crescesse rapidamente e, ocupassem regiões com as mais diversas condições edafo-climáticas dentro do território e, que em alguns casos são inadequadas para a criação de bovinos e outros ruminantes.

Segundo a FAO (2016), o rebanho bubalino tem crescido rapidamente, passando dos pouco mais de 200 animais introduzidos no país, para um rebanho de 1.319.478 búfalos, sendo o maior rebanho do Ocidente. No entanto, o sistema estatístico oficial do Brasil onde, em muitas situações, o registro de bubalinos se confunde com o de bovinos, resulta em uma dimensão real do rebanho bubalino subestimada. Assim sendo, a ABCB estima, por levantamentos indiretos e avaliações de abate/desfrute, que o rebanho bubalino nacional atinja cerca de 3 milhões de cabeças (Crudeli *et al.*, 2016). Comparando com as demais espécies de produção, o búfalo é a espécie que mais cresceu nos últimos anos, tendo apresentado 7,3% para o ano de 2011/2016, frente os 2,5% (bovino); 1,2% (suíno); 1,6% (caprino); 4,2% (ovino) e 6,6% (aves) para o mesmo período segundo dados da Pesquisa Pecuária (Bernardes, 2016).

Segundo Bernardes (2016), no Brasil os búfalos são criados em 16.000 criatórios, distribuídos em 16 estados da federação, envolvendo cerca de 80.000 pessoas no campo. São abatidas aproximadamente 117.000 cabeças, movimentando um mercado de 448 milhões na cadeia de carnes nacional. Ainda segundo o criador e estudioso, como espécie de dupla aptidão, das cerca de 437 mil matrizes criadas no país, 17% são utilizadas para produção de leite que, por seu maior teor de sólidos totais e características especiais tem cerca de 85% da produção transformadas em laticínios, num mercado de R\$ 666 milhões anuais.

Nesse contexto, diversas biotécnicas da reprodução animal como a inseminação artificial (IA), inseminação artificial em tempo fixo (IATF), transferência de embriões (TE), produção *in vitro* de embriões (PIVE), sexagem de gametas, transgenia, clonagem, desenvolvimento de marcadores moleculares para caracteres produtivos e vagina artificial interna vêm sendo adaptadas para o sistema de produção de bubalinos. No entanto, segundo Crespilho (2010) nenhum desses avanços, por mais complexos e inovadores, representam biotécnicas tão importantes e abrangentes quanto a IA para a produção e melhoramento genético animal em escala industrial, atuando de forma decisiva para a obtenção de animais com maior potencial de produção e reprodução.

Para a obtenção de índices reprodutivos elevados e uma boa rentabilidade na produção quanto para o emprego das biotécnicas da reprodução é de fundamental importância conhecer a fisiologia reprodutiva da espécie bubalina. Entretanto, no tocante as fêmeas a sazonalidade reprodutiva, dificuldade de identificação do estro e a determinação do melhor momento para a realização da IA devido a períodos variáveis de aceitação de cio (Baruselli *et al.*, 2009 e Porto-Filho *et al.*, 2014); somadas ao balanço energético negativo (expresso através do escore de condição corporal), sobretudo no período pós-parto, são condições que confluem na determinação dos quadros de anestro, comumente observados em vários rebanhos. O anestro pós-parto determina o aumento do intervalo de partos, que por sua vez leva a uma menor eficiência reprodutiva em virtude da diminuição das taxas de serviço, e por consequência, um menor número de vacas é inseminada a cada ano (Crespilho, 2010).

No tocante aos machos, o principal entrave para implementação dos programas de IA é a dificuldade de encontrar sêmen no mercado, em face de relatos de touros bubalinos que, mesmo condicionados à coleta com vagina artificial convencional em centrais, se tornaram resistentes ao serviço artificial ao longo do tempo (Prabhu e Bhattacharya, 1954; Bernardes, 2017 - comunicação pessoal), dificultando e tornando inviável economicamente a sua manutenção em centrais de congelamento de sêmen. Adicionalmente, existe o desconhecimento comportamental dos touros

bubalinos envolvidos no processo de manejo, coleta e congelamento do sêmen. E finalmente, no campo há dificuldade de utilizar a eletro-ejaculação em búfalos, devido a uma maior sensibilidade destes aos estímulos elétricos (Ohashi, 2008 e Henry *et al.*, 2017), podendo ocasionar acidentes, principalmente em animais adultos. Isso acaba demandando um longo período para o treinamento dos animais com a vagina artificial para a coleta e em muitas vezes findando com insucesso.

Para tentar solucionar estes problemas, foram desenvolvidos protocolos de sincronização da ovulação (IATF), que permite a IA sem a necessidade de detecção de estro e em um tempo pré-determinado. Na estação de reprodução outono e inverno, utiliza-se o protocolo com GnRH e PGF<sub>2</sub>α para sincronizar búfalas cíclicas (Baruselli *et al.*, 1999, Campanile *et al.*, 2010; Vecchio *et al.*, 2012 e Almeida *et al.*, 2016a). No entanto, segundo Baruselli *et al.* (2003a) a eficiência deste protocolo é comprometida, quando aplicada fora da estação de reprodução (primavera-verão). Assim, os protocolos de estradiol (E<sub>2</sub>), progesterona (P<sub>4</sub>), mais gonadotrofina coriônica equina (eCG), para IATF foram aplicados com sucesso em fêmeas bubalinas em lactação fora da estação de reprodução (Baruselli *et al.*, 2002, 2003a; Porto-Filho *et al.*, 2004; Carvalho *et al.*, 2007; Monteiro *et al.*, 2016 e Almeida *et al.*, 2017).

Quanto a dificuldade em condicionar e coletar sêmen de búfalos, foi desenvolvido um dispositivo intravaginal (vagina artificial interna), que acoplada ao aparelho reprodutor da fêmea bubalina, permite a coleta do sêmen de touros bubalinos em um menor tempo, pois eliminaria o condicionamento. Esse dispositivo além de sanar o problema do uso do eletroejaculador em touros adultos (devido a agressividade), permite avaliar a libido e a capacidade de monta do reprodutor (Neves, 2015a).

Aparentemente os avanços obtidos nas metodologias e técnicas para identificar o estro, induzir e sincronizá-lo, somado ao condicionamento e uso da vagina artificial interna para coleta de sêmen em búfalos parecia ter solucionado em parte os problemas reprodutivos para a espécie. No entanto, mesmo a IA sendo a biotecnica mais utilizada para a espécie bubalina, ela esta baseada no uso de sêmen congelado (Barnabé *et al.*, 1994; Ribeiro *et al.*, 1994 e Garcia *et al.*, 2008). Sabendo-se que este tipo de sêmen danifica as organelas e membranas dos espermatozoides, induzindo mudanças na capacitação espermática e na reação acrossomal (Garner *et al.*, 2001), e que ao ser avaliado pelo sistema CASA (Rasul *et al.*, 2001), concluíram que o processo causa lesões no axonema dos espermatozoides de búfalos, diminuindo sua capacidade de movimentação. Consequentemente essas alterações sofridas pelos espermatozoides, irão resultar em menores taxas de concepção quando comparado ao uso do sêmen refrigerado que sofre menos danos em seu processo de resfriamento.

Passados quase 70 anos da descoberta do glicerol como crioprotetor para espermatozoides (Polge *et al.*, 1949), utilizado nas diversas espécies de animais domésticos e para humanos, ainda há um decréscimo de 50 a 60% na viabilidade da população espermática pós-descongelação, uma vez que se observam diversas alterações bioquímicas e estruturais (Watson, 1995; Den Daas, De-Jong, 1998 e Rasul *et al.*, 2001).

Neste contexto, visando amenizar esse problema, pesquisas recentes foram realizadas avaliando a preservação do sêmen na forma refrigerada em bovinos (Crespilho *et al.*, 2012; Resende e Almeida, 2013; Borges-Silva *et al.*, 2015; Borges-Silva *et al.*, 2017 e Borchardth *et al.*, 2018) e bubalinos (Sing *et al.*, 2012; Almeida *et al.*, 2015; Almeida *et al.*, 2016b e Almeida *et al.*, 2017). Contudo, até o momento a existência de deficiências básicas de manejo nas propriedades, somada a dificuldade de assistência técnica veterinária, têm limitado a ampla difusão da técnica na maior parte dos sistemas de produção agropecuária do país. Constatando-se que, apenas uma pequena parcela das fêmeas bubalinas em idade reprodutiva (cerca de 1%) são inseminadas no Brasil (IBGE, 2013).

Diante do exposto, o presente trabalho visa testar a hipótese de que o uso do sêmen refrigerado de búfalos em diferentes extensores e, utilizado nos períodos reprodutivos favoráveis (outono e inverno) e desfavoráveis (primavera e verão), quando usado nas diversas biotécnicas

reprodutivas (IATF e PIVE), apresentará um resultado superior ao sêmen congelado no tocante a fertilidade.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. *Objetivo geral*

Analisar a cinética, longevidade espermática, integridade de membrana e a fertilidade do sêmen refrigerado de búfalos (em programas de IATF) em sistema de refrigeração passiva (não automatizada) por até 120 horas à 5°C em diferentes meios extensores, durante o período reprodutivo favorável (outono e inverno) e desfavorável (primavera e verão), comparando-as com sêmen congelado.

### 2.2. *Objetivos específicos*

- Desenvolver meios extensores alternativos para a IA com o sêmen refrigerado.
- Avaliar *in vitro* e *in vivo* o sêmen refrigerado como alternativa para a preservação do sêmen bubalino destinado a programas de IATF.
- Avaliar os efeitos da refrigeração do sêmen bubalino a 5°C por até 24 horas, comparado ao sêmen congelado, utilizando o extensor TRIS com 10% LDL + 0,5% Lecitina de soja + 10 mM do antioxidante Acetilcisteína na PIVE de búfalos.
- Avaliar o comportamento e a eficiência da coleta de sêmen de touros bubalinos a campo.

## 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 3.1. *Comportamento bubalino*

Na história da espécie bubalina é frequentemente divulgada a imagem de um animal agressivo e causador de mortes para com os pares de sua espécie, como também para humanos envolvidos em sua exploração, principalmente dos animais com aptidão leiteira. No entanto, apesar de existirem relatos de diversos acidentes fatais envolvendo estes animais, após a sua domesticação por volta 6300 anos antes do presente, estes eventos reduziram, mas a fama de que o búfalo é um animal bravo e causador de acidentes fatais permanece.

Segundo De Rosa *et al.* (2009) nas últimas três décadas, devido ao interesse econômico, a criação de búfalos passou de técnicas tradicionais baseadas no uso extensivo de ambientes de pântanos para sistemas intensivos que foram desenvolvidos para gado leiteiro sem acesso a áreas de pastagem e água para banho dependendo da região onde os animais se encontram. Ainda segundo os autores, tais mudanças afetaram negativamente vários aspectos do comportamento e do bem estar dos búfalos. Mas o que se observa em fazendas de produção de leite, é que a quase totalidade dos animais, tanto machos quanto fêmeas, são muito dóceis, de fácil condicionamento, gastando boa parte de seu tempo quando possível se refrescando em lagoas, buracos ou piscinas de lama e rios, para fins termorreguladores e para proteção e possivelmente controle contra ectoparasitas e moscas (BOSTID, 1981). Os búfalos são geralmente reconhecidos como animais curiosos. No entanto, os búfalos também são animais gregários, com pequenas distâncias interindividuais, particularmente quando se movem (Napolitano *et al.*, 2013).

#### 3.1.1. *Coleta de sêmen com vagina artificial*

No tocante a reprodução, o búfalo é considerado um animal fácil de adaptar e ser capacitado para a coleta de sêmen com vagina artificial (Sansone *et al.*, 2000 e Vale, 2011). Segundo Henry *et al.* (2017) para a coleta de sêmen recomenda-se a utilização de vagina artificial, cujo modelo é o mesmo utilizado em bovinos, podendo ser um pouco mais curta “30 a 35 cm de comprimento” (Figura 1). Não há necessidade de lubrificação (lubrificação natural do pênis é suficiente) e a

temperatura interna da vagina artificial deve estar entre 42 e 45°C (Sansone *et al.*, 2000; Ohashi *et al.*, 2011 e Vale, 2011). Recomenda-se, para cada sessão de coleta por vagina artificial, a realização de falsas montas para aumentar a qualidade do ejaculado, e quando efetivas, recomenda-se a utilização de dois ejaculados, espaçados de 30 minutos (Sansone *et al.*, 2000; Ohashi *et al.*, 2011 e Vale, 2011).



Figura 1 - Vagina Artificial (Modelo CBT - EV/UFGM).  
Fonte: Almeida, J. (2014).

Há dificuldade de encontrar sêmen no mercado, em face de relatos de touros bubalinos que mesmo condicionados à coleta com vagina artificial convencional em centrais se tornaram resistentes ao serviço artificial ao longo do tempo (Prabhu e Bhattacharya, 1954 e Bernardes, 2017 - comunicação pessoal), dificultando e tornando inviável economicamente a sua manutenção em centrais de congelamento de sêmen. Isto se deve, principalmente por dois motivos: 1) durante a coleta de sêmen, os animais são estimulados sexualmente de tal forma que as atividades prematórias (cortejo e reconhecimento da fêmea em cio) podem ser ignoradas para produzir o número desejado de ejaculações, no menor tempo possível (Mader e Price, 1984) e 2), pelo fato de machos desta espécie não manterem uma regularidade de ejaculados com qualidade, que permitam o congelamento por várias semanas seguidas, havendo várias coletas alternadas de sêmen com e sem qualidade e mesmo interrupção nas ejaculações sem motivo aparente.

Outro problema relatado é a falta de conhecimento comportamental dos touros bubalinos envolvidos no processo de manejo, coleta e congelamento do sêmen. É negligenciado que o búfalo é mais sensível e receoso comparado com touros bovinos, requerendo mais tempo para se acostumar com a mudança de ambiente, pessoal envolvido no manejo e trato, além de necessitarem um tempo maior para adquirir confiança na pessoa envolvida na coleta e responderem adequadamente as metodologias utilizadas.

Já no campo há dificuldade de utilizar a eletro-ejaculação em búfalos, devido a uma maior sensibilidade destes aos estímulos elétricos (Ohashi, 2008), podendo ocasionar acidentes, principalmente em animais adultos. Porém, em animais mais jovens tem-se obtido algum sucesso (Ohashi *et al.*, 2011).

Em estudo com animais condicionados a coleta com vagina artificial, durante 1 ano, verificou-se que o tempo médio de reação foi de 1,9 minutos até a ejaculação (Henry *et al.*, 2017). Sucesso da tentativa de coleta seminal semanal superior a 90%. Sendo esta taxa de sucesso mantida semelhante durante outros três anos seguidos de avaliação. Neste estudo, o tempo máximo permitido para interação macho/fêmea foi de 10 minutos.

### 3.1.2. Comportamento da fêmea

#### 3.1.2.1. Sazonalidade

A espécie bubalina quando criada em locais distante da região equatorial, tem seu comportamento reprodutivo influenciado positivamente pela diminuição nas horas de luz do dia (Zicarelli, 1990). Segundo Vale *et al.* (1996) em condições tropicais, onde a variação de luminosidade e temperatura são mínimas, é possível haver uma distribuição dos nascimentos durante

todo o período do ano, visto que o problema parece estar relacionado a oferta de alimento. Desta forma, à medida que se distancia da linha do equador, tanto no sentido norte quanto no sentido sul, o búfalo torna-se um animal poliestral sazonal de dias curtos (Hafez, 1954; Gill *et al.*, 1973; Vale, 1988; Beg e Totey, 1999; Zicarelli e Vale, 2002). Ainda segundo Vale (1988) a sazonalidade reprodutiva de cada região é uma característica que deve ser levada em consideração na implantação de um programa reprodutivo.

### 3.1.2.2. Manifestação do estro

O estro é a fase mais conhecida do ciclo estral por ser caracterizada pelos visíveis sinais de cio e receptividade sexual. Porém, nas búfalas, diferentemente das vacas, os sinais de cio são mais discretos, o que proporciona maior probabilidade de falha na detecção pelo inseminador (Baruselli, 1999). Segundo Sing *et al.* (1984); Vale (1988); Vale *et al.* (1994); Berber *et al.* (2002); Baruselli *et al.* (2007) e Porto-Filho *et al.* (2014), animais em estresse térmico podem manifestar maior frequência de cios a noite. Entretanto, Porto-Filho *et al.* (2005), não observaram diferença significativa ( $P>0,05$ ) na distribuição das montas durante as 24 horas do dia, quando utilizou a radiotelemetria para detecção de estro.

Para Baruselli e Carvalho (2002), as búfalas obedecem a uma hierarquia, em que as dominantes efetuam a monta e impedem as subordinadas de serem montadas pelos rufiões ou reprodutor. Porto-Filho *et al.* (2005), em região com clima tropical de altitude, registraram, em 10% dos estros, fêmeas que não demonstraram qualquer comportamento de aceitação de monta, sendo tais casos caracterizados como estros silenciosos.

Em trabalho realizado por Oba (2003) foi verificado que a ocorrência de “cios” silenciosos e anovulatórios são frequentes, principalmente em animais submetidos à alimentação deficiente ou expostos a estresse térmico. Segundo a autora, a eliminação do muco através dos lábios vulvares é uma característica inconstante e depende, em muito, da observação do estro, sendo, na maioria das vezes, transparente e pegajoso no início, mudando para turvo até opaco com o avanço desse estado.

### 3.1.2.3. Ciclo estral

As pesquisas indicam divergências quanto à duração do cio em búfalas, o que segundo Baruselli (1992) pode estar relacionado a diferentes condições climáticas e de manejo, conforme tabela 1. Ainda segundo o autor, o conhecimento do tempo médio para que ocorra a ovulação após o final do cio é fator importante para se definir o horário aproximado da inseminação artificial.

Tabela 1 - Médias da duração e amplitude do ciclo estral, estro e momento da ovulação após o final do cio de fêmeas bubalinas, em diferentes países.

País	Ciclo estral*	Estro **	Ovul. após estro ***	Autor
-	21,0 (18-24)	18 (5-36)	15 (18-45)	Drost (2007)
Brasil	16-33 (21-24)	(8-32)	21	Vale e Ribeiro (2005)
-	21,0 (18-22)	21 (17-24)	(15-18)	Hafez e Hafez (2004)
Itália	21,0 (15-29)	20 (4-64)	24,0 (5-40)	Seren e Parmeggiani (1997)
Brasil	21,3 (18-26)	14,8 (6-24)	16,9 (6-30)	Baruselli (1993a)
Índia	21,4±2,0 (17-26)	(12-72)	(12-24)	Danell (1987)
Malásia	22,0 (17-24)	(12-24)	(12-18)	Jainudeen (1986)
Brasil	23,7±4,9 (16-33)	23,8±8,2 (12-31)	19,8±5,8 (9-30)	Vale (1983)
Japão	21,5±4,7 (11-35)	19,9±4,4 (9-27)	13,9±3,4 (6-21)	Kanai e Shimuzo (1983)
Índia	22,27	24,18	10,83 (4-23)	Pradyumna Rao <i>et al.</i> (1982)
China	24,0	43,17	-	Wang (1979)
Tailândia	22,0	17-27	-	Kamonpatana <i>et al.</i> (1979)
Indonésia	20,8±0,7 (19-25)	41,4±4,52 (24-66)	-	Toelihere (1977)
China	26,3 (12-30)	-	11,35 (0-41,5)	Wang <i>et al.</i> (1965)
Bulgária	21,0±4,0	24-36	-	Ivanov e Zachariev (1960)

Fonte: Adaptado Vale e Ribeiro (2005). \* = dias; \*\*Estro = horas; \*\*\*Ovulação após o final do estro = horas.

#### 3.1.2.4. Dinâmica folicular

Os pioneiros a estudar o crescimento folicular em bubalinos foram Singh *et al.* (1984), que ao trabalhar com novilhas da raça Surti, observaram a presença de estruturas ovarianas durante o ciclo. Posteriormente, com base na avaliação histológica ovariana, Danell (1987) observou a existência de duas ondas de crescimento folicular em novilhas bubalinas. A primeira onda iniciou-se no 3º dia, permanecendo até o 13º dia do ciclo estral, enquanto a segunda onda iniciou-se no 9º dia, mantendo-se até o término do ciclo estral.

No Brasil, Del Rei *et al.* (1991), Baruselli (1997) e Bartolomeu *et al.* (2003) foram os primeiros a estudar a dinâmica folicular em búfalas, utilizando a ultrassonografia para definir os padrões de desenvolvimento dos folículos nessa espécie. Segundo Baruselli *et al.* (1997), Bó *et al.* (2000), Warriach e Ahmad (2007), Siqueira *et al.* (2009) e Baruselli *et al.* (2013) as fêmeas bubalinas apresentavam comportamento folicular semelhante àquele relatado para bovinos. Oba (2003) verificou que, embora a espécie bubalina tenha certa semelhança com os bovinos, há peculiaridades que os distinguem e, em decorrência da sua potencialidade produtiva nos diferentes ecossistemas em que são criados, o conhecimento dos aspectos reprodutivos, tanto das fêmeas quanto dos machos, são requisitos básicos para a implantação dos rebanhos, como também para o melhoramento e a avaliação da fertilidade destes animais.

As búfalas apresentam menor número de folículos primordiais e maior taxa de atresia folicular do que as vacas (Danell, 1987 e Le Van Ty *et al.*, 1989). Danell (1987) relatou ter encontrado 12.636 e 10.132 folículos primordiais em novilhas bubalinas cíclicas e não cíclicas, número inferior ao previamente reportado para vacas (150.000; Erickson, 1966). Posteriormente, Carvalho (2005) encontrou um número médio de 15.449 folículos pré-antrais morfológicamente normais por ovário em búfalas impúberes, adultas gestantes e não gestantes.

Vale e Ribeiro (2005), descreveram ter observado entre 60 a 100 mil folículos primordiais para vacas (*Bos taurus taurus*) e apenas 12 a 20 mil folículos primordiais para búfalas. Adicionalmente, os ovários bubalinos também contêm menor número de folículos antrais do que ovários bovinos (46,3 vs. 90 folículos  $\geq 1$  mm por par de ovários), conforme relatos de Settergren (1964), Danell (1987), Kumar *et al.* (1997), Palta e Chauhan (1998) e Gupta *et al.* (2001).

Vários estudos demonstraram que os bubalinos podem apresentar de uma a três ondas de crescimento folicular por ciclo estral, dependendo da duração da fase lútea, havendo predomínio de ciclos com duas ondas foliculares (Taneja *et al.*, 1996; Baruselli *et al.*, 1997; Manik *et al.*, 1998; Ali *et al.*, 2003; Presicce *et al.*, 2004; Awasthi *et al.*, 2006, Awasthi *et al.*, 2007 e Warriach e Ahmad, 2007).

Pesquisas demonstraram que o número de ondas de crescimento folicular pode ser influenciado por vários fatores: como duração da fase lútea (Ginther *et al.*, 1989 e Baruselli *et al.*, 1997) baixa ingestão de nutrientes (Murphy *et al.*, 1991), concentrações plasmáticas de inibina-A e FSH (Parker *et al.*, 2003), entre outros.

Quando se comparam duas ondas de crescimento folicular entre espécies, o intervalo interovulatório em *Bos taurus* (nulíparas da raça Holandesa), *Bos indicus* (nulíparas e múltiparas da raça Nelore e nulíparas da raça Brahma) e bubalinos (múltiparas da raça Murrah), obteve-se 20,4 $\pm$ 0,3 dias (Ginther *et al.*, 1989); 20,2 $\pm$ 0,4 a 20,7 $\pm$ 0,5 dias (Rhodes *et al.*, 1995 e Figueiredo *et al.*, 1997) e 21,6 $\pm$ 1,2 a 22,3 $\pm$ 0,9 dias (Manik *et al.*, 1994 e Baruselli *et al.*, 1997), respectivamente. Entretanto, para três ondas de crescimento folicular tem-se, respectivamente, 22,8 $\pm$ 0,6 (Ginther *et al.*, 1989); 21,9 $\pm$ 0,5 a 22,0 $\pm$ 0,4 dias (Figueiredo *et al.*, 1997) e 24,5 $\pm$ 1,9 dias (Baruselli *et al.*, 1997).

Para a fase lútea encontrou-se o seguinte período de duração: *Bos indicus* com duas ondas de 11,8 $\pm$ 0,4 dias e para três ondas de 14,2 $\pm$ 0,2 dias (Rhodes *et al.*, 1995). Já para bubalinos encontrou-se 10,4 $\pm$ 2,1 e 12,7 $\pm$ 2,9 dias (Baruselli *et al.*, 1997).

Segundo Gimenes *et al.* (2011), o desvio folicular ocorre 2,6 dias após a ovulação quando o folículo dominante tem um diâmetro médio de 7,2 mm e o subordinado de 6,4 mm. Em revisão realizada por Presicce (2007), este observou que algumas búfalas podem apresentar dois picos consecutivos de LH, provocando uma dupla ovulação. Nestes casos, se ocorrer a concepção, o ovócito fertilizado é o que provem da segunda ovulação.

Campanile e Neglia (2007), verificaram que os folículos bubalinos adquirem a capacidade ovulatória quando atingem 5 a 8 mm, mas necessitam-se desenvolver mais para produzir E<sub>2</sub> suficiente para induzir o pico pré-ovulatório de LH através do *feedback* positivo sobre o hipotálamo. Posteriormente Gimenes *et al.* (2011) observaram ovulação de folículos que apresentavam diâmetro  $\geq 8,5$  mm no momento da aplicação do LH.

Diferenças relacionadas ao tamanho do folículo pré-ovulatório e prenhez, foram observadas em búfalas prenhas e não prenhas, sendo que as prenhas tinham folículos pré-ovulatórios maiores (Pandey *et al.*, 2011 e Neglia *et al.*, 2012). Observaram ainda, que o fluxo sanguíneo dos folículos de animais não prenhas, apresentaram maiores índices de resistência e de pulsatilidade verificadas por dopplerfluxometria colorida (Neglia *et al.*, 2012).

O diâmetro do folículo dominante ovulatório de búfalas cíclicas durante a estação reprodutiva varia de 13 a 18 mm, dependendo do número de ondas foliculares (Taneja *et al.*, 1996; Baruselli *et al.*, 1997 e Awasthi *et al.*, 2006). Baruselli *et al.* (1997) reportaram que o folículo ovulatório de um ciclo estral de uma ou de duas ondas foliculares é maior do que o de três ondas foliculares. Neste aspecto, Awasthi *et al.* (2006) relataram que o folículo ovulatório de um ciclo com uma onda é menor do que o de duas ondas foliculares.

Em pesquisa recente, Monteiro (2016), trabalhando com búfalas não encontrou diferença entre o diâmetro do folículo dominante (D0), quando utilizou protocolos de sincronização contendo P<sub>4</sub>, E<sub>2</sub> e eCG para as estações reprodutivas favoráveis (13,1 $\pm$ 0,2 mm) e desfavoráveis (13,2 $\pm$ 0,2 mm). Utilizando estes mesmos fármacos, Porto-Filho *et al.* (2004) e Carvalho *et al.* (2013) obtiveram diâmetros de folículos ovulatórios similares (entre 13,1 e 14,2 mm) para as estações reprodutivas desfavoráveis. Resultados equivalentes (entre 13,1 e 14,3 mm) foram obtidos por (Baruselli *et al.*, 1997; Pandey *et al.*, 2011; Yindee *et al.*, 2011 e Porto-Filho *et al.*, 2014), em estudo após a detecção de cio durante a estação reprodutiva favorável.

### 3.2. Espermatozoides

Os espermatozoides são formados nos túbulos seminíferos (Hafez e Hafez, 2004) e são maturados no epidídimo (Dacheux *et al.*, 2005). Na monta natural ou na IA, os espermatozoides alcançam o istmo do oviduto ipsilateral ao ovário onde ocorre a ovulação (Blandau, 1973 e Rodriguez-Martinez *et al.*, 2005). Neste local os espermatozoides já capacitados podem se ligar à zona pelúcida do oócito (Dunbar *et al.*, 1994; Flesch e Gadella, 2000 e Rath *et al.*, 2005), o qual se funde com o conteúdo genético do oócito (Evans e Florman, 2002). Posteriormente a fertilização, o DNA condensado do espermatozoide se desdobra e o pró-núcleo masculino é formado e se funde com o pró-núcleo feminino e desta forma o genoma diplóide do novo indivíduo é formado (Silva e Gadella, 2005).

Mies Filho (1987) e Zorzetto (2013) relataram que para o uso das técnicas de reprodução assistidas, como a IA e a PIVE, os espermatozoides não são introduzidos diretamente no trato genital da fêmea durante a ejaculação, mas são primeiramente coletados, em recipientes, tanto pelo uso da vagina artificial quanto pela eletro-ejaculação. Esse sêmen, após coletado é lavado, diluído, refrigerado, congelado e até mesmo armazenado por longos períodos de tempo até vir a ser depositado no trato genital da fêmea, como no caso da IA. Desta forma, durante todas estas etapas mencionadas no processamento do sêmen pode haver danos ao DNA, membranas e organelas. Por isso é de suma importância avaliar os espermatozoides antes da implementação de biotecnias da reprodução.



Hafez e Hafez (2004) relataram que o sêmen é a suspensão celular líquida contendo espermatozoides (gametas masculinos) e secreções dos órgãos acessórios e trato genital masculino. Ainda segundo o autor, a porção fluída desta suspensão, que é formada na ejaculação, é conhecida como plasma seminal.

### 3.3. Membrana plasmática do espermatozoide

A membrana plasmática do espermatozoide circunda toda a célula, mantendo suas organelas e componentes intracelulares juntos e, por meio de suas características semipermeáveis mantém um gradiente químico de íons e outros componentes solúveis (Lima, 2008).

Singer e Nicholson (1972) observaram que a estrutura básica da membrana espermática é igual ao modelo biológico organizado em um mosaico fluído, formado por duas camadas de fosfolipídios, não sendo uma estrutura contínua, e interrompida por numerosas proteínas integrantes, as quais estariam intercaladas em vários graus dentro dessa estrutura. Ainda segundo os autores na maior parte da membrana, a organização de lipídios, glicolipídios, proteínas e glicoproteínas se apresentam de maneira assimétrica com relação à distribuição de moléculas específicas nas faces externa e interna (Figura 2).

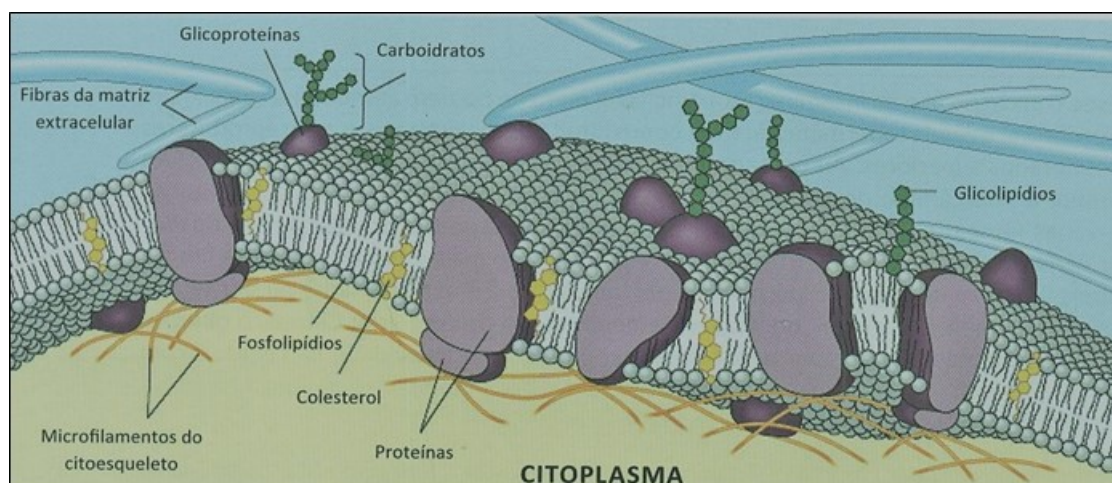


Figura 2 - Membrana plasmática do espermatozoide.

Fonte: Henry e Echeverri (2013, autorizado).

Segundo Amann e Graham (1993) os lipídios são responsáveis pela integridade estrutural, as proteínas seriam as responsáveis pela ocorrência da maioria dos processos dinâmicos e os carboidratos desempenhariam importante papel nas interações entre as células.

Gadella *et al.* (2001) verificaram que na superfície extracelular da membrana plasmática existem numerosos carboidratos que são ligados a proteínas da membrana plasmática (glicoproteínas) ou lipídios específicos que são coletivamente conhecidos como glicocálices. Esses autores propõem que os glicocálices possuem papel fundamental na interação espermatozoide-oócito, que é a parte dos espermatozoides que primeiro entram em contato com o oócito.

Mann e Lutwak-Mann (1981) relataram que embora a composição lipídica da membrana plasmática varie consideravelmente entre as diferentes espécies mamíferas, em geral, contém aproximadamente 70% de fosfolipídios, 25% de lipídios neutros e 5% de glicolipídios. Os componentes fosfolipídicos da sua membrana plasmática estão distribuídos assimetricamente entre dois folhetos da bicamada lipídica (Harrison e Gadella, 1995 e Nolam *et al.*, 1995), onde a fosfatidilserina e a fosfatidiletanolamina localizam-se na camada interna, ao passo que a esfingomielina e a fosfatidilcolina estão localizadas no folheto externo da membrana (Hammerstedt *et al.*, 1990 e Gadella *et al.*, 1999). Variações na composição de lipídios neutros são encontradas entre diferentes espécies, indivíduos da mesma espécie e ejaculados do mesmo indivíduo (Lima,

2008). O conteúdo de colesterol da membrana plasmática é o fator mais variável (Flesch e Gadella, 2000), e está diretamente relacionada com a taxa de capacitação, possivelmente porque ele deve ser retirado da mesma durante esse processo (Yanaginachi, 1994 e Frits *et al.*, 2000).

Os processos de refrigeração, congelamento e descongelamento causam danos à membrana plasmática e ao acrossoma (Hammerstedt *et al.*, 1990; Watson, 1995 e Kardivel *et al.*, 2009), com redução do metabolismo espermático para produção de energia e da motilidade progressiva, prejudicando o tempo de sobrevivência e a capacidade fecundante dos espermatozoides no sistema reprodutor feminino (Watson, 2000). Segundo Nair *et al.* (2006), assim como em outras espécies, na espécie bubalina os espermatozoides submetidos ao resfriamento (4 a 8°C) apresentaram decréscimo de motilidade progressiva (66,1% versus 13,8%) e de integridade da membrana plasmática (69,6% versus 16,5%) devido à ação das ROS e seus derivados oxidativos. O processo de congelamento seminal, por sua vez pode elevar em até cinco vezes a produção de ROS, como observado em equinos (Ball *et al.*, 2001). Maior produção de ROS durante a criopreservação de espermatozoides também foi observada em bovinos (Chatterjee e Gagnon, 2001).

### 3.4. Capacitação espermática

Durante o trânsito ao longo do epidídimo, a membrana plasmática do espermatozoide passa por significativas mudanças bioquímicas. Tulsiani *et al.* (1997) observou que além da maturação epididimária, os espermatozoides dos mamíferos devem passar por uma série de modificações bioquímicas e funcionais, que ocorrem no trato genital da fêmea, modificações estas conhecidas como capacitação espermática.

Abou-Haila e Tulsiani (2000) relataram que entre os fenômenos relacionados à fecundação do gameta feminino, a capacitação espermática seguida da reação acrossomal estão entre os principais. A fertilização é o resultado desses eventos moleculares em que os espermatozoides capacitados se ligam ao oócito e realizam uma série de outros eventos programados antes da penetração na zona pelúcida e fusão com o óvulo.

Hafez e Hafez (2000) verificaram que o processo de capacitação ocorre fisiologicamente no útero, e precede a reação do acrossoma. A capacitação é necessária para que os espermatozoides se tornem capazes de identificar o oócito pela interação de proteínas expostas no oócito, transpassarem a zona pelúcida e iniciarem a reação acrossomal (Saling e Storey, 1979).

Medeiros *et al.* (2002) relataram que os mecanismos da capacitação espermática estão associados com modificações na membrana plasmática e na concentração intracelular de íons. Segundo os autores estas modificações envolvem a remoção ou a inativação de fatores decapacitantes da superfície do espermatozoide; mudanças na localização, estrutura molecular e na mobilidade de proteínas; adsorção espermática de proteínas do trato da fêmea; alteração na composição lipídica da membrana e em particular na proporção entre colesterol e fosfolípidios; aumento do cálcio, sódio e do pH intracelular, produção de espécies reativas ao oxigênio; aumento do AMPc e da fosforilação da proteína tirosina.

Purdy e Graham (2004) observaram que uma das primeiras etapas da capacitação espermática é a perda de colesterol da membrana plasmática. Segundo estes autores, este efluxo de colesterol induz a reorganização lipídica da membrana plasmática, aumentando assim sua permeabilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{HCO}_3^-$  e  $\text{K}^+$ . Quando determinada quantidade de colesterol for removida, a membrana torna-se instável com habilidade de fusão com a membrana acrossomal externa, resultando na reação do acrossoma.

Segundo Yanaginachi (1994) e Frits *et al.* (2000) a taxa de capacitação espermática está relacionada com a taxa de efluxo do colesterol na membrana plasmática. Assim, espermatozoides dos humanos e de bovinos com alto conteúdo de colesterol requerem um maior período para se

capacitarem (respectivamente, 8 e 6 horas); por outro lado, os espermatozoides dos suínos e dos ovinos com baixo conteúdo de colesterol, requerem unicamente 1 ou 2 horas para a capacitação.

### 3.5. Reação acrossômica

A reação do acrossoma é um processo excitotico do espermatozoide, absolutamente necessária para que ocorra a fecundação. Somente espermatozoides com acrossomas reagidos estão aptos a atravessar a zona pelúcida, ligar-se a membrana plasmática do oócito e se fundir com o gameta feminino (Lima, 2008). Acredita-se que a reação acrossomal que ocorre com a espécie bubalina seja similar a já descrita para outras espécies. Neste contexto, segundo Yanagimachi (1994) a reação do acrossoma leva a liberação de uma variedade de enzimas hidrolíticas e proteolíticas, principalmente a acrosina e a hialuronidase, as quais são essenciais para a penetração do espermatozoide na zona pelúcida do oócito. Essa reação acrossomal resulta na modificação de algumas proteínas da membrana plasmática no segmento acrossomal equatorial e pós-equatorial num nível necessário para a fusão com a membrana do oócito (Patrat *et al.*, 2000). Segundo Osman *et al.* (1986), embora a zona pelúcida seja o principal indutor fisiológico da reação acrossomal, algumas evidências indicam que a P<sub>4</sub>, secretada pelas células do *cumulus* e presente no líquido folicular, seja um importante co-fator nesse processo excitotico.

Wassarman (1999) reportou que *in vivo*, a reação do acrossoma é induzida por uma glicoproteína da zona pelúcida, a ZP3, a qual pode atuar como um ligante para um ou mais receptores da membrana plasmática do espermatozoide.

Florman *et al.* (1989) e Blackmore *et al.* (1990) verificaram que o Ca extracelular é um requerimento absoluto para a reação do acrossoma. Seu recrutamento é induzido pela zona pelúcida e progesterona, que estimulam o influxo de cálcio para o interior do espermatozoide, levando a um grande e rápido aumento na concentração intracelular de Ca<sup>2+</sup>.

### 3.6. Características físicas e bioquímicas do sêmen bubalino

Assim como há diferenças entre as espécies de mamíferos domésticos quanto à anatomia, fisiologia e períodos de fertilidade, também há diferenças nas características físicas e bioquímicas do sêmen. Para alguns autores, a menor resistência das células espermáticas bubalinas à preservação pelo frio é devida a fatores intrínsecos e a diferenças bioquímicas, quando comparado ao bovino (Miska *et al.*, 1994, Vale, 2002 e Henry e Echeverri, 2013). Conhecer as diferenças bioquímicas entre o sêmen das espécies de animais domésticos é de suma importância para a escolha e preparação de meios extensores de refrigeração e criopreservação do sêmen. Na Tabela 2 são apresentadas diferenças bioquímicas entre o sêmen dos mamíferos domésticos.

Segundo Raizada *et al.* (1990) e Andrabi *et al.* (2008) existem fatores bioquímicos específicos que afetam a capacidade dos espermatozoides em evitar os danos provocados pelos procedimentos criogênicos. Uma dessas possíveis causas de menor congelabilidade do sêmen de búfalos em comparação com o bovino pode ser devido às diferenças na quantidade e tipos de lipídeos nos espermatozoides (Tatham, 2000). Por exemplo, a fosfatidilcolina, representa aproximadamente 66% de todos os fosfolipídios encontrados na membrana plasmática dos espermatozoides de búfalos (Cheshmedjjeva e Dimov, 1994), enquanto representa aproximadamente 50% na membrana do espermatozoide bovino (Parks *et al.*, 1987). Do mesmo modo, fosfatidiletanolamina que representa aproximadamente 23% de todos os fosfolipídios presentes na membrana plasmática dos espermatozoides bubalinos (Cheshmedjjeva e Dimov, 1994), quando no espermatozoide bovino corresponde a apenas 10% dos fosfolipídios (Parks *et al.*, 1987).

Tabela 2 - Características físicas e bioquímicas do sêmen de animais domésticos.

Componente	Touro	Carneiro	Cachaço	Garanhão	Búfalo
Volume do ejaculado (mL)	5-8	0,8-1,2	150-200	60-100	2-8****
Conc. espermática (milhões/mL)	800-2000	2000-3000	200-300	150-300	300-1200****
SPTZ/ejaculado bilhões	5-15	1,6-3,6	30-60	5-15	3****
SPTZ móveis (%)	40-75	60-80	50-80	40-75	> 70**
SPTZ normais (%)	65-95	80-95	70-90	60-90	≥ 70****
Proteínas (g/100 mL)	6,8	5,0	3,7	1,0	3,10±0,10*
pH	6,4-7,8	5,9-7,3	7,3-7,8	7,2-7,8	6,7-7,5**
Osmolaridade	-	-	-	290-233	293,33±3,39*
Frutose	460-600	250	9	2	623**
Sorbitol	10-140	26-170	6-18	20-60	-***
Ácido cítrico	620-806	110-260	173	8-53	441**
Inositol	25-46	7-14	380-630	20-47	-***
Glicerilfosforilcolina (GPC)	100-150	1100-2100	110-240	40-100	-***
Ergotioneína	0	0	17	40-110	-***
Sódio	225±13	178±11	587	257	260,63±8,81*
Potássio	155±6	89±4	197	103	153,50±2,68*
Cálcio	40±2	6±2	6	26	44,4**
Magnésio	8±0,3	6±0,8	5-14	9	4,3**
Cloreto	174-320	86	260-430	448	196,57±2,45*

Fonte: \* Ibrahim *et al.* (1985); \*\* Vale (1997); \*\*\*Hafez e Hafez (2004) e \*\*\*\*CBRA (2013).

### 3.7. Princípios da refrigeração do sêmen

Os espermatozoides podem ser mantidos viáveis durante dias, em meio líquido e refrigerado. No entanto, é necessário que o processo de resfriamento ocorra de forma adequada, possibilitando que os espermatozoides preservem: motilidade progressiva, metabolismo ativo, membranas intactas e funcionais, conteúdo enzimático do acrossoma protegido e material genético íntegro (Henry e Echeverri, 2013).

No processo de refrigeração, com temperaturas acima de 0°C, os espermatozoides passam por grandes mudanças, o que ocorrem em um intervalo de 15 a 5°C (Watson, 2000), com pequena variação entre as espécies (Henry e Echeverri, 2013). Segundo Amann e Pickett (1987), Graham (1996) e Medeiros (2002), isto ocorre devido a fase de transição da membrana plasmática do estado líquido cristalino para o estado de gel.

Henry e Echeverri (2013), relataram que nem todos os fosfolípidios geleificam ao mesmo tempo e a uma mesma temperatura. Segundo os autores a temperatura de geleificação de cada classe de fosfolípidios depende da relação entre o número de ligações simples e de ligações duplas (ou grau de saturação) entre os carbonos destas moléculas. Portanto, em uma dada temperatura, durante o resfriamento podem existir algumas classes de fosfolípidios na forma de gel, enquanto outras ainda estão na forma fluida. Este período é crítico, pois fosfolípidios ainda na forma líquida mantêm a capacidade de se movimentar enquanto os que estão na forma de gel perdem esta capacidade.

Se a taxa de resfriamento for rápida demais, fosfolípidios da mesma classe tendem a se agrupar, desarranjando a estrutura da membrana. Sendo o efeito desse desarranjo se expressando durante o reaquecimento, quando todos os fosfolípidios retornam à forma fluida. Consequentemente, algumas dessas moléculas perdem a forma de bicamada e formam uma estrutura circular, em monocamada, chamada de hexagonal II ou micela invertida (Figura 3). Estas estruturas hexagonais funcionam como verdadeiros poros, aumentando a permeabilidade da membrana, o que leva à perda de conteúdo celular, ATP, ácidos nucleicos, fosfolípidios, várias enzimas metabólicas, K, cátions e água (Henry e Echeverri, 2013). Para os espermatozoides bubalinos, acredita-se que o processo de refrigeração ocorra de forma similar a descrita para outras espécies.

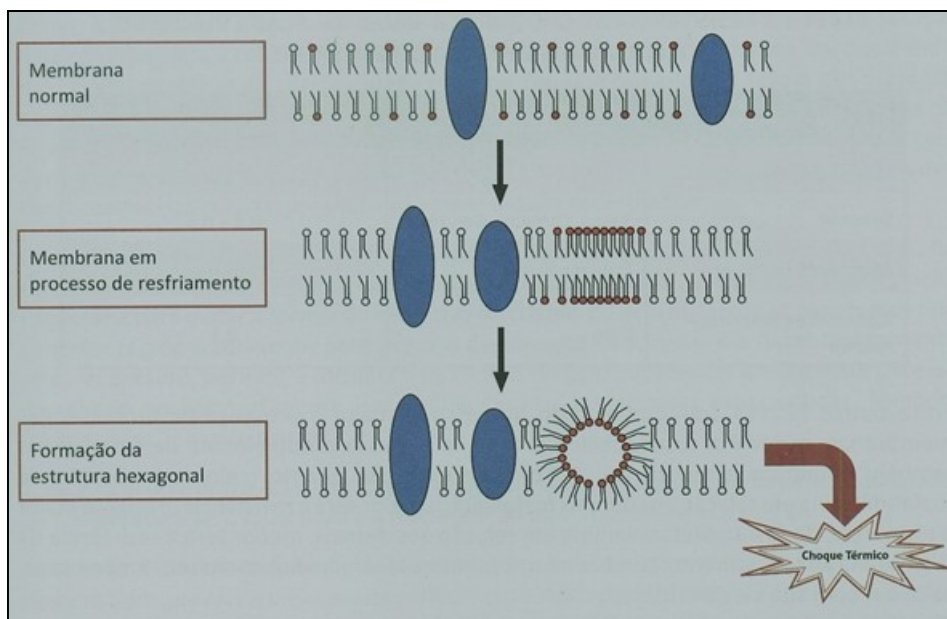


Figura 3 - Choque térmico e formação da estrutura hexagonal na membrana plasmática.  
 Fonte: Henry e Echeverri (2013, autorizado).

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

Após a diluição do sêmen para o início do processo de refrigeração, os espermatozoides passam pela zona crítica de temperatura que determina o choque frio  $15$  a  $5^{\circ}\text{C}$  (Watson, 2000), da mesma forma que ocorre durante a criopreservação. Durante esse processo, a viabilidade espermática sofre influência de diversos fatores destacando-se, segundo Hammerstedt *et al.*, (1990), a ação de substâncias tampões que podem quelar íons metálicos alterando as interações entre íons e os lipídios de membrana; alteração de proteínas de ligação, segregação de lipídios e formação de lipoproteínas alteradas; mudanças no balanço bioenergético que influenciam a disponibilidade de açúcares livres e a manutenção de processos fisiológicos essenciais, como batimentos flagelares e funcionamento dos mecanismos de troca de membrana.

Durante a refrigeração do sêmen, em temperaturas entre  $15$  e  $5^{\circ}\text{C}$ , é que ocorrem as principais injúrias celulares relacionadas ao choque frio (Watson, 2000 e Stornelli *et al.*, 2005), levando a queda significativa na motilidade espermática e atividade metabólica (Blackshaw e Salisbury, 1957). Henry e Echeverri (2013) reportaram que o choque térmico pode ser evitado ou minimizado diluindo-se o sêmen em meio extensor apropriado e resfriando o sêmen lentamente (taxa  $\leq 0,25^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) até atingir a temperatura de manutenção que pode ser de  $15$  a  $18^{\circ}\text{C}$  para suínos ou de aproximadamente  $5^{\circ}\text{C}$  para maioria das espécies de animais domésticos.

A curva de resfriamento é considerada o principal fator no processo de refrigeração do sêmen (Watson, 2000). O sêmen bubalino primeiramente deve ser resfriado da temperatura corpórea de  $38^{\circ}\text{C}$  a  $20^{\circ}\text{C}$ , antes da diluição final, o que geralmente não ocasiona danos aos espermatozoides, quando diluído em meio adequado (Keith, 1998). A sensibilidade do espermatozoide para a refrigeração é atribuída a variações na composição da membrana plasmática das diferentes espécies (Drobnis *et al.*, 1993). Ainda segundo os autores, a susceptibilidade da membrana em se submeter às transições durante a refrigeração é inversamente relacionada com a proporção de colesterol presente.

Graham (1995) relatou que quando a refrigeração dos espermatozoides é realizada de forma lenta ocorre maior saída de água podendo levar a uma desidratação celular muito intensa, porém a refrigeração quando realizada de forma muito rápida é insuficiente para promover a saída de água,

promovendo a formação de cristais de gelo no interior da célula. Segundo o autor, uma boa taxa de refrigeração deve permitir que a célula espermática perca água, mas não de forma excessiva permitindo que pequenos cristais possam ser formados, mas que estes não sejam prejudiciais a ponto de causar a morte da célula.

Mazur (1984) verificou que o sêmen diluído parte de temperaturas próximas a +37°C para temperaturas entre +5 e 0°C, período este de adaptação do espermatozoide para a redução do seu metabolismo. A fase de equilíbrio tem sido considerada como o tempo total em que o espermatozoide permanece em contato com o glicerol e outros componentes do diluente antes da congelação, estabelecendo um balanço entre o meio intra e extracelular (Sálanon e Maxwell, 1995). Segundo Evans e Maxwell (1987) quando a diluição do sêmen é realizada em uma única etapa, a glicerolização começa aos 30°C sendo recomendado um período de 90 a 120 minutos de refrigeração a 5°C antes da congelação.

Para dar início ao processo de refrigeração, o sêmen precisa de um diluente (Kannkofer *et al.*, 2005), sendo que a gema de ovo representa uma das principais fontes de proteínas e lipídeos dos meios de manutenção do sêmen no estado líquido (Medeiros *et al.*, 2002). Segundo Vishwanath e Shannon (2000), todo diluente independente de sua complexidade, tem como princípio básico a preservação da viabilidade espermática, garantindo a longevidade necessária para a utilização das amostras seminais em programas de reprodução animal. Após a diluição, o sêmen deve ser resfriado lentamente a uma taxa de 0,05°C/minuto até a temperatura de aproximadamente 4 a 5°C, constituindo-se um período de adaptação dos espermatozoides ao metabolismo reduzido, com o objetivo de diminuir o potencial choque térmico (Watson, 2000; Medeiros *et al.*, 2002; Andrabi, 2009 e Henry e Echeverri, 2013).

Graham (1995 e 1996) reportou que quando o resfriamento é feito de maneira inadequada, ocorrem alterações físicas e químicas nas membranas celulares, causando danos irreversíveis ao espermatozoide, caracterizando-se por alterações nos padrões normais de motilidade (movimento circular ou retrógrado e perda rápida de motilidade), danos ao metabolismo da membrana plasmática e do acrossoma. Alterações na fluidez e da permeabilidade da membrana plasmática também geram danos ao acrossoma, e levam à redução da atividade metabólica e ao consumo de ATP, refletindo de maneira geral na fertilidade do espermatozoide (Weitze e Petzold, 1992).

Segundo Wiggin e Almquist (1974) o tempo de equilíbrio é o tempo no qual o espermatozoide permanece na temperatura entre 4 a 5°C estando em contato com o crioprotetor antes da congelação. Durante esse período, o crioprotetor penetra nos espermatozoides estabelecendo concentrações equilibradas intra e extracelular (Sálanon e Maxwell, 2000). Esse tempo é necessário para que os espermatozoides interajam com os constituintes do meio (gema de ovo e crioprotetores) e esses adquiram a máxima resistência aos danos causados ao espermatozoide pelo processo de criopreservação (Bouchard *et al.*, 1990 e England, 1993).

O tempo de equilíbrio utilizado para o sêmen bubalino diluído, em Tris ácido cítrico para 2, 4 e 6 horas, apresentou uma sobrevivência pós-descongelação superior para o tempo de 4 horas (Tuli *et al.*, 1981), tempo este também sugerido por Dhami *et al.* (1994), Singh *et al.* (2012), Almeida *et al.* (2016b) e Becerra (2017).

Devido aos efeitos biológicos adversos determinados pelo processo de refrigeração, pode-se afirmar, segundo Batellier *et al.*, (2001), que o sucesso do uso do sêmen refrigerado em programas de IA, depende essencialmente da temperatura de manutenção do sêmen, da velocidade da curva de refrigeração, composição dos meios diluidores, concentração espermática na dose inseminante e número de inseminações realizadas. Destaca-se, ainda, que a eficiência do sêmen refrigerado também é influenciada por um adequado sistema de transporte ou sistema de manutenção (Mello *et al.*, 2007 e Miró *et al.*, 2009). Uma das principais vantagens dessa forma de armazenamento é que a fertilidade espermática pode ser preservada pelo período de 3 a 5 dias pós-diluição, mesmo sob temperatura ambiente de 10 a 21°C (Yoshida, 2000). Já para bubalinos Dhami *et al.* (1994), Singh *et*



al. (2012), Almeida *et al.* (2016b) e Becerra (2017), reportaram que o sêmen pode ser armazenado à 5°C por até 72 horas sem diminuição significativa em sua motilidade.

### 3.8. Princípios da congelação do sêmen

Celeghini (2005) relatou que durante a criopreservação do sêmen busca-se a suspensão do metabolismo espermático e a manutenção de suas características por um maior período de tempo. No entanto, a autora afirma que o sucesso da criopreservação do sêmen depende da manutenção do potencial fecundante dos espermatozoides, que devem apresentar integridade e funcionalidade de diferentes estruturas celulares.

Graham (1996) reportou que quando a temperatura atinge entre -5 e -10°C, a água pura no meio extracelular se transforma em cristais de gelo, e como o meio intracelular está protegido pela membrana plasmática não se congela, ficando apenas super-resfriada, mesmo sendo o ponto de congelação do citoplasma celular abaixo de -1°C. Daí a importância da integridade da membrana plasmática para impedir a entrada desse gelo na célula. Já a concentração de soluto na fração descongelada aumenta, enquanto a membrana plasmática impede a formação de cristais de gelo intracelular. Squires *et al.* (1999) demonstraram que nestas temperaturas, a curva deve ser lenta para evitar a congelação da água intracelular e rápida o suficiente para evitar o contato da célula desidratada com o meio hiperosmótico.

Henry e Echeverri (2013) reportaram que quando há uma demora muito grande para o início da cristalização extracelular e intracelular pode haver um processo de desnaturação de proteínas resultando em um efeito indesejável (hiper-resfriamento). Ainda segundo os autores, com o início da cristalização extracelular, a água que vai cristalizando desloca os solutos nela contidos para a coluna líquida que ainda está por cristalizar. Com isso, ocorre o aumento gradativo da osmolaridade extracelular, que por sua vez, leva à desidratação dos espermatozoides que vão se alojando na coluna líquida remanescente. Assim é desejável a retirada da água do compartimento intracelular para evitar a formação dos cristais de gelo dentro da célula, por outro lado, a desidratação excessiva leva a mudanças estruturais dos constituintes das células, prejudicando a viabilidade espermática (Figura 4).

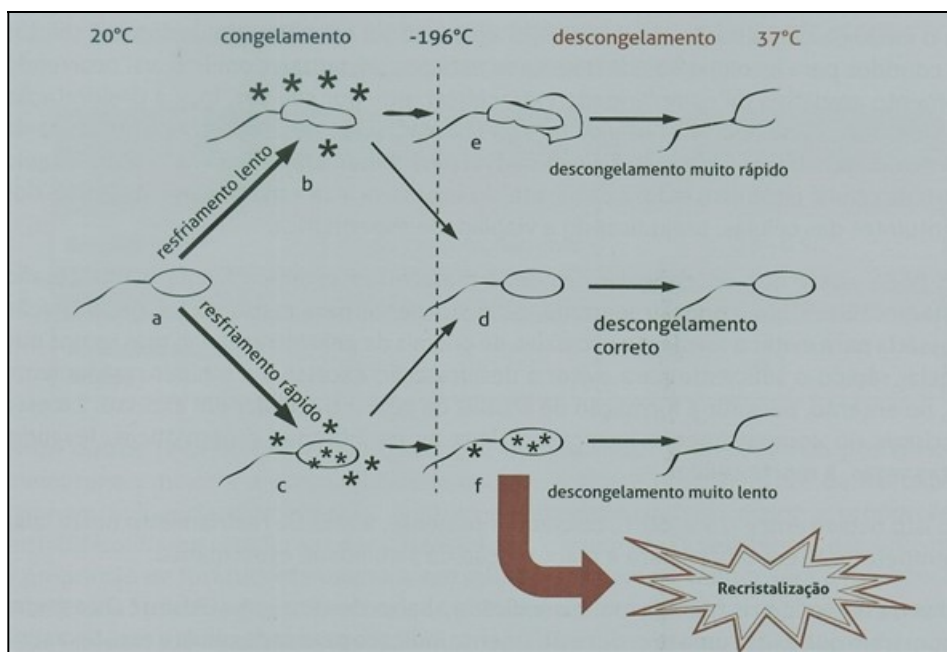


Figura 4 - Efeito solução e formação de cristais de gelo no espermatozoide durante o processo de congelamento. Fonte: Henry e Echeverri (2013, autorizado).

Segundo Holt (2000) a água resfriada no interior da célula tem maior pressão de vapor que o gelo, a célula perde água até atingir o equilíbrio. Desta forma, a água do interior da célula flui por osmose para o meio externo e também se congela. Sendo que, os outros elementos do meio extracelular (sais, proteínas e gordura), permanecem na porção não congelada. De acordo com Mazur (1990) e Meyers (2005) o resultado desta desidratação, promove a concentração intracelular de soluto e a diminuição no tamanho da célula.

Outra alteração crítica que pode ocorrer na criopreservação é o “efeito solução”, caracterizado pela desidratação excessiva da célula, elevada concentração de solutos, modificação do pH e conseqüente alteração na função dos espermatozoides (Fahy, 1980). No entanto, quando a célula espermática é submetida a congelação lenta, há tempo suficiente para que grande quantidade de água intracelular migre para o ambiente extracelular, estabelecendo o equilíbrio entre solvente e soluto. Desta forma, torna-se estritamente necessária a descongelação na mesma intensidade, ou seja, de forma lenta, para que a célula, ao ser reidratada, não sofra rompimentos das membranas biológicas pela rápida reconstituição do volume intracelular (Watson, 1995).

Graham (1996) verificou que o processo de congelação se dá depois do tempo de equilíbrio, onde o sêmen envasado é congelado em nitrogênio líquido. Pode ser feito quando as células alcançam -60°C, onde os espermatozoides ficam relativamente inertes e o sêmen pode ser imerso em nitrogênio líquido, para seu armazenamento.

Para Tardif *et al.* (1997), as lesões parciais que ocorrem nos espermatozoides durante o equilíbrio tornam-se mais evidentes na congelação e descongelação. As diversas alterações bioquímicas e estruturais ocorridas com a população espermática no pós-descongelação, podem ocasionar um decréscimo de 50 a 60% na viabilidade dos espermatozoides (Watson, 1995; Den Daas *et al.*, 1998; Watson, 2000 e Rasul *et al.*, 2001).

Bailey *et al.* (2000) verificaram que a reorganização estrutural da membrana plasmática do espermatozoide após a criopreservação parece dificultar a capacidade do espermatozoide de interagir normalmente com as células do trato genital feminino, tornando o espermatozoide menos susceptível para chegar ao local da fecundação *in vivo* ou penetrar nas membranas do oócito.

### 3.9. Extensores

Um extensor deve interagir com o sêmen, proporcionando proteção aos diferentes compartimentos celulares durante o resfriamento, congelação e descongelação. Por isso, sua constituição deve garantir nutrição, proteção, balanço eletrolítico (pH e osmolaridade) e inibição bacteriana. Os constituintes básicos dos extensores são substâncias energéticas, crioprotetores, soluções tampões e antibióticos (Squires *et al.*, 1999 e Holt, 2000). De acordo com Vishwanath e Shannon (2000), para um meio diluente ser completo e eficiente, algumas substâncias são fundamentais na sua composição: substâncias iônicas e aniônicas que mantenham a osmolaridade; lipoproteínas ou material de alto peso molecular, como a gema de ovo ou leite, que previnam o choque frio; agentes crioprotetores intracelulares como, glicerol, propanodiol ou dimetilsulfoxido (DMSO); fonte de energia como glicose ou frutose e outros aditivos como enzimas e antibióticos.

Poucos trabalhos têm sido realizados para o desenvolvimento de novos diluidores para a manutenção do sêmen bovino a temperatura ambiente ou refrigerado. Quando extrapolamos os estudos para a espécie bubalina, o problema é ainda maior, uma vez que para esta espécie geralmente utilizam-se os mesmos diluidores recomendados para os bovinos. A maioria das publicações disponíveis são obras anteriores ao descobrimento das propriedades crioprotetoras do glicerol, período em que a utilização do sêmen fresco ou refrigerado correspondia à principal biotecnologia aplicada em reprodução de bovinos (Crespilho, 2010).



### 3.9.1. Gema de ovo

Phillips e Lardy (1940) descreveram os efeitos benéficos da gema de ovo na proteção dos espermatozoides contra o frio. As lipoproteínas presentes nela promovem proteção contra o choque térmico provocado pelo resfriamento.

Manjunath *et al.* (2002) demonstraram que as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) da gema de ovo, se ligam as BSPs (Bull Seminal Plasma), que são prejudiciais aos espermatozoides. A ligação das BSPs com as LDLs é rápida, específica e saturável, sendo os complexos formados (LDL-BSP) estáveis. As LDLs têm capacidade de se ligarem a um grande número de BSPs, sendo que cada LDL pode se ligar a 240-555 BSPs, formando complexos estáveis mesmo após o descongelamento. O efluxo de colesterol provocado pelas BSPs resulta na desestabilização da membrana plasmática, diminuindo a resistência espermática ao choque pelo frio e a criopreservação. Quando o sêmen é diluído em extensores contendo gema de ovo, dentro de minutos após a coleta, as lipoproteínas (LDLs) sequestram grande parte das proteínas BSPs, presentes no plasma seminal, prevenindo ou minimizando a ocorrência de modificações da membrana plasmática dos espermatozoides (Figura 5). Assim, as lipoproteínas da gema de ovo (LDLs) podem oferecer proteção aos espermatozoides, pela redução do efeito deletério das proteínas BSPs sobre a membrana plasmática, resultando em melhor qualidade do sêmen refrigerado ou criopreservado.

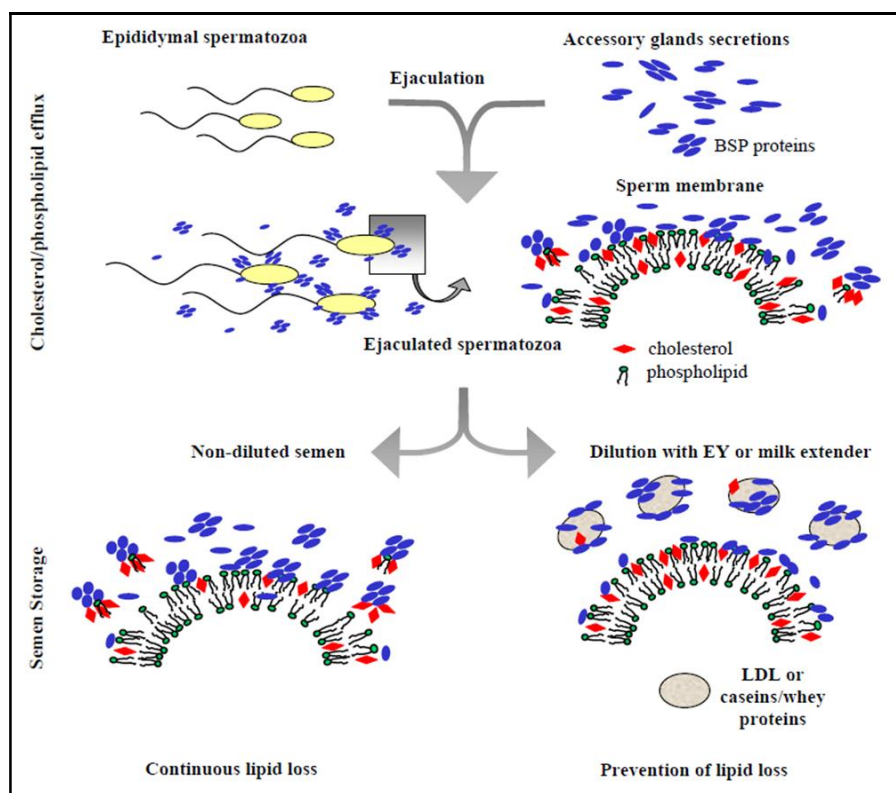


Figura 5 - Mecanismo de proteção do espermatozoide por gema de ovo e leite.

Fonte: Manjunath *et al.* (2002) modificada em Manjunath (2012). Autorizado para uso pelo autor (anexo 9).

Segundo Lusignan *et al.* (2011b), durante a ejaculação, as BSPs se misturam e entram em contato com os espermatozoides, ligando-se à membrana espermática e mobilizando lipídios da mesma, sendo este um fenômeno essencial para a fertilização. Apesar das proteínas BSPs serem importantes por sua participação na capacitação espermática, que ocorre no sistema genital feminino, o contato prolongado entre as BSPs e os espermatozoides resulta na remoção dos lipídios da membrana espermática, tornando-a mais sensível ao choque pelo frio, durante a congelamento. Os autores relatam ainda que para conferir proteção à célula espermática, as lipoproteínas de baixa

densidade da gema de ovo são adicionadas ao meio diluidor, quando interagem com as proteínas BSPs. O efeito benéfico dessa interação ocorre, provavelmente, devido a rápida interação entre as LDLs e as proteínas BSPs, impedindo os efeitos prejudiciais do contato prolongado entre essas e a membrana dos espermatozoides. Conclui-se que o sequestro das proteínas BSPs pelas LDLs da gema de ovo poderia ser o principal mecanismo de proteção espermática da gema de ovo.

As LDLs são moléculas esféricas, com um núcleo lipídico de triglicerídeos e ésteres de colesterol, rodeados por uma camada de fosfolipídios e proteínas. Os fosfolipídios têm o papel essencial de estabilizar a estrutura das LDLs, por causa de suas forças de associação essencialmente hidrofóbicas. As LDLs são 83-89% lipídicas e 11-17% proteicas. A porção lipídica das LDLs são compostas, aproximadamente, de 69% de triglicerídeos, 26% de fosfolipídios e 5% de colesterol (Trimeche *et al.*, 1997; Moussa *et al.*, 2002 e Lusignan *et al.*, 2011a).

Lusignan *et al.* (2011a) verificaram que a fosfatidilcolina é o maior fosfolipídio que compõe as LDLs, sendo que 104 moléculas de BSPs se ligam a 170 moléculas de fosfatidilcolina, inferindo-se que 1,6 de fosfatidilcolina é gasta em uma ligação com a BSP e que uma partícula de LDL se liga à 104 partículas de BSP. Pela entalpia mensurada no estudo, comprovou-se forte interação na ligação LDL-BSP, sendo proposto que as moléculas de fosfatidilcolina das LDLs agem como âncoras de ligação com as proteínas BSPs.

Bergeron e Manjunath (2006) relataram que as proteínas BSPs são encontradas em todos os mamíferos e são homólogas, de forma geral, na sua ligação com as LDLs, o mecanismo da proteção espermático conferido pela gema de ovo pode ser considerado similar, entre os mamíferos. No entanto, há diferenças na quantidade dessas BSPs homólogas no ejaculado das diferentes espécies, o que implica em diferenças quanto à criopreservação do sêmen. Enquanto as BSPs são cerca de 65% das proteínas do plasma seminal de touros, elas representam apenas 20% das proteínas encontradas em garanhões. Como a diluição do sêmen é baseada na concentração espermática, que varia entre indivíduos e ejaculados, então a taxa de diluição utilizada também sofrerá variação. Assim, a quantidade de gema incorporada no sêmen será mais reduzida, em ejaculados com reduzida concentração celular, o que reduzirá o sequestro das BSPs do sêmen. Isso explicaria a variação individual na tolerância espermática ao choque térmico e criopreservação.

Os diluidores usados para criopreservação de espermatozoides bovinos geralmente contém em torno de 20% de gema de ovo (Amirat *et al.*, 2004), e 2 a 20% nos meios diluidores de equinos (Clulow *et al.*, 2007). Com o intuito de verificar se diferentes percentuais de gema de ovo influenciariam na qualidade final do sêmen bovino, Aguiar *et al.* (2007) testaram a gema de ovo nos percentuais de 5, 10, 15 e 20% em diluidor PBS e observaram que, variando o valor, não se altera a qualidade final do sêmen, por outro lado, a concentração mais baixa estudada apresenta a vantagem de permitir uma avaliação das características microscópicas sem interferência de sedimentos.

Diversos trabalhos (Bousseau *et al.*, 1998; Van Wagendonk-De Leeuw *et al.* 2000; Thun *et al.*, 2002; Aires *et al.*, 2003 e Pagl *et al.*, 2006) tem evidenciado que apesar de seus efeitos benéficos a gema de ovo apresenta alguns inconvenientes, como à possibilidade de contaminação com subsequente produção de endotoxinas capazes de prejudicar a capacidade de fecundação dos espermatozoides. Uma das alternativas seria a pasteurização da gema de ovo (Van Wagendonk-De Leeuw *et al.*, 2000), a sua separação e o uso da fração crioprotetora, a LDL (Amirat *et al.*, 2004) ou o uso de diluidores quimicamente definidos compostos por produtos de origem vegetal (Hinsch *et al.*, 1997).

Segundo Wall e Foote (1999), a gema de ovo é de difícil padronização, pois contém substâncias que podem inibir a atividade mitocondrial dos espermatozoides diminuindo sua motilidade (Pace e Graham, 1974) e hormônios esteróides que podem diminuir a capacidade de fecundação dos espermatozoides (Muino *et al.*, 2007). Como também pode interferir na análise microscópica do sêmen pela presença de glóbulos de gordura (Vishwanath e Shannon, 2000).

### 3.9.2. Leite

O leite é um meio biológico de composição complexa composto de proteínas, sais, glicídios, lipídios, vitaminas e minerais (Vieira De Sa, 1990). Seja integral, desnatado ou reconstituído, o leite tem sido utilizado por muitos anos como diluidor do sêmen. O pH em torno de 7,0 e a pressão osmótica em torno de 300 mM são próximos aos valores fisiológicos do sêmen (Maxwel e Sálanon, 1993).

Maxwel e Sálanon (1993) relataram que a eficácia do leite como meio de diluição e conservação do sêmen tem sido atribuída a sua fração proteica, principalmente a caseína que parece ter efeito protetor sobre os espermatozoides, reduzindo a ligação das proteínas BSP com os espermatozoides e a perda de lipídios. O mecanismo pelo qual o leite protege os espermatozoides envolve a interação das BSP com as micelas de caseína, impedindo assim, sua ligação com o colesterol e fosfolipídios da membrana espermática evitando a evasão destes constituintes, o que torna o espermatozoide menos susceptível ao choque térmico, preservando a motilidade espermática e a viabilidade durante a estocagem. O sêmen de carneiro fresco ou refrigerado tem sido diluído principalmente com leite.

Segundo Bergeron *et al.* (2007) e Lusignan *et al.* (2011a), a lactose presente no leite de vaca (4,8%) pode aumentar a eficiência dos diluidores de sêmen. No entanto, não é suficiente para a proteção espermática durante o resfriamento ou congelamento.

Dagleish (1998) relatou que o principal constituinte protetor do leite são as micelas de caseína, sendo essas as suas principais proteínas. As caseínas do leite estão presentes em quantidade equivalente a 27g/L, do leite total, e existem como partículas coloidais heterogêneas, chamadas de micelas de caseína. Basicamente as micelas de caseína são constituídas, na parte central, de  $\alpha$  e  $\beta$  caseínas, envoltas por  $\kappa$  caseínas. O autor relata ainda que a caseína se liga fortemente aos íons  $\text{Ca}^{++}$ , o que impede o acúmulo intracelular de quantidades tóxicas de  $\text{Ca}^+$  resultante do dano causado nas membranas. As lipoproteínas são ligadas à membrana plasmática e promovem estabilização da mesma durante o processo de congelação/descongelação.

As LDLs da gema de ovo e as micelas de caseína do leite são diferentes. Segundo Bergeron *et al.* (2007) nas LDLs da gema de ovo há incorporação lipídica na membrana espermática, enquanto que nas micelas de caseína do leite, há apenas redução das perdas lipídicas. Vale salientar, além disso, que a proteção espermática conferida pelo leite envolve a ligação de proteína-proteína, com o sequestro das BSPs pelas micelas de caseína, diferentemente do que ocorre quando se utiliza a gema de ovo, que promove uma ligação lipídica-proteica, através do sequestro das BSPs pelas LDLs.

O leite em pó-desnatado é bastante utilizado para preparação de meios diluidores. Assim como o leite desnatado UHT também é muito utilizado para ganhões e jumentos (Rocha, 2012) sem qualquer adição de outros constituintes, nesse caso para a inseminação utilizando-se sêmen fresco. No entanto, segundo Meirelles *et al.* (1998), o sêmen refrigerado em leite UHT sofreu grande variabilidade no que se refere à preservação da motilidade, dependendo da partida, sendo os resultados inconstantes. Já o uso do leite tipo A integral, provocou uma queda significativa da motilidade às 24 horas de armazenamento, em relação aos demais diluidores, possivelmente pela maior quantidade de gordura, resultando em aglutinação espermática.

### 3.9.3. Lipoproteínas de baixa densidade (LDL)

Após a comprovação, por diversas pesquisas, da eficácia no emprego das LDLs em substituição da gema de ovo em diluidores usados para preservação de sêmen de diversas espécies, os trabalhos atuais têm focado na identificação de uma concentração ideal de lipoproteínas que teria o melhor efeito protetor final, com base em estudos *in vitro* e *in vivo* (Moussa *et al.*, 2002; Yamauchi *et al.*, 2009; Moustacas *et al.*, 2011; Akther *et al.*, 2011a; El-Sharawy *et al.*, 2012; Beran *et al.* 2015

e Shahba *et al.*, 2016). Porém, ainda são conflitantes em relação a melhor concentração a ser utilizada para os meios diluidores em substituição a gema de ovo. Khlifiaoui (2004) demonstrou o efeito benéfico de LDL para a criopreservação de esperma equino, mas a uma concentração de 0,5%.

Jiang *et al.* (2007) constataram que 9% deram o melhor resultado pós-descongelamento para espermatozoides móveis em sêmen suíno. Em estudo posterior Yamauchi *et al.* (2009) compararam diluidores contendo 20% de gema de ovo, com outros contendo 2, 4, 6, 8 ou 10% de LDL, obtendo nas concentrações de 4 e 6% maior concentração de colesterol na membrana do espermatozoide, além de melhores parâmetros cinéticos pós-descongelamento para o sêmen de porcos nativos (*Sus scrofa scrofa*).

Varela Junior *et al.* (2009) avaliaram o uso da LDL (6, 8 e 10%) como um substituto para a gema de ovo (20%) em extensores Tris-glicose para sêmen refrigerado de cães (24, 48, 72 e 96 horas) e congelados com glicerol a 10%. Diante dos resultados obtidos, os autores recomendaram o uso da LDL para substituição da gema de ovo em extensor de TRIS-glicose para sêmen de cão refrigerado e congelado.

Em sêmen de ovinos, Moustacas *et al.* (2011) compararam diluidores a base de gema de ovo integral ou de 8 a 20% de LDL natural ou liofilizada, obtiveram resultados *in vitro* para os parâmetros cinéticos e estruturais do espermatozoide similares para os diluídos em meios contendo gema ou LDL natural.

Dong *et al.* (2011) testaram as LDL na diluição do sêmen de macacos, nas concentrações de 10 a 30% e depois de 2 a 10%, em comparação com diluidores a base de gema integral e a base de LDL. Eles não encontraram superioridade nos resultados pós-descongelamento em sêmen diluído com gema ou LDL.

Em bovinos Hu *et al.* (2011) utilizaram concentrações de 7, 8 ou 9% de LDL em meios diluidores para avaliar a motilidade pós-descongelamento e a atividade antioxidante do sêmen de touros congelado. Segundo os autores a concentração de 8% exibiu os maiores valores de motilidade, integridade de acrossoma e integridade de membrana. Posteriormente Beran *et al.* (2015), estudando o efeito da adição de LDL em diluidores comerciais (AndroMed<sup>®</sup>, Bioxcell<sup>®</sup> e Triladyl<sup>®</sup>) para bovinos, utilizaram a concentração de 6% LDL para os dois primeiros diluentes e 10% para o Triladyl<sup>®</sup>. Os resultados mostraram a influência de touro na individualidade como um fator importante, sendo recomendado o diluente Bioxcell<sup>®</sup> com LDL a 6%, diante da capacidade de sobrevivência espermática obtida de 69,2% no início do teste, e 52,9% após 2 horas de incubação.

Já para a espécie bubalina Akhter *et al.* (2011a), testando concentrações de 2,5 a 15% de LDL encontraram que os meios contendo 10% LDL preservaram melhor os parâmetros espermáticos pós-descongelamento e verificaram ainda que os diluidores que continham 20% de gema de ovo, apresentaram maiores taxas de fertilidade. Posteriormente, El-Sharawy *et al.* (2012) encontraram os melhores resultados, *in vitro* pós-descongelamento e taxas de fertilização *in vivo*, para a concentração de 12% de LDL em sêmen de búfalos egípcios.

Brito (2014), trabalhando com a criopreservação do sêmen de búfalos da raça Murrah, testando diferentes concentrações de LDL (2, 4, 8 e 14%) em três diferentes diluidores (Botubov<sup>®</sup>, Tes-Tris e Tris-ácido cítrico), verificou que o diluidor comercial “Botubov<sup>®</sup>” foi mais adequado para o congelamento de sêmen de búfalos. As concentrações de 2, 4 e 8% de LDL, em diluidor Tes-Tris, se apresentaram mais eficazes que o diluidor Tes-Tris com 20% de gema de ovo.

El-Badry *et al.* (2015), investigando o efeito da adição de LDLs, a partir de ovos de diferentes espécies de aves (galinha, perua e codorna), em diferentes concentrações (5%, 7,5%, 10% e 15%) contra um extensor de controle (20% gema de ovo) em diluidor à base de Tris, sobre a qualidade pós-descongelamento do sêmen de búfalos, obtiveram melhores resultados para o extensor proveniente de ovos de galinhas e peruas na concentração de 10%, para qualidade seminal pós-

descongelamento em termos de motilidade, viabilidade, membrana espermática e integridades acrossomal.

Todavia, estudos utilizando LDL para sêmen de búfalos refrigerados são escassos. Sendo os primeiros estudos realizados por Almeida *et al.* (2016b), que avaliaram a motilidade no sistema computadorizado CASA, testando diferentes concentrações de LDL (10 e 5%) nos diluidores TRIS e TES, sob refrigeração a 5°C por até 96 horas. Segundo os autores os resultados obtidos foram promissores, permitindo incorporar o uso de sêmen resfriado até 48 hs, como opção de manejo na fertilização de búfalas.

Becerra (2017) reportou a viabilidade do meio diluidor Tris com 10% LDL para o sêmen refrigerado de búfalos a 5°C, em estudo utilizando diferentes concentrações de diferentes antioxidantes (Blueberry, *Aniba canelilla* e Polifenol de chá verde).

#### 3.9.4. Diferentes tipos de extensores

Holt (2000) relatou que as principais substâncias tamponantes responsáveis pela manutenção do pH dos meios diluidores de congelação são o citrato de sódio, TRIS (trishidroximetilaminometano) e TES (N-tris-hidroximetilaminometano ácido sulfônico). Outras substâncias com potencial atividade tamponante são os fosfatos, carbamatos e especialmente os citratos, (Salisbury *et al.*, 1941) presentes em muitas formulações utilizadas, na atualidade, na forma de citrato de sódio.

Atualmente os meios diluidores TES, TRIS e TES-TRIS vem sendo utilizados para criopreservação de sêmen de búfalos, mas é praticamente inexistente o uso desses mesmos meios para a refrigeração do sêmen dessa espécie. Vale (2011) relatou que grande parte desses diluentes estão constituídos por substratos orgânicos industrializados, e são produtos importados de eficiência comprovada, porém de alto custo e de difícil aquisição, o que em muitas situações encarecem o processo de produção.

##### 3.9.4.1. Tris-gema

O TRIS (Tris-hidroximetil-amino metano -  $H_2NC(CH_2OH)_3$ ) é uma substância facilmente solúvel em água e disponível comercialmente em um alto grau de pureza na forma de cristais. Ele permanece estável em temperatura ambiente por diversos meses e é conhecido por não inibir diversos sistemas enzimáticos (Bates, 1962 *apud* Silva, 2005), atuando como tampão iônico bipolar com pH entre 7,0 e 9,0 (McPhail e Goodman, 1984).

O diluidor Tris-gema de ovo tamponado mais glicerol (TRIS) se tornou o meio de criopreservação mais difundido em todo o mundo para a espécie bovina e outras espécies (Iritani, 1980 e Tardiff *et al.*, 1997), devido a presença do reagente TRIS (hidroxymethylaminomethane), que possui boa capacidade tamponante, atividade osmótica e baixa toxicidade em altas concentrações (Nahas, 1961; Davis *et al.*, 1963; Steinbach e Foote, 1967). Adicionalmente, o glicerol poderia interagir com espermatozoides bovinos, sendo metabolizado e convertido em um estoque extra de glicose, que seria utilizado posteriormente durante o processo de fertilização (Mann e White, 1956; Mohri e Masaki, 1967), acredita-se que um efeito similar ocorra com o sêmen da espécie bubalina.

England (1993) afirmou que o TRIS constituía-se de uma substância disponível no mercado em um alto grau de pureza na forma de cristais, possuindo a propriedade de estabilizar o pH do meio diluidor, atuando como tampão bipolar em pH entre 7,0 e 9,0 (McPhail e Goodman, 1984), difundindo facilmente através de espaços intracelulares (Kallet *et al.*, 2000), uma vez que a atividade metabólica do espermatozoide resulta na formação de íons  $H^+$ , que podem levar a acidificação do meio, e assim, reduzindo a longevidade e a capacidade fertilizante da célula espermática.

Ansari *et al.* (2011), objetivando avaliar a eficiência da água de coco (ACP-112<sup>®</sup>) com ou sem leite na crioproteção de sêmen de búfalo, bem como avaliar o efeito da adição de antioxidantes

naturais do óleo essencial de *Lippia origanoides* sobre a qualidade do sêmen dos búfalos após criopreservação, utilizou como meio controle o extensor Tris-gema. Os resultados do estudo demonstraram melhores resultados para o meio controle Tris-gema em relação aos demais.

Shahverdi *et al.* (2014), em estudo para investigar os efeitos de quatro tempos de equilíbrio (2, 4, 8 e 16 horas) e dois extensores (Tris ou Bioxcell<sup>®</sup>) na criopreservação de sêmen de búfalo, reportaram que os tempos de equilíbrio acima de 4 horas foram superiores em manter a sobrevivência dos espermatozóides no pós-descongelamento.

#### 3.9.4.2. TES

O TES (N-tris-hidroximetil-aminometano ácido sulfônico) é um tampão desenvolvido na década de 1960, e que à temperatura de 37°C mantém um pH entre 6,5 e 7,9, cuja fórmula molecular é  $C_6H_{15}NO_6S$  e seu peso molecular 229,3 (Good *et al.*, 1966).

O TES é um diluente utilizado há mais de três décadas, sendo específico para uso em búfalos, contém constituintes que permitem resultados homogêneos pós-criopreservação (Vale *et al.*, 1984; Rasul *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2002 e Moose *et al.*, 2007). Até hoje, o TES ainda é amplamente utilizado servindo como diluente de controle em experimentos que avaliam o uso de outros diluentes para o congelamento de sêmen de búfalo (Balieiro, 1993; Oba *et al.*, 1993, 1994; Chacur, 1996 e Chacur *et al.*, 1997; Moose *et al.*, 2007; Gonçalves *et al.*, 2011; Brito, 2014; Almeida *et al.*, 2015 e 2016b).

#### 3.9.4.3. TES-TRIS

Os pesquisadores Vale *et al.* (1984), utilizando três animais Murrah, com idades entre dois a oito anos, testaram os meios à base de TRIS e TES para o congelamento de sêmen, alcançando uma taxa de concepção média de 57,1%, para ambos os diluidores. Adicionalmente, Fritsch (1994) relatou que usando os meios à base de TRIS e TES, associados a três tempos de equilíbrio, concluiu que os dois diluidores são adequados para a manutenção da viabilidade espermática do sêmen bubalino, chamando a atenção que o diluidor TES proporcionou resultados superiores de viabilidade pós-criopreservação, obtendo os melhores resultados com tempos de equilíbrio entre cinco e meia e sete horas.

O diluente TES-TRIS é composto de dois tampões isoelétricos (TES e TRIS) que estão associados com glicerol e, em contraste com outros diluentes, também possui dois importantes compostos de alto peso molecular, gema de ovo e leite, que de acordo com Brito (2014), atuam como crioprotetores complementares durante a refrigeração, prevenindo o choque frio e melhorando as taxas de motilidade pós-descongelamento.

Barnabé *et al.* (1995), reportaram que com a utilização dos diluentes TRIS, TES-TRIS e glicina, a motilidade progressiva pós-descongelamento apresentou médias de 30, 40 e 50%, respectivamente, valores esses obtidos de 30 ejaculados oriundos de um reprodutor da raça Murrah.

Brito (2014), trabalhando com búfalos da raça Murrah utilizando diferentes concentrações de LDL em substituição a gema de ovo nos diluidores Botu-Bov<sup>®</sup>, TES-TRIS e Tris ácido cítrico, relatou que a motilidade total obtida no pós-descongelamento foi melhor para os diluidores Botu-Bov<sup>®</sup>, e Tes-Tris, em relação ao Tris-ácido cítrico. Segundo a autora, a substituição da gema de ovo por LDL no diluidor Botu-Bov<sup>®</sup> não foi eficaz para o congelamento do sêmen de búfalos.

Reis *et al.* (2017), ao fazer uma avaliação comparativa entre os extensores TES-TRIS e ACP-112<sup>®</sup> e a associação com o óleo da Sálva do Marajó (*L. origanoides*) na qualidade do sêmen bubalino criopreservado, reportaram maior proteção do extensor TES-TRIS às estruturas espermáticas durante a criopreservação do sêmen de bubalinos comparado a *L. origanoides*.

#### 3.9.4.4. Botu-Bov<sup>®</sup>

Novos extensores comerciais têm sido desenvolvidos especialmente na última década, buscando-se a melhora nos índices de congelabilidade dos ejaculados das espécies de animais domésticos. Dentre os extensores, o meio Botu-Bov<sup>®</sup> (Biotech Ltda, Botucatu/SP) representa uma das principais inovações tecnológicas desenvolvidas no Brasil para a criopreservação seminal. Experimentos comparando a efetividade do extensor Botu-Bov<sup>®</sup> frente ao meio comercial a base de lecitina de soja Bioxcell<sup>®</sup> (IMV, França) e em comparação ao tradicional extensor TRIS demonstraram diferenças significativas para os padrões de movimento desempenhados por espermatozoides de *Bos taurus taurus* (Celeghini *et al.*, 2008) e *Bos taurus indicus* (Crespilho *et al.*, 2006), criopreservados em Botu-Bov<sup>®</sup> em relação aos outros extensores, denotando a superioridade desse diluente que proporciona uma melhor manutenção da viabilidade espermática pós-descongelação.

O meio diluidor Botu-Bov<sup>®</sup> (Biotech Ltda, Botucatu/SP) desenvolvido para a criopreservação seminal de bovinos (Crespilho *et al.*, 2006, 2012 e Zorzetto *et al.*, 2018), também pode ser uma alternativa eficiente para a criopreservação de sêmen da espécie bubalina, mesmo não havendo indicação de bula pelo fabricante, conforme resultados dos trabalhos recentes para esta espécie (Brito *et al.*, 2015; Neves *et al.*, 2015b e Almeida *et al.*, 2015, 2016a e 2017).

#### 3.9.4.5. Lecitina de soja

A mais de sete décadas a gema de ovo é o crioprotetor mais amplamente utilizado na composição de extensores para a criopreservação de espermatozoides da maioria dos mamíferos, como caprinos, ovinos, bovinos, equinos, suínos e até mesmo ser humano (Roca *et al.*, 1997, 2006; Wall e Foote, 1999; Hammadeh *et al.*, 2001; Pagl *et al.*, 2006 e Malo *et al.*, 2010). No entanto, mesmo sendo amplamente utilizados para a criopreservação do sêmen de diversas espécies, os extensores com gema de ovo possuem alguns deméritos sérios (Singh *et al.*, 2013), como riscos de contaminação xenobiótica (Bousseau *et al.*, 1998 e Aires *et al.*, 2003), falta de padronização e presença de hormônios esteróides (Lipar *et al.*, 1999), contém substâncias que inibem trocas metabólicas ou diminuem a motilidade de esperma, todos resultando em qualidade de sêmen reduzida (Bousseau *et al.*, 1998 e Althouse, 2008).

Além disso, a questão da biossegurança em vários países para o transporte de sêmen é extremamente essencial para evitar o perigo de entrada da gripe aviária através de produtos à base de ovos (Kampschmidt *et al.*, 1953; Pace e Graham, 1974; Watson e Martin, 1975; Bousseau *et al.*, 1998 e Holt, 2000). Diante destes problemas, a lecitina de soja surge como uma alternativa para compor os meios extensores para espermatozoides.

Conhecida na China há mais de 5000 anos, a soja (*Glycine max*), foi descrita na obra médica de She-non (3000 a.c.), sendo que em vários países do Oriente é um alimento básico. No Ocidente suas sementes são utilizadas para a extração do óleo comestível, fabricação de leite e queijo, bem como forragem para os animais e adubo verde (Massoti, 1964).

Nasir *et al.* (2007) relataram que a lecitina de soja é uma mistura complexa de fosfolipídios, triglicerídeos e outras substâncias derivadas de vários processos de refinamento do óleo de soja. Ainda segundo os autores, os fosfolipídios, principalmente a fosfatidilcolina, fosfatidiletilenoamina, fosfatidilinositol e o ácido fosfádico são os componentes principais da lecitina de soja bruta. Sendo possível encontrar muitas aplicações dos fosfolipídios nas indústrias farmacêutica, cosmética e alimentar como um efetivo emulsificante biocompatível, estabilizante, biosurfactante e antioxidante.

Segundo Forouzanfar *et al.* (2010) a lecitina de soja possui uma fração de lipoproteína de baixa densidade, assim como a gema do ovo, com a função de proteger a integridade da membrana fosfolipídica durante a criopreservação. Por ser de origem vegetal possui as seguintes vantagens: padronização dos componentes e a eliminação dos riscos de contaminação (Fukui *et al.*, 2008).

Pesquisas têm sido realizadas para verificar o efeito da lecitina de soja na refrigeração e criopreservação do sêmen de diferentes espécies, como bovinos (Bousseau *et al.*, 1998; Aires *et al.*, 2003; Vera-Munoz *et al.*, 2009; Crespilho *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2013; Rehman *et al.*, 2014; El-Sisy *et al.*, 2016 e Tarig *et al.*, 2017), búfalos (Akhter *et al.*, 2010, 2012; Singh *et al.*, 2012; El-Sherbieny, 2014 e Chaudhari *et al.*, 2015), ovinos (Gil *et al.*, 2003; Fukui *et al.*, 2008; De Paz *et al.*, 2010 e Forouzanfar *et al.*, 2010), caprinos (Roof *et al.*, 2012, Salmani *et al.*, 2014 e Soltan *et al.*, 2016), equinos (Aurich *et al.*, 2007; Felicio, 2008; Papa *et al.*, 2010 e Papa *et al.*, 2011), cães (Beccaglia *et al.*, 2009a e Beccaglia *et al.*, 2009b; Kmenta *et al.*, 2011 e Dalmazzo, 2012), suínos (Zhang *et al.*, 2009), macacos (Carvalho, 2012) e humanos (Reed *et al.*, 2009).

Outras aplicações similares podem ser atribuídas a lecitina de soja, como meio de transporte para o sêmen e meio a ser utilizado durante a capacitação dos espermatozoides antes da injeção intracitoplasmática (ICSI) ou fertilização *in vitro* convencional (Reed *et al.*, 2009).

Mesmo havendo diversas pesquisas nas mais variadas espécies animais, sobre os efeitos da lecitina de soja para a refrigeração e criopreservação do sêmen, ainda não há um consenso sobre a melhor concentração a ser utilizada, assim como dos resultados obtidos, corroborando com Deleeuw *et al.* (1993) e Celeghini *et al.* (2008).

Assim é necessário que as pesquisas continuem para que essas barreiras sejam vencidas e a lecitina de soja, que já é uma alternativa segura para conservação e disseminação de material genético de alto valor (Aires *et al.*, 2003 e Bittencourt *et al.*, 2008), possa se tornar realmente um substituto da gema de ovo para todas as espécies.

### 3.10. Antioxidantes

Os antioxidantes são inibidores das ROS na sua formação ou no mecanismo de ação, presentes no espermatozoide e no plasma seminal, atuando de forma independente ou sinérgica (Aurich, 2008).

Os processos de refrigeração, congelamento e descongelamento produzem um estresse físico e químico na membrana dos espermatozoides, o que reduz sua viabilidade e capacidade fecundante. O choque pelo frio nos espermatozoides é associado com o estresse oxidativo induzido pela geração de espécies de oxigênio reativas, conhecidas com ROS. Estas representam um fator de risco, pois são altamente tóxicas aos espermatozoides. A peroxidação lipídica causada pelas ROS ocasiona danos estruturais ao acrossoma, à cabeça e à peça intermediária dos espermatozoides, bem como dá início ao processo de apoptose e induz a fragmentação do DNA. Existe uma correlação negativa significativa entre os níveis de ROS e a taxa de fertilização *in vitro* (Agarwal *et al.*, 2005) e supõe-se que o mesmo ocorra nos processos de fecundação *in vivo*.

Os antioxidantes são a principal defesa contra o estresse oxidativo induzido por radicais livres. Em tese, o efeito oxidativo gerado pelas ROS pode ser reduzido pela utilização de substâncias antioxidantes no plasma seminal ou adicionadas aos diluentes utilizados na criopreservação (Castro, 2010). Nos últimos anos, muitas pesquisas relatam os efeitos do estresse oxidativo sobre a célula espermática, especialmente no sêmen de humanos. Nesse contexto, alguns pesquisadores têm adicionado substâncias antioxidantes em amostras de sêmen bovino (Foote *et al.*, 2002 e Klinc *et al.*, 2007), equino (Silva *et al.*, 2008), bubalino (Singh *et al.*, 1996; Nair *et al.*, 2006; Castro, 2010; Becerra, 2017 e Almeida *et al.*, 2017 - comunicação pessoal), ovino (Maia, 2006 e Marti *et al.*, 2008), caprino (Sinha *et al.*, 1996), suíno (Brezinska-Slevbodsinska *et al.*, 1995) e humano (Taylor, 2001 e Hammadeh *et al.*, 2008).

Os mecanismos de defesa antioxidante presentes no plasma seminal e na célula espermática incluem sistemas enzimáticos e não enzimáticos. O sistema enzimático compreende enzimas como a superóxido dismutase, a glutatona redutase, glutatona peroxidase e catalase (Borges, 2008); e os antioxidantes não enzimáticos incluem o ácido ascórbico, a vitamina E, a taurina, a hipotaurina, os



carotenóides e ubiquinonas (Coenzima Q), ácido úrico e ácido lipóico (Norberg e Arnér, 2001). Para Ferreira e Matsubara (1997), esses sistemas podem atuar em duas direções: como removedor do agente oxidante, antes que ele ocasione lesão celular (superóxido dismutase; catalase; glutathione peroxidase e a vitamina E), ou ainda como agente reparador da lesão já ocorrida (ácido ascórbico; glutathione reductase e glutathione peroxidase).

Silva *et al.* (2008) reportaram que ainda não há consenso quanto à dosagem e ao tipo de antioxidante ideal para a proteção de espermatozoides nas diferentes espécies, talvez pelo fato das pesquisas utilizarem metodologias variadas, formas diferentes de avaliação espermática e diferenças na criopreservação do sêmen quanto à espécie, à raça e aos ejaculados dos animais.

A N-acetilcisteína (NAC) é um potente antioxidante e possivelmente é um dos mais estudados. Ele desempenha um papel importante na proteção celular contra dano oxidativo, tem capacidade para estimular e manter níveis intracelulares de glutathione reduzida e desintoxicar ROS. É um precursor de glutathione reduzida (Sreenivasula *et al.*, 2011). Existem vários estudos que avaliaram sua capacidade antioxidante em nível reprodutivo (Duarte *et al.*, 2010; Sreenivasula *et al.*, 2011; Oksay *et al.*, 2012; Ranawat *et al.*, 2013 e Becerra, 2017).

Almeida *et al.* (2017 - comunicação pessoal) utilizando sêmen de 11 touros búfalos, testaram o meio extensor TRIS com 10% LDL + 0,5% de lecitina de soja para diferentes antioxidantes em três diferentes concentrações (Acetilcisteína 0,1, 1 e 10 mM; Acetilcarnitina 0,1, 1 e 10 mM; Lipoato de sódio 0,1, 1 e 10 mM e Metformina 0,1, 1 e 10 mM), sendo encontrado melhor resultado para o diluidor com o antioxidante acetilcisteína na concentração de 10 mM para o sêmen de búfalo refrigerado a 5°C por até 120 horas de avaliação da motilidade no sistema CASA e para a integridade de membrana plasmática do espermatozoide pelo teste hiposmótico por até 72 horas.

A NAC é um antioxidante com base tiol, que desempenha um papel importante na proteção dos constituintes celulares contra o dano oxidativo. A ação hipotética de NAC origina de sua capacidade de estimular e sustentar os níveis intracelulares de glutathione. Outra vantagem da NAC é a sua eficiência de quelar metais tóxicos (Banner *et al.*, 1986).

Apesar da literatura científica apresentar resultados de pesquisas com uso de antioxidantes no sêmen, o volume de informações que avaliem ou comparem os efeitos do emprego de antioxidantes no sêmen bubalino é, ainda, bastante limitado. No tocante ao uso de antioxidantes para o sêmen refrigerado é praticamente inexistente.

### 3.11. Análise espermática assistida por computador (CASA)

Os parâmetros convencionais utilizados na avaliação espermática como: número total de espermatozoides móveis, motilidade progressiva e morfologia, têm se mostrado limitados quanto à capacidade de estimar o potencial de fertilidade do sêmen. Segundo Verstegen *et al.* (2002), a utilização da quantificação da qualidade espermática tem sido baseada na avaliação subjetiva, usando estimativa visual de parâmetros como motilidade massal e individual, contudo, estudos relatam existir uma variação de 30 a 60% na estimativa desses parâmetros devido à limitação do ser humano em quantificar as diferentes subpopulações espermáticas na amostra (Amann e Hammerstedt, 1980 e Verstegen *et al.*, 2002). Neste contexto, o Computer Assisted Sperm Analysis (CASA) fornece dados detalhados, precisos e com repetibilidade para diferentes parâmetros, relativos à motilidade do sêmen humano ou nas espécies animais. Assim, o CASA oferece uma melhor estimativa da fertilidade, em relação à rotina microscópica (Farrell *et al.*, 1996).

Amann e Katz (2004) reportaram que o CASA é um sistema automático (hardware e software) utilizado para visualizar, digitalizar e analisar imagens sucessivas, fornecendo informações acuradas, precisas e significativas do movimento individual de cada célula bem como de subpopulações de células espermáticas. Permitindo desta forma maior objetividade e rapidez, uma vez que esta é realizada numa fração do tempo bem menor daquela gasta na avaliação subjetiva

(Motimer, 1997). Ainda segundo o autor, a análise computadorizada gera informações sobre parâmetros, como: velocidade do percurso curvilinear (VCL), velocidade do percurso médio (VAP), velocidade em linha reta (VSL), retilinearidade (STR), linearidade (LIN), índice de oscilação (WOB), frequência de batimento cruzado (BCF) e deslocamento lateral da cabeça (ALH), obtendo desta forma uma análise mais acurada e precisa sobre a cinética espermática.

O sistema tem demonstrado ser uma ferramenta útil no monitoramento da qualidade espermática de amostras submetidas a diferentes tratamentos experimentais (Farrel *et al.*, 1996), na pesquisa de novos extensores seminais, crioprotetores ou outros tipos de processamento (Amann e Katz, 2004).

Cox *et al.* (2006) relataram que a motilidade espermática é comumente apontada como uma das mais importantes características associadas com a habilidade fertilizante do espermatozoide. No entanto, quando mensurada microscopicamente, não é bem correlacionada com a fertilização *in vivo* ou *in vitro*, pois além do erro humano durante a avaliação subjetiva desse parâmetro, existe ainda a limitação do método para avaliar detalhadamente as características do movimento espermático (Liu *et al.*, 1991).

Nas últimas décadas, os sistemas de avaliação automática têm mostrado ser uma ferramenta útil na avaliação das propriedades cinemáticas do espermatozoide de forma individual do ejaculado, mostrando grande potencial para prever a fertilidade do macho, por meio da correlação da velocidade de natação do espermatozoide com a fertilização de oócito *in vitro* e *in vivo* (Cox *et al.*, 2006).

Segundo Verstegen *et al.* (2002), na tentativa de correlacionar os parâmetros do CASA com a taxa de fertilização, verificou-se que os valores de VAP, VSL e VCL são significativamente maiores em amostras que produzem mais de 50% de oócitos fertilizados do que naquelas onde a taxa de fertilização de oócito é menor que 50%. Mortimer (2000) e Verstegen *et al.* (2002), reportaram que amostras com elevados valores desses parâmetros de velocidade e de LIN e BCF apresentam melhor migração e penetração no muco cervical. Entretanto, entre os parâmetros cinemáticos fornecidos pelo o CASA, a VCL e a ALH têm mostrado grande correlação com taxa de fertilização pela maioria dos estudos. Parâmetros como BCF e LIN têm revelado correlação positiva com a taxa de prenhez em alguns estudos, mas correlação negativa em outros (Verstegen *et al.*, 2002).

Vários fatores podem gerar uma variabilidade na estimativa dos parâmetros das características dos espermatozoides mensurados pelo CASA, entre os quais podem-se citar: experiência do observador, identificação da espécie, acurácia da câmara utilizada, temperatura de análise, tempo entre a colheita da amostra e sua análise, método de processamento da amostra, instrumento usado, concentração espermática e frequência de aquisição de imagens (Davis e Katz, 1993; Farrel *et al.*, 1996; Mortimer, 2000; Matos *et al.*, 2008; Brito, 2016 e Crespilho, 2017).

Poucos estudos foram realizados com sêmen bubalino com o propósito de avaliar o comportamento da cinética espermática após o processo de refrigeração do sêmen a 5°C (Akhter *et al.*, 2011b; Singh *et al.*, 2012; Almeida *et al.*, 2016b e Becerra, 2017), congelado (Akhter *et al.*, 2011a; El-Sherbieny, 2014 e El-Badry *et al.*, 2015) e estudos diretamente relacionados em prever a fertilidade (Singh *et al.*, 2016 e Ahmad *et al.*, 2017).

### 3.12. Integridade de membrana plasmática pelo teste hiposmótico (HOST)

Watson (2000) reportou que a avaliação da integridade de membrana plasmática dos espermatozoides é de suma importância para determinar a capacidade de fertilização do sêmen. Neste contexto, a avaliação da integridade de membrana plasmática pelo teste hiposmótico é prática, rápida, confiável, baixo custo e fácil de ser executada à campo.

O teste hiposmótico avalia a integridade funcional da membrana plasmática e, estando intacta, quando o espermatozoide é incubado em solução hiposmótica ocorre o influxo de água até que seja atingido o equilíbrio osmótico. Como consequência desse processo a membrana se expande causando o enrolamento da cauda, um processo fisiológico, mas se a membrana estiver danificada, essa reação não ocorrerá (Jeyendran *et al.*, 1984).

Vários autores têm observado em sêmen *in natura* e congelado/descongelado que a integridade funcional da membrana plasmática avaliada pelo teste hiposmótico é uma importante ferramenta complementar para prever a capacidade de fertilização do sêmen de búfalos (Lodhi *et al.*, 2008 e Brito, 2014). Lodhi *et al.* (2008) recomendam que o teste hiposmótico seja adicionado na análise de rotina de amostras de sêmen para inseminação artificial em búfalos. Isto porque, tanto a refrigeração quanto a congelação podem causar efeitos deletérios sobre a membrana, e a utilização do HOST permite uma avaliação mais acurada do potencial fecundante da população de espermatozoides de uma dose de sêmen (Correa e Zavos, 1994 e Rota *et al.*, 2000).

### 3.13. Fertilidade em búfalos

#### 3.13.1. Monta natural

Em rebanho bubalinos leiteiros é possível encontrar taxas de fertilidade com a monta natural acima de 90% (Bernardes, 2007). No entanto, segundo Monteiro (2015), apesar dos altos índices, esses indicadores não mostram precisamente o número de serviços necessários por concepção, o intervalo parto concepção, a proporção de gestações que vieram a termo, bem como o tempo de intervalo dos partos que os animais apresentaram. Assim, por se tratar de dados obtidos somente de monta natural, essas taxas de fertilidade também se restringem à eficiência reprodutiva durante a estação reprodutiva favorável do ano (outono-inverno).

Há uma carência de trabalhos na literatura que comprovem a eficiência reprodutiva de búfalas leiteiras, desde a concepção até o parto, de acordo com as estações reprodutivas favorável e desfavorável.

#### 3.13.2. Inseminação artificial

A inseminação artificial é considerada a mais importante técnica utilizada para o melhoramento genético animal (Sugulle *et al.*, 2006), representando, segundo Baruselli *et al.*, (2007), uma importante ferramenta para difusão de material genético superior de origem paterna. Corresponde a um método eficiente para acelerar o melhoramento genético de rebanhos.

Segundo Vasconcelos e Sá Filho (2010), apresenta uma relação custo/benefício muito interessante, pois através da IA é possível se obter genética de animais valiosos, que agregam eficiência de ganho aos produtos, por um custo favorável. Entretanto, o emprego desta técnica de maneira convencional, pode ser severamente comprometido se baseada somente na observação de cio devido ao discreto comportamento homossexual das fêmeas e, dependendo da temperatura ambiental, a manifestação do comportamento de estro durante a noite e a madrugada (Singh *et al.*, 1984; Baruselli *et al.*, 1993b, 2007; Vale e Ribeiro, 2005 e Porto-Filho *et al.*, 2014).

##### 3.13.2.1. Inseminação artificial com uso de sêmen congelado

O primeiro congelamento bem sucedido do sêmen de búfalo foi relatado por Roy *et al.* (1956). Basirov (1964) foi o primeiro a relatar a gestação com espermatozoides congelados e descongelados de búfalo. Desde então, a IA foi adotada em búfalos, no entanto, continua sendo pouco utilizada (cerca de 1% - IBGE, 2013), por causa da baixa taxa de fertilidade com sêmen congelado-descongelado (Muer *et al.*, 1988; Andrabi *et al.*, 2001; Ahmad *et al.*, 2003; Senatore *et al.*, 2004; De Rensis, *et al.*, 2005; Murugavel *et al.*, 2009 e Rossi *et al.*, 2014), quando comparada a espécie bovina.

### 3.13.2.2. Inseminação artificial com sêmen refrigerado

Previamente ao desenvolvimento dos processos de congelação/descongelação dos espermatozoides, a IA em bovinos era realizada apenas com sêmen fresco (Verberckmoes *et al.*, 2005), observando-se uma longevidade espermática de até 48 horas (Thacker e Almquist, 1953 e Severo, 2013). No entanto, com a descoberta dos agentes crioprotetores e avanços na produção de meios diluidores, gradativamente a utilização do sêmen bovino fresco ou refrigerado foi abandonada em virtude dos evidentes benefícios relacionados com a criopreservação.

A espécie bubalina, que teve grande parte de suas técnicas reprodutivas adaptadas da espécie bovina, manteve o uso do sêmen congelado como metodologia praticada e recomendada por técnicos e produtores. Em parte, isto se deve a dificuldade de manter touros em constante coleta e com sêmen de qualidade aceitável, assim como poucos profissionais capacitados para trabalhar com coleta e manipulação de sêmen bubalino nas propriedades.

Contudo, a congelação não foi capaz de resolver todos os problemas relativos a conservação do sêmen, já que o processamento reduz drasticamente a fertilidade dos espermatozoides da maioria das espécies mamíferas (Watson, 2000). Uma expressiva parcela de reprodutores se mostram intolerantes ao processo de criopreservação, apresentando significativa queda na fertilidade espermática após o processamento, com especial destaque para a espécie equina (Batellier *et al.*, 2001), suína (Gil *et al.*, 2008) e bubalinos (Oba *et al.*, 1993; Sansone *et al.*, 2000 e Rasul *et al.*, 2000 e 2001). Por outro lado, a congelação representa um processo caro em relação à IA utilizando sêmen refrigerado, que pode ser utilizado como método adicional para propagação de material genético em bovinos (Crespilho *et al.*, 2012; Resende e Almeida, 2013; Borges-Silva *et al.*, 2015; Borges-Silva *et al.*, 2017 e Borchardth *et al.*, 2018) e bubalinos (Sing *et al.*, 2012; Almeida *et al.*, 2015; Almeida *et al.*, 2016b e Almeida *et al.*, 2017).

Vale ressaltar que o uso do sêmen refrigerado por não ser submetido ao processo de congelamento/descongelamento, sofre menos lesões, resultando em maior viabilidade e aumentando a capacidade de fertilizar (Borges-Silva *et al.*, 2017); possibilidade do uso de doses de inseminação reduzidas, otimização de touros de alto mérito genético, menor custo de armazenamento e praticidade para uso em inseminação artificial (Vishwanath e Shannon, 2000; Verberckmoes *et al.*, 2005 e Bucher *et al.*, 2009).

E por fim, estudos com sêmen refrigerado, demonstram que ele é utilizado em 95% das inseminações realizadas na Nova Zelândia (Crespilho *et al.*, 2012) e, em menor escala, na África, França, Austrália, Alemanha e Europa Oriental (Vishwanath, 2003). Mais recentemente o Brasil também retomou os estudos com o sêmen refrigerado, principalmente com o crescimento da utilização dos protocolos de IATF para bovinos (Resende e Almeida, 2013; Papa *et al.*, 2015; Borges-Silva *et al.* 2015 e 2017) e bubalinos (Almeida *et al.*, 2015; 2016b e 2017), comprovando sua eficácia e aumentando o percentual de prenhez quando comparado com o sêmen congelado.

### 3.14. Protocolos de sincronização

Os protocolos de manipulação farmacológica do ciclo estral visam sincronizar a fase luteínica, o crescimento folicular e a ovulação, permitindo o uso da IATF mesmo em animais que não estão apresentando sinais de estro ou de ciclicidade. O uso destes protocolos tem colaborado para a difusão da biotecnia de IA em diversos rebanhos bubalinos no Brasil e no mundo, possibilitado o melhoramento genético, com aumento na produção leiteira (Baruselli *et al.*, 2009).

### 3.14.1. Protocolo para IATF em búfalas durante o período reprodutivo favorável

Pursley *et al.* (1995) foram os primeiros a desenvolver um protocolo de sincronização de estro e da ovulação para fêmeas bovinas, sendo este protocolo denominado Ovsynch. Segundo Ferreira (2010), nesse protocolo a primeira dose de GnRH atua no folículo dominante (se presente), promovendo sua ovulação ou luteinização e sincronizando o início de uma nova onda folicular. A PGF<sub>2</sub>α aplicada sete dias após regride o corpo lúteo normal do ciclo estral, bem como o possível corpo lúteo recém formado ou folículo luteinizado pela ação do primeiro GnRH. Já a segunda aplicação de GnRH dois dias após a aplicação da PGF<sub>2</sub>α é para induzir um pico de LH (Ferreira, 2010) e fazer ovular o folículo dominante da nova onda folicular em 22,2 vs. 33,9 hs dependendo se houve ovulação ou não na aplicação do primeiro GnRH (Baruselli *et al.*, 1999). Posteriormente Berber *et al.* (2002) e Baruselli *et al.* (2003b), reportaram que o GnRH é capaz de induzir 60-90% de ovulação nos animais tratados, com intervalo ao redor de 30 horas entre o GnRH e a ovulação.

Em búfalos, a estacionalidade reprodutiva interfere na eficiência dos protocolos de IATF. No entanto, durante a estação reprodutiva favorável (outono e inverno), em rebanhos com alta taxa de ciclicidade, nota-se que as búfalas respondem adequadamente ao protocolo Ovsynch (Baruselli *et al.*, 1999). Na Tabela 3 são reportadas satisfatórias taxas de prenhez por IA, obtidas em búfalas leiteiras utilizando o protocolo Ovsynch para o sêmen congelado.

Tabela 3 - Taxas de prenhez por IA de búfalas submetidas ao protocolo Ovsynch durante o período reprodutivo favorável (outono e inverno).

% (n/N)	Referência
50,2 (131/261)	Baruselli <i>et al.</i> (1999)
66,9	Baruselli <i>et al.</i> (2001a)
48,5 (133/270)	Baruselli <i>et al.</i> (2001b)
55,6 (10/18)	Bartolomeu <i>et al.</i> (2001)
60,3 (184/305)	Berber <i>et al.</i> (2002)
44,3 (116/262)	Baruselli <i>et al.</i> (2003a)
48,8 (472)	Baruselli <i>et al.</i> (2003b)
44,4 (40/90)	Neglia <i>et al.</i> (2003)
53,3 (30)	Queiroz (2003)
36,6	Ribeiro Filho <i>et al.</i> (2003)
31,8 (7/22)	Silva <i>et al.</i> (2003)
63,0 (131/209)	Campanile <i>et al.</i> (2005)
27,7 (23/83)	De Rensis <i>et al.</i> (2005)
30	Pellerano <i>et al.</i> (2005)
60	Ribeiro <i>et al.</i> (2005)
60,0 (12/20)	Picanço (2006)
66,7	Vale <i>et al.</i> (2006)
66,6	Ribeiro <i>et al.</i> (2006)
53,0 (125/235)	Crudeli <i>et al.</i> (2008)
46,6 (166/356)	Neglia <i>et al.</i> (2008)
52,9 (204/385)	Vecchio <i>et al.</i> (2010)
44,2 (138/312)	Campanile <i>et al.</i> (2011)
61,8 (94/152)	Campanile <i>et al.</i> (2013)
23,9	Rossi <i>et al.</i> (2014)
31,7	Almeida <i>et al.</i> (2016a)

% = Porcentagem; n = número de prenhez e N = número de animais utilizados.

No Brasil Almeida *et al.* (2016a) foram os primeiros a utilizar o sêmen refrigerado vs. congelado em IATF para búfalas em período reprodutivo favorável (animais cíclicos), utilizando protocolo Ovsynch. Neste estudo, os autores encontraram uma taxa de concepção de 54,5% para o sêmen refrigerado e 31,7% para o sêmen congelado.

### 3.14.2. Protocolo para IATF em búfalas durante o período reprodutivo desfavorável

Durante a estação reprodutiva desfavorável (primavera e verão), as búfalas apresentam alta incidência de anestro, o que aumenta o intervalo parto concepção e, conseqüentemente, afeta negativamente o desempenho reprodutivo (Baruselli *et al.*, 2009). Entretanto, no Brasil, a demanda por derivados lácteos bubalinos é relativamente constante durante o ano, o que motiva as propriedades a desestacionalizar as parições, a fim de atingir uma maior regularidade na oferta de matéria prima durante todo o ano, através do uso adequado de biotecnias da reprodução (Bernardes, 2007), mantendo um maior número de búfalas produzindo leite durante o período de maior disponibilidade de forragem (Carvalho *et al.*, 2011).

Segundo Rhodes *et al.* (2002), vacas em anestro pós-parto submetidas ao tratamento com P<sub>4</sub> apresentaram aumento na pulsatilidade de LH. Em estudo posterior Rhodes *et al.* (2003) reportaram que o tratamento de vacas em anestro com P<sub>4</sub> resulta no aumento das concentrações de E<sub>2</sub>, elevando a pulsatilidade da secreção de LH e o número de receptores para esta gonadotrofina, nas células da teca e da granulosa de folículos pré-ovulatórios. Além disso, McDougall *et al.* (1992) relataram que a elevação nas concentrações plasmáticas de P<sub>4</sub>, durante o período de anestro, é importante para a expressão do estro e para a subsequente função luteínica. Assim foi hipotetizado, que a exposição de búfalas em anestro à P<sub>4</sub> exógena pode estimular o desenvolvimento e a maturação do folículo dominante por aumentar a liberação de LH e por estimular o desenvolvimento de receptores para essa gonadotrofina, aumentando assim a secreção de E<sub>2</sub> e, promovendo a ovulação (Baruselli *et al.*, 2009). Porto-Filho *et al.* (2004), Carvalho *et al.* (2007 e 2013) observaram que a exposição de búfalas em anestro à P<sub>4</sub> exógena pode ser uma alternativa para a desestacionalização dos partos e produção de leite de búfalas submetidas a protocolos de sincronização da onda de crescimento folicular e da ovulação para IATF.

Carvalho *et al.* (2011) preconizaram o seguinte protocolo para a desestacionalização de búfalas: inserção de um dispositivo intravaginal liberador de P<sub>4</sub> associado à injeção intramuscular de estradiol (E<sub>2</sub>; benzoato de estradiol), em dia aleatório do ciclo estral. Nove dias mais tarde, aplica-se PGF<sub>2</sub>α mais a eCG, seguida pela aplicação de GnRH no D11. Com 16 horas do último tratamento, realiza-se a IATF.

Carvalho *et al.* (2013) relataram que a adição do eCG no momento da retirada do dispositivo intravaginal liberador de P<sub>4</sub>, somada aos efeitos benéficos do protocolo à base de P<sub>4</sub>/E<sub>2</sub>, mostrou-se como ferramenta eficaz para potencializar os resultados de prenhez por IA em programas de IATF em búfalas durante a estação reprodutiva desfavorável.

Almeida *et al.* (2015) foram pioneiros em utilizar o sêmen refrigerado vs. congelado em IATF para búfalas em período reprodutivo desfavorável (animais acíclicos), utilizando protocolos com BE, P<sub>4</sub>, eCG e PGF<sub>2</sub>α, obtendo-se uma taxa de prenhez 11%. De acordo com os pesquisadores, a baixa taxa de prenhez observada em búfalas sincronizadas durante a estação reprodutiva desfavorável é indicativo de que, mesmo com a estimulação hormonal exógena utilizada, as búfalas continuam apresentando marcante estacionalidade.

Em trabalho posterior, Almeida *et al.* (2017), ao utilizarem o sêmen refrigerado e congelado em IATF para búfalas primíparas em período reprodutivo desfavorável (animais acíclicos), utilizando protocolos com BE, P<sub>4</sub>, eCG e PGF<sub>2</sub>α, reportaram 50% de taxa de prenhez total, sendo 55,6% e 44,4% para o sêmen refrigerado e congelado (P<0,05), respectivamente. Os resultados satisfatórios para búfalas, submetidas ao protocolo de IATF à base de P<sub>4</sub>, E<sub>2</sub> e eCG, durante a estação reprodutiva desfavorável são mostrados na Tabela 4.

Os protocolos de IATF à base de P<sub>4</sub>, E<sub>2</sub> e eCG, durante a estação reprodutiva desfavorável, apresentam melhores resultados quando aplicados em búfalas múltiparas, com boa condição corporal (Berber *et al.*, 2002).

Tabela 4 - Taxas de prenhez por IA de búfalas submetidas ao protocolo de IATF à base de P<sub>4</sub>, E<sub>2</sub> e eCG, durante a estação reprodutiva desfavorável (primavera e verão).

% (n/N)	Referência
53,0 (44/83)	Baruselli <i>et al.</i> (2002)
53,5 (46/86)	Baruselli <i>et al.</i> (2003c)
30,3 (33/109)	Neglia <i>et al.</i> (2003)
43,1 (22/51)	Porto-Filho <i>et al.</i> (2004)
42,8	Linpinski <i>et al.</i> (2005)
41,6	Ribeiro <i>et al.</i> (2006)
53,3	Vale <i>et al.</i> (2006)
52,1 (126/242)	Carvalho <i>et al.</i> (2007)
40,6 (13/32)	Murugavel <i>et al.</i> (2009)
52,7 (68/129)	Carvalho <i>et al.</i> (2013)
11,0 (15/136)	Almeida <i>et al.</i> (2015)
61,0	Monteiro <i>et al.</i> (2016)
44,4 (20/45)	Almeida <i>et al.</i> (2017)
47,5 (168/354)	Carvalho <i>et al.</i> (2017)

% = Porcentagem; n = número de prenhez e N = número de animais utilizados.

### 3.15. Normatização para utilização do sêmen

Segundo a Instrução Normativa MAPA Nº 36, de 27 de outubro de 2015 (MAPA, 2015), somente poderá ser distribuído no Brasil o sêmen bovino ou bubalino coletado em centros de coleta e processamento de sêmen - CCPS, registrados no Ministério da agricultura pecuária e Abastecimento (MAPA), que cumprem os requisitos sanitários mínimos para a produção e comercialização de sêmen bovino e bubalino no país. Isto significa que o sêmen coletado e processado em fazendas particulares, somente poderá ser utilizado pelo produtor e não é permitida sua comercialização.

As coletas de sêmen realizadas em fazendas, sem fins comerciais, apenas para uso particular, devem ser realizadas por médico veterinário. Isto porque, o veterinário é o profissional qualificado para realizar as avaliações do reprodutor, seu material genético e ainda realizar exames sanitários e coleta de material a ser enviado aos laboratórios, com o intuito de impedir a propagação de doenças da esfera reprodutiva e zoonoses. Dentre os exames sanitários das principais doenças a serem realizados, tem-se: brucelose, tuberculose, tricomonose, compilobacteriose, leptospirose, diarreia viral bovina e rinotraqueíte infecciosa dos bovinos, que podem comprometer a reprodução ou a saúde humana. Adicionalmente, podem ser realizados exames bacteriológicos e virológicos no sêmen antes da sua utilização. Conseqüentemente, diferentemente da monta natural, o uso da IA reduz consideravelmente o risco de transmissão de doenças reprodutivas nos rebanhos.

### 3.16. Fertilização *in vitro* (FIV)

É uma biotecnica que permite maximizar a eficiência do uso de material genético superior em curto espaço de tempo nos animais domésticos (Wilmot *et al.*, 2000). Em búfalos, apesar das várias dificuldades, principalmente em função das taxas de embriões produzidos por doadora aspirada ainda serem baixas refletindo diretamente no custo da prenhez, que é cerca de 3 a 4 vezes mais alto que em zebuínos (Ohashi *et al.*, 2017), alcançou nível comercial com a empresa *In vitro* (*In vitro*, 2016).

Desde a primeira gestação em búfalas com embrião produzido *in vitro* (Madan *et al.*, 1992), levou-se 14 anos até o primeiro nascimento (Ohashi *et al.*, 2006). Desde então, grandes avanços foram alcançados com as biotécnicas reprodutivas na espécie bubalina, até o atual momento. No entanto, a qualidade inconsistente e dificuldade de coleta de sêmen em búfalos não condicionados é uma importante fonte de variabilidade nos resultados. Existe a necessidade na maioria dos casos de

utilizar sêmen congelado importado, devido a pouca disponibilidade de sêmen congelado pelas Centrais no mercado nacional, face aos motivos já mencionados.

Face aos problemas citados anteriormente, no Brasil em particular, a grande maioria dos trabalhos com FIV em búfalos utilizam sêmen importado. Neste contexto, a avaliação da fertilidade é essencial para programas de reprodução, podendo ser realizada com testes a campo ou em laboratório, por meio da PIVE. A fertilidade à campo consiste no método mais preciso, porém, quando comparado a PIVE, se revela mais demorado e oneroso (Hallap, 2005).

Mesmo havendo vários fatores que dificultam a utilização da FIV, nos últimos anos diversos grupos têm realizado pesquisas com FIV em búfalos no Brasil, entre eles, pode-se citar Carvalho *et al.* (2002); Saliba *et al.* (2013); Pereira (2015) e Ohashi *et al.* (2017). Segundo Pereira *et al.* (2015), ovários de animais de frigorífico possuem maior número de folículos/ovário e fornecem maior quantidade de COCs totais e COCs grau A, B e expandidos comparado a aspiração folicular guiada por ultrassom de animais *in vivo*. No entanto, o reduzido abate de fêmeas bubalinas comparada às fêmeas bovinas limita em determinados momentos a aquisição de ovários suficientes para realização dos estudos.

Dificuldade também comprovada por Suresh *et al.* (2009), que ao realizar uma meta análise com mais de 100 artigos publicados entre 1991 e 2008 observaram valores médios de taxa de blastocisto ao redor de 20%, valores considerados baixos pelos autores, resultado este dentro dos parâmetros relatado no Brasil por Ferraz *et al.* (2015).

Em estudo recente, Ohashi *et al.* (2017) reportaram uma taxa de 24% de prenhez (resultados preliminares), em aspiração folicular de búfalas selecionadas por tamanho ovariano acima de 2,5 cm x 1,5 cm (comprimento x largura), no estado do Pará.

Apesar de haverem vários grupos trabalhando com PIVE em búfalos, os resultados ainda estão abaixo do esperado, o que evidencia a necessidade de novos estudos, que consigam melhorar os índices de prenhez com a PIVE na espécie.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOU-HAILA, A., TULSIANI, D.R.P. Mammalian Sperm Acrosome: Formation, contents and function. *Arch. Biochem. Biophys.*, v.379, cap.2, p.173-182, 2000.

AGARWAL, A.; PRABAKARAN, S.A.; SAID, T.M. Prevention of oxidative stress injury to sperm. *J. Androl.*, v.26, n.6, p.654-660, 2005.

AGUIAR, P.R.L.; MORAES, J.B.; MALSCHITZKY, E. et al. Criopreservação de sêmen bovino utilizando diluente à base de PBS com três diferentes percentuais de gema de ovo. *Vet. Foco*, Canoas, v.5, n.1, p.44-50, 2007.

AHMAD, H.; ANDRABI, S.M.H.; ANWAR, M. et al. Use of post-thaw semen quality parameters to predict fertility of water buffalo (*Bubalus bubalis*) bull during peak breeding season. *Andrologia*, May, v.49, n.4, p.1-6, 2017.

AHMAD, Z.; ANZAR, M.; SHAHAB, M. et al. Sephadex and sephadex ion-exchange filtration improves the quality and freezability of low-grade buffalo semen ejaculates. *Theriogenology*, v.59, p.1189-1202, 2003.

AIRES, V.A.; HINSCH, K.D.; SCHLOESSER, F.M. et al. *In vitro* and *in vivo* comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology*, New York, v.60, p.269-279, 2003.



AKHTER, S.; ANSARI, M.S.; RAKHA, B.A. et al. Cryopreservation of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen in Bioxcell extender. *Theriogenology*, v.74, p.951-955, 2010.

AKHTER, S.; ANSARI, M.S.; RAKHA, B.A. et al. Effect of low density lipoproteins in extender on freezability and fertility of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull semen. *Theriogenology*. v.76, p.759-764, 2011a.

AKHTER, S.; ANSARI, M.S.; RAKHA, B.A. et al. *In vitro* evaluation of liquid-stored buffalo semen at 5°C diluted in soya-lecithin based extender (Bioxcell®), Tris-citric egg yolk, skim milk and egg yolk-citrate extenders. *Reprod. Dom. Anim.*, v.46, p.45-49, 2011b.

AKHTER, S.; ANSARI, M.; ANDRABI, S. et al. Soya-lecithin in extender improves the freezability and fertility of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Reprod. Dom. Anim.*, v.47, n.5, p.815-819, 2012.

ALI, A.; ABDEL-RAZEK, A.K.; ABDEL-GHAFFAR, S. et al. Ovarian follicular dynamics in buffalo cows (*Bubalus bubalis*). *Reprod. Dom. Anim.*, v.38, p.214-218, 2003.

ALMEIDA, J.; BECERRA, V.A.B.; NEVES, B.P. et al. Refrigeração de sêmen bubalino (*Bubalus bubalis*) frente a diferentes extensores e avaliação da motilidade espermática no CASA. Proceedings of the 30<sup>th</sup> Annual of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE), Foz do Iguaçu, PR, Brazil. August 25<sup>th</sup> to 27<sup>th</sup>, 2016, and 32<sup>th</sup> Meeting of the European Embryo Transfer Association (AETE), Barcelona, Spain, September 9<sup>th</sup> and 10<sup>th</sup>, 2016. Abstracts. *Anim. Reprod.*, v.13, n.3, p.557, Jul./Sept., 2016b.

ALMEIDA, J.; BRITO, M.F.; AULER, P.A. et al. Avaliação das taxas de prenhez em búfalas com o uso de sêmen refrigerado vs. congelado em programas de IATF durante a estação reprodutiva desfavorável. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 21, p.99, 2015, Belo Horizonte, MG. *Anais...*Belo Horizonte: CBRA, 2015.

ALMEIDA, J.; BRITO, M.F.; BECERRA, V.A.B. et al. Avaliação das taxas de prenhez em búfalas primíparas submetidas a IATF com sêmen refrigerado vs. congelado durante a estação reprodutiva desfavorável. *Reunião da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões*, Recife, PB, 2017.

ALMEIDA, J.; NEVES, B.P.; BRITO, M.F. et al. Pregnancy rates of buffaloes (*Bubalus bubalis*) using cooled or frozen semen at fixed time artificial insemination (FTAI) - Preliminary results. In: XI CONGRESSO MUNDIAL DE BÚFALOS - Cartagena - Colômbia, *Med. Vet. y Zootec.*, Septiembre/Diciembre, 2016a.

ALTHOUSE, G.C. Sanitary procedures for the production of extended semen. *Reprod. Dom. Anim.*, v. 43, p.374-378, 2008.

AMANN, R.P., GRAHAM, J.K. Spermatozoal function. *Equine Reprod.*, p.715-745, 1993.

AMANN, R.P., HAMMERSTEDT, R.H. Validation of a system for computerized measurements of spermatozoal velocity and percentage of motile sperm. *Biol. Reprod.*, v.23, p.6478-645, 1980.

AMANN, R.P., KATZ, D.F. Reflections on CASA after 25 years. *J. Androl.*, v.25, n.3, p.317-325, 2004.

AMANN, R.P., PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Equine Vet. Sci.*, 1987.

AMIRAT, L.; TAINTURIER, D.; JEANNEAU, L. et al. Bull semen *in vitro* fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl<sup>®</sup>, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology*, New York, v.61, p.895-907, 2004.

ANDRABI, S.M.H. Factors affecting the quality of cryopreserved buffalo (*Bubalus bubalis*) bull Spermatozoa. *Reprod. Dom. Anim.*, v.44, p.552-569, 2009.

ANDRABI, S.M.H.; AHMAD, N.; ABBAS, A. et al. Effect of two different antibiotic combinations on fertility of frozen buffalo and Sahiwal bull semen. *Pak. Vet. J.*, v.21, p.166-169, 2001.

ANDRABI, S.M.H.; ANSARI, M.S.; ULLAH, N. et al. Duck egg yolk in extender improves the freezability of buffalo bull spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.*, v.104, p.427-433, 2008.

ANSARI, M.S.; RAKHA, B.A.; ULLAH, N. et al. Effect of L-cysteine in Tris-citric egg Yolk extender on post-thaw quality of Nili-Ravi buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Pak. J. Zool.*, v.43, n.1, p. 41-47, 2011.

AURICH, C. Recent advances in cooled-semen technology. *Anim. Reprod. Sci.*, v.107, p.268-275, 2008.

AURICH, C.; SEEBER, P.; MULLER-SCHLOSSER, F. Comparison of different extenders with defined protein composition for storage of stallion spermatozoa at 5 degrees C. *Reprod. Dom. Anim.*, v.42, n.4, p.445-448, 2007.

AWASTHI, M.K.; KAVANI, F.S.; SIDIQUEE, G.M. et al. Is slow follicular growth the cause of silent estrus in water buffaloes? *Anim. Reprod. Sci.*, v.99, p.258-268, 2007.

AWASTHI, M.K.; KHARE, A.; KAVANI, F.S. et al. Is one-wave follicular growth during the estrous cycle a usual phenomenon in water buffaloes (*Bubalus bubalis*)? *Anim. Reprod. Sci.*, v.92, n.3-4, p.241-253, 2006.

BAILEY, J.L.; BILODEAU, J.F.; CORMIER, N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *J. Androl.*, v.21, p.1-7, 2000.

BALIEIRO, K.R.C. Efeito de diluidores e das temperaturas de descongelamento sobre motilidade e integridade acrossômica de espermatozoides de búfalos Murrah (*Bubalus bubalis*, Linneus). 1993. 63f. Dissertação (Mestrado, Área de Concentração: Fisiopatologia da Reprodução e Inseminação Artificial) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

BALL, B.B.; VO, A.T.; BAUMBER, J. Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. *Am. J. Vet. Res.*, v.62, p.508-515, 2001.

BANNER, W.; KOCH, M.; CAPIN, D.M. et al. Experimental chelation therapy in chromium, lead, and boron intoxication with N-acetylcysteine and other compounds. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, v.83, p.142-147, 1986.

BARNABÉ, V.H.; BARUSELLI, P. S.; BARNABÉ, R.C. et al. Artificial insemination of buffaloes using two different diluents. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, IV, v.3, 1994, São Paulo. *Proceedings...* São Paulo, p.547-548, 1994.

BARNABÉ, V.H.; BARUSELLI, P.S.; BARNABÉ, R.C. et al. Inseminação artificial em bubalinos utilizando dois diferentes diluidores. *Proceedings...* 1º SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PESQUISA EM MEDICINA VETERINÁRIA, v.1, p.92, 1995.

BARTOLOMEU, C.C. Estudo da dinâmica folicular durante o tratamento com CIDR-B e Crestar visando a inseminação artificial em tempo fixo em fêmeas bubalinas (*Bubalus bubalis*). 2003. 149f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

BARTOLOMEU, C.C.; DEL REI, J.A.; MADUREIRA, E.H. et al. Inseminação artificial em tempo fixo com sincronização da ovulação em bubalinos utilizando-se CIDR-B, Crestar e Ovsynch. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.25, n.3, p.334-336, 2001.

BARUSELLI, P.S. Atividade ovariana e comportamento reprodutivo no período pós-parto em búfalos (*Bubalus bubalis*). 1992. 91f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

BARUSELLI, P.S. Manejo reprodutivo de bubalinos. 1993a. 46f. Monografia (Especialização) - Secretaria de Agricultura e Abastecimento, Instituto de Zootecnia, Nova Odesa, Registro, São Paulo.

BARUSELLI, P. S. Dinâmica folicular durante o ciclo estral e resposta superovulatória em fêmeas bubalinas (*Bubalus bubalis*). 1997. 96f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

BARUSELLI, P.S.; AMARAL, R.; BARUFI, F.B. et al. Lecirelin and Buserelin (Gonadotrophin releasing hormone agonists) are equally effective for fixed time insemination in buffalo. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v.38, p.142-145, 2001b.

BARUSELLI, P.S.; BERBER, R.C.A.; MADUREIRA, E.H. et al. Half dose of prostaglandin F<sub>2α</sub> is effective to induce luteolysis in the synchronization of ovulation protocol for fixed-time artificial insemination in buffalo (*Bubalus bubalis*). *Braz. J. Vet. Anim. Sci.*, v.40, p.397-402, 2003a.

BARUSELLI, P.S.; MADUREIRA, E.H.; MARQUES, M.O.; Programas de IA a tempo fixo em *Bos indicus* In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 4, 2001, Córdoba-AR, *Proceedings...* p.95-116, 2001a.

BARUSELLI, P.S., CARVALHO, N.A.T. Reproduction Management and artificial insemination in buffalo. In: I BUFFALO SYMPOSIUM OF AMERICAS, 1, 2002, Belém, PA. *Proceedings...* Belém, PA: BSA, p.119-143, 2002.

BARUSELLI, P.S.; CARVALHO, N.A.T.; GIMENES, L.U. et al. Fixed time artificial insemination in buffalo. *Ital. J. Anim. Sci.*, v.6, p.107-118, 2007.

BARUSELLI, P.S.; CARVALHO, N.A.T.; HENRIQUEZ, C.H.P. et al. Synchronization of ovulation for timed artificial insemination during the off breeding season in the buffalo. *Proceedings...* In: BUFFALO SYMPOSIUM OF AMERICAS, Belém, Brasil, p.418-420, 2002.

BARUSELLI, P.S.; CARVALHO, N.A.T.; HENRIQUEZ, C.E.P. et al. Use of progesterone associated to "Ovsynch" protocol for timed artificial insemination in buffalo (*Bubalus bubalis*). In: CONGRESSO NAZIONALE SULL'ALLEVAMENTO DEL BUFFALO, 2, 2003, Roma. *Proceedings...* CNAB, v.1, p.265-268, 2003b.

BARUSELLI, P.S.; CARVALHO, N.A.T.; JACOMINI, J.O. Eficiência uso da inseminação artificial em búfalos. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Suplemento, Belo Horizonte, n.6, p.104-110, dez., 2009.

BARUSELLI, P.S.; CARVALHO, N.A.T.; NICHI, M. et al. Reduction of hCG dosage in a protocol for synchronization of ovulation for timed artificial insemination during the off breeding season in buffalo. *Proceedings...*In: CONGRESSO NAZIONALE SULL'ALLEVAMENTO DEL BUFFALO, Roma, Italy, p.261-264, 2003.

- BARUSELLI, P.S.; CARVALHO, N.A.T.; NICHI, M. et al. Reduction of hCG dosage in a protocol for synchronization of ovulation for timed artificial insemination during the off breeding season in buffalo. In: CONGRESSO NAZIONALE SULL'ALLEVAMENTO DEL BUFFALO, 2, 2003, Roma. *Proceedings...* Roma: CNAB, v.1, p.261-264, 2003c.
- BARUSELLI, P.S.; GIMENES, L.U.; CARVALHO, N.A.T. et al. O estado atual da biotecnologia reprodutiva em bubalinos: Perspectiva de aplicação comercial. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.31, n.3, p.285-292, jul./set. 2007.
- BARUSELLI, P.S.; MADUREIRA, E.H.; BARNABE, V.H. et al. Estudo da dinâmica folicular em búfalas submetidas à sincronização da ovulação por inseminação artificial em tempo fixo. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*, v.27, p.210, 1999.
- BARUSELLI, P.S.; MUCCILOLO, R.G.; VISINTIN, J.A. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*, v.47, p.1531-1547, 1997.
- BARUSELLI, P.S.; SOARES, J.G.; GIMENES, L.U. et al. Control of buffalo follicular dynamics for artificial insemination, superovulation and *in vitro* embryo production. *Buffalo Bull.*, v.32 (Special Issue 1), p.160-176, 2013.
- BASIROV, E.B. The biology of reproduction and artificial insemination of buffaloes. *Proceedings...* of 5<sup>th</sup> International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, Trento, Italy. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, Milan, Italy, p.4-10, 1964.
- BATELLIER, F.; VIDAMENT, M.; FAUQUANT, J. et al. Advances in cooled semen technology. *Anim. Reprod. Sci.*, v.68, p. 181-190, 2001.
- BECCAGLIA, M.; ANASTASI, P.; CHIGIONI, S. TRIS-lecithin extender supplemented with antioxidant catalase for chilling of canine semen. *Reprod. Dom. Anim.*, v.44, Suppl.2, p.345-349, 2009a.
- BECCAGLIA, M.; ANASTASI, P.; LUVONI, G.C. Freezing of canine semen in an animal-free protein extender. *Vet. Res. Communications*, v.33 Suppl. 1, p.77-80, 2009b.
- BECERRA, V.A.B. Efeito da adição de *Aniba canelilla*, blueberry e polifenol de chá verde sobre a viabilidade *in vitro* de espermatozoides de búfalo (*Bubalus bubalis*) resfriados a 5°C. 2017. 69f. Dissertação (Mestrado) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- BEG, M.A, TOTEY, S.M. The oestrus cycle, behaviour and endocrinology of the estrous cycle in the buffalo (*Bubalus bubalis*). *Anim. Breed.*, Abstract, v.67, p.239-337, 1999.
- BERAN, J.; SIMONÍK, O.; RAJMON, R. et al. Effect of LDL addition into selected bull sperm diluters on resistance of spermatozoa against cold shock. *Acta Vet. Brno*, v.84, p.125-131, 2015.
- BERBER, R.C.A.; SILVA, M.A.; CARDOSO, M.J.L. Sincronização da ovulação utilizando protocolos Ovsynch em bovinos e bubalinos. Revisão. *Biosci. J.*, v.18, n.1, p.103-120, june, 2002.
- BERGERON, A.; BRINDLE, Y.; BLONDIN, P. et al. Milk caseins decrease the binding of the major bovine seminal plasma proteins to sperm and prevent lipid loss from the sperm membrane during sperm storage. *Biol. Reprod.*, v.77, p.120-126, 2007.
- BERGERON, A., MANJUNATH, P. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Mol. Reprod. Dev.*, v.73, p.1338-1344, 2006.

BERNARDES, O. Estimativa das características do rebanho bubalino brasileiro em 2016. 5p. Disponível em: file:///C:/Users/Usuario/AppData/Local/Temp/Estimativas\_2016.pdf

BERNARDES, O. Bubalinocultura no Brasil: situação e importância econômica. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.31, p.293-298, 2007.

BITTENCOURT, R.F.; RIBEIRO FILHO, A.D.L.; LIMA, M.C.C. et al. Efeito de um quelante de cálcio, um detergente e da lecitina de soja sobre a qualidade do sêmen caprino congelado-descongelado. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v.45, p.305-312, 2008.

BLACKMORE, P.F.; BEEBE, S.J.; DANFORTH, D.R. et al. Progesterone and 17 $\alpha$  hydroxyprogesterone: novel stimulators of calcium influx in human sperm. *J. Biol. Chem.*, v.265, p. 1376-1380, 1990.

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

BLANDAU, R. J. Gamete transport in the female mammal, In: Handbook of physiology, Sect. 7, Endocrinology, v.2, (chapter 38), 1973.

BÓ, G.A.; ADAMS, G.P.; MAPLETOFT, R.J. Dinâmica folicular ovárica em bovino. In: MADUREIRA, E.H.; BARUSELLI, P.S. Controle farmacológico do ciclo estral em ruminantes. São Paulo: *FUMVET*, p.12-34, 2000.

BORCHARDT, S.; SCHULLER, L.; WOLF, L. et al. Comparison of pregnancy outcomes using either an Ovsynch or a Cosynch protocol for the first timed AI with liquid or frozen semen in lactating dairy cows. *Theriogenology*, v.107, p.21-26, 2018.

BORGES, J. C. Efeito da utilização de antioxidante no diluidor para a criopreservação de sêmen bovino avaliado através de testes complementares, inseminação artificial e fecundação *in vitro*. Jaboticabal, 2008. 70f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

BORGES-SILVA, J.C.; SILVA, M.R.; MARINHO, D. B. et al. Cooled semen for fixed-time artificial insemination in beef cattle. *Reprod. Fertil. Dev.* v. 28 n.7, p.1004-1008, 2015

BORGES-SILVA, J.C.; SILVA, M.R.; RESENDE, O.A. et al. Sêmen bovino refrigerado e aumento de prenhez de vacas de corte submetidas à IATF. Embrapa, Corumbá, MS, *Circ. Téc.*, 114, 8p, 2017.

BOSTID - BOARD ON SCIENCE AND TECHNOLOGY FOR INTERNATIONAL DEVELOPMENT. The water buffalo: New prospects for an underutilized animal. *Nat. Acad. Press*, Washington. Retrieved on January, v.4, 119p. 1981.

BOUCHARD, G.F.; MORRIS, J.K.; SIKES, J.D. et al. Effect of storage temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoa motility. *Theriogenology*, v.34, p.147-157, 1990.

BOUSSEAU, S.; BRILLARD, P.; MARQUANT-LE GUIENNE, B. et al. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the *in vitro* and *in vivo* fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. *Theriogenology*, New York, v.50, p.699-706, 1998.

BREZEZINSKA-STEVBODZINSKA, F.; SLEBODZINSKI, A.B.; PRIETAS, B. et al. Antioxidant effect of vitamin E and glutathione on lipid peroxidation in boar semen plasma. 2005. 368p. *Biological Trace Element Research*, v.47, p.69-74, 1995. BRYMAN, A.; CRAMER, D. Quantitative data analysis with SPSS 12 and 13: a guide for social scientist. 1 Ed. USA: Routledge.

BRITO, L. A multilaboratory study on the variability of bovine semen analysis. *Theriogenology*, v.85, p.254-266, 2016.

BRITO, M. F. Uso de lipoproteínas de baixa densidade, extraídas da gema de ovo, para a criopreservação do sêmen de búfalos. 2014. 96f. Dissertação (Mestrado, Área de Concentração: Reprodução Animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, belo Horizonte.

BRITO, M.F.; NEVES, B.P.; ANDRADE, G.O. et al. Comparative analysis of three extenders for buffalo semen cryopreservation. *Anim. Reprod.*, v.12, n.1, p.262, Jan/Mar., 2015.

BUCHER, A.; KASIMANICKAM, R.; HALL, J.B.; DEJARNETTE, J.M. et al. Fixed-time AI pregnancy rate following insemination with frozen-thawed or fresh-extended semen in progesterone supplemented CO-Synch protocol in beef cows. *Theriogenology*. v.71, p.1180-1185, 2009.

CAMPANILE, G.; BARUSELLI, P.S.; NEGLIA, G. et al. Ovarian function in the buffalo and implications for embryo development and assisted reproduction. *Anim. Reprod. Sci.*. v.121, p.1-11, 2010.

CAMPANILE, G., NEGLIA, G. Embryonic mortality in buffalo cows. *Italian J. Anim. Sci.*, v.2, Supplement 2, p.119-129, 2007.

CAMPANILE, G.; NEGLIA, G.; GASPARRINI, B. et al. Embryonic mortality in buffaloes synchronized and mated by AI during the seasonal decline in reproductive function. *Theriogenology*, v.63, p.2334-2340, 2005.

CAMPANILE, G.; GASPARRINI, B.; VECCHIO, D. et al. Pregnancy rates following AI with sexed semen in Mediterranean Italian buffalo heifers (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*, v.76, n.3, p.500-506, 2011.

CAMPANILE, G.; VECCHIO, D.; NEGLIA, G. et al. Effect of season, late embryonic mortality and progesterone production on pregnancy rates in pluriparous buffaloes (*Bubalus bubalis*) after artificial insemination with sexed semen. *Theriogenology*, v.79, n.4, p.653-659, 2013.

CARVALHO, N.A.T.; BARUSELLI, P.S.; MADUREIRA, E.H. Control of ovulation subsequent to superstimulation of follicular growth in buffalo: fertilization and embryo recovery. *Theriogenology*. v.58, p.1641-1650, 2002.

CARVALHO, N.A.T.; SOARES, J.G.; SOUZA, D.C. et al. Ovulation synchronization with estradiol benzoate or GnRH in a timed artificial protocol in buffalo cows and heifers during the nonbreeding season. *Theriogenology*, v.87, p.333-338, 2017.

CARVALHO, N.A.T.; SOARES, J.G.; PORTO FILHO, R.M. et al. Equine chorionic gonadotropin improves the efficacy of a timed artificial insemination protocol in buffalo during the nonbreeding season. *Theriogenology*, v.79, n.3, p.423-428, 2013.

CARVALHO, F.M. Avaliação de diluidores à base de gema de ovo e de lecitina de soja para a congelação de sêmen de *Alouatta caraya*. 2012, 90f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CARVALHO, F.C.A. Análise estrutural e ultra-estrutural de folículos pré-antrais de fetos e de fêmeas bubalinas (*Bubalus bubalis*) em diferentes fases reprodutivas. 2005. 95f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu, SP.

CARVALHO, N.A.T.; BERNARDES, O.; BARUSELLI, P.S. Desestacionalização dos partos para a produção de leite de búfalas a pasto no centro sul do Brasil. *Pesq. Tecnol.*, v.8, p.1-5, 2011.

CARVALHO, N.A.T.; NAGASAKU, E.M.; VANNUCI, F.S. et al. Conception rate according intravaginal progesterone device and hCG or GnRH to induce ovulation in buffalo during the breeding season. *Ital. J. Anim. Sci.*, v.6, p.646-648, 2007.

CASTRO, S.R.S. Uso de antioxidantes para elevação do sêmen criopreservado de búfalos (*Bubalus bubalis*). 2010, 71f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural, Belém, PA.

CBRA - COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal. 3ª ed., Belo Horizonte: *CBRA*, 104p., 2013.

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. 186f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária - Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo.

CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C. et al. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. *Anim. Reprod. Sci.*, v.104, p.119-131, 2008.

CHACUR, M. G. M. Avaliação da congelação de sêmen bubalino com os diluidores Glicina-gema, Tryladil® e TES em diferentes tempos de equilíbrio. 1996. 116f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual - UNESP, Paulista, Botucatu, 1996.

CHACHUR, M. G. M., OBA, E., GONZALES, C. I. M. 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, V. L. (eds) *Proceedings...* In: 5<sup>th</sup> WORLD BUFFALO CONGRESS, Caserta, Italy. International Buffalo Federation, Roma, Italy, p.846-849, 1997.

CHATTERJEE, S., GAGNON, C. production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing and thawing. *Mol. Reprod. Dev.*, v.59, p.451-458, 2001.

CHAUDHARI, D.V.; DHAMI, A.J.; HADIYA, K.K. et al. Relative efficacy of egg yolk and soya milk-based extenders for cryopreservation (-196°C) of buffalo semen. *Vet. World*, v.8, february, 2015.

CHESHMEDJIEVA, S.B., DIMOV, V.N. Effect of freezing on phospholipid distribution of buffalo spermatozoa plasma membranes. In: Vale, W.G.; Barnabé, V.H.; Mattos, J.C.A., *Proceedings...* In: 4<sup>TH</sup> WORLD BUFFALO CONGRESS., São Paulo, Brazil. International Buffalo Federation, Roma, Italy, p. 519-521, 1994.

CLULOW, J.R.; MAXWELL, W.M.C.; EVANS, G. et al. A comparison of duck and chicken egg yolk for cryopreservation of stallion sperm. *Aust. Vet. J. (Equine)*, v.85, n.6, p.232-235, 2007.

CORREA, J.R., ZAVOS, P.M. The hypoosmotic swelling test: its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. *Theriogenology*, v.42, p.351-360, 1994.

COX, J.F.; ALFARO, V.; MONTENEGRO, V. et al. Computer-assisted analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm migration in cervical mucus. *Theriogenology*, v.66, p. 860-867, 2006.

CRESPILHO, A.M. Variáveis metodológicas na avaliação do movimento espermático. *Anais...In: 2ª REUNIÃO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ANDROLOGIA ANIMAL (ABRAA)*, EMBRAPA, Documentos 146, p.53-55, 2017.

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

CRESPILHO, A.M.; PAPA, F.O.; ALBERTI, K. et al. Eficiência comparativa entre dois diluidores para a congelação de sêmen bovino sobre os padrões de motilidade e integridade de membrana plasmática. *Ars Vet.*, v.22, n.3, p.229-235, 2006.

CRESPILHO, A.M.; PAPA, F.O.; SANTOS, M.P. et al. Use of cooled bull semen as a strategy to increase the pregnancy rate in fixed-time artificial insemination programs-Case report. *Am. J. Anim. Vet. Sci.*, v.7, n.4, p.175-179, 2012.

CRUDELI, G.A.; KONRAD, J. L.; PATIÑO, E. M. Reproducción em Búfalas. Situación de la bubalinocultura em países americanos. 1ªed., Ed. *Moglia Ediciones*, Corrientes, Argentina, v.1, p. 235-240, 2016.

CRUDELI, G.A.; PELLERANO, G.S.; OLAZARRI, M.J. et al. Efecto de diferentes variables sobre la preñez em búfalas sometidas a sincronización del celo e inseminación artificial a tempo fijo, *Rev. Vet.*, v.19, n.1, p.14-17, 2008.

DACHEUX, J.L; CASTELLA, S.; GATTI, J.L. et al. Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. *Theriogenology*, v.63, p.319-341, 2005.

DALGLEISH, D. Casein micelles as colloids: surface structures and stabilities. *J. Dairy Sci.*, v.81, p.3013-3018, 1998.

DALMAZZO, A. Utilização da lecitina de soja para a refrigeração e criopreservação do sêmen de cães. 2012, 103f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

DANELL, B. Oestrous behaviour, ovarian morphology and cyclical variation in follicular system and endocrine pattern in water buffalo heifers. 1987. 124f. Thesis (Doctorat) - Faculty of Veterinary Medicine, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden.

DAVIS, I.S.; BRATTON, R.W.; FOOTE, R.H. Livability of bovine spermatozoa at 5, - 25 and - 85°C in Tris-buffered and citrate-buffered yolk-glycerol. *J. Dairy Sci.*, v.46, p.333, 1963.

DAVIS, R.O., KATZ, D.F. Operational standards for CASA instruments. *J. Androl.*, v.14, p.385-395, 1993.

DELLEUW, F.E.; DELLEUW, A.M.; DENDAAS, J.H.G. et al. Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology*, v.30, n.1, p.32-44, 1993.



DEL REI, A.J.M.; GIGANTE, A.L; PINTO, P.A. Aspectos morfológicos do útero, cérvix e atividade ovariana de búfalo (*Bubalus bubalis*) primíparas e pluríparas após parto normal. In: II CONGRESSO BAIANO DE MEDICINA VETERINÁRIA. Salvador, *Anais...* p.102, 1991.

DEN DAAS, J.H.G., DE-JONG, L.M.T. E. The relationship between the number of spermatozoa inseminated and the reproductive efficiency of individual dairy bulls. *J. Dairy Sci.*, v.81, p.1714-1723, 1998.

DE PAZ, P.; ESTESO, M.C.; ALVAREZ, M. et al. Development of extender based on soybean lecithin for its application in liquid ram semen. *Theriogenology*, v.74, n.4, p.663-671, 2010.

DE RENSIS, F.; RONCI, G.; GUARNERI, P. et al. Conception rate after fixed time insemination following ovsynch protocol with and without progesterone supplementation in cyclic and noncyclic Mediterranean Italian buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*, v.63, p.1824-1831, 2005.

DE ROSA, G.; GRASSO, F.; BRAGHIERI, A. et al. Behavior and milk production of buffalo cows as affected by housing system. *J. Dairy Sci.*, v.2, p.907-912, 2009.

DHAMI, A.J.; JANI, V.R.; MOHAN, G. et al. Effect of extenders and additives on freezability, post-thaw thermoresistance and fertility of frozen Murrah buffalo semen under tropical climate. *Buffalo J.*, v.1, p.35-45, 1994.

DONG, Q.X.; RODENBURG, S.E.; HILL, D. et al. The role of low-density lipoprotein (LDL) and high-density lipoprotein (HDL) in comparison with whole egg yolk for sperm cryopreservation in rhesus monkeys. *Asian J. Androl.*, v.13, p.459-464, 2011.

DROBNIS, E.Z.; CROWE, L.M.; BERGER, T. et al. Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes a demonstration using sperm as a model. *J. Exp. Zool.*, v.265, n.4, p.432-437, 1993.

DROST, M. Bubaline versus bovine reproduction. *Theriogenology*, v.68, p.447-449, 2007.

DUARTE, F.; BLAYA, R.; TELÖKEN, P.E. et al. The effects of N-acetylcysteine on spermatogenesis and degree of testicular germ cell apoptosis in an experimental model of varicocele in rats. *Int. Urol. Nephrol.*, v.42, n.3, p.603-608, 2010.

DUNBAR, B.S.; AVERY, S.; LEE, V. et al. The mammalian zona pelucida: its biochemistry, immunochemistry, molecular biology, and developmental expression. *Reprod. Fert. Devel.*, v.6, cap.3, p.331-347, 1994.

EL-BADRY, D.A.; RAWASH, Z.M.; ABD ELAAL, M.B. et al. The Effect of LDL from Different Bird's Eggs on the Freezability of Buffalo Spermatozoa. *Glob. Vet.*, v.14, cap.2, p.158-165, 2015.

EL-SHARAWY, M.E.; EL-SHAMAA, I.S.; IBRAHIM, M.A.R. Effect of low density lipoproteins in extender on freezability and fertility of Egyptian buffalo bull semen. *Anim. Sci.*, v. LV, 2012.

EL-SHERBIENY, M.A. Impact of replacing egg yolk with lecithin on sperm characteristics, bacterial count and fertilizing ability of cryopreserved buffalo semen. *J. Anim. Poultry Prod.*, Mansoura University, v.5, n.6, p.353-364, 2014.

EL-SISY, G.A.; EL-NATTAT, W.S.; EL-SHESHTAWY, R.I. et al. Substitution of egg yolk with different concentrations of soybean lecithin in tris-based extender during bulls' semen preservability. *Asian Pac. J. Reprod.*, v.5, n.6, p.514-518, 2016.

- ENGLAND, G.C.W. Cryopreservation of dog semen: a review. *J. Reprod. Fertil.*, suppl. 47, p.243-255, 1993.
- ERICKSON, B.H. Development and radio-response of the prenatal bovine ovary. *J. Reprod. Fertil.*, v.10, p.97-105, 1966.
- EVANS, G., MAXWELL, W. Salanon's artificial insemination of sheep and goats, Butterworth, Sydney, p.194, 1987.
- EVANS, J.P., FLORMAN, H.M. The state of the union: the cell biology of fertilization. *Nat. Cell Biol.*, n.4 (Suppl.), p.57-63, 2002.
- 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.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2016. <http://faostat3.fao.org/download/Q/QA/>
- FARRELL, P.B.; FOOTE, R.H.; MCARDLE, M.M. Media and dilution procedures tested to minimize handling effects on human, rabbit, and bull sperm for computer-assisted sperm analysis (CASA). *J. Androl.*, v.17, p.293-300, 1996.
- FELÍCIO, G.B. Efeito da substituição da gema de ovo pela lecitina de soja na criopreservação de sêmen equino. 2008, 35f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.
- FERRAZ, M.L.; SÁ FILHO, M.F.; BATISTA, E.O.S. et al. Paradoxical effects of bovine somatotropin treatment on the ovarian follicular population and *in vitro* embryo production of lactating buffalo donors submitted to ovum pickup. *Anim. Reprod. Sci.*, v.154, n.1-7, 2015.
- FERREIRA, A.M. Reprodução da fêmea bovina: Fisiologia aplicada a problemas mais comuns (causas e tratamentos). Ciclo estral e ondas foliculares em bovinos. Cap. I, p.27-64, Ed. 1, Editar Editora Associada, Juiz de Fora, MG, 2010.
- FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev. Assoc. Méd. Bras.*, v.43, n.1, p.61-68, 1997.
- FIGUEIREDO, R.A.; BARROS, C.M.; PINHEIRO, O.L. et al. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. *Theriogenology*, v.47, p.1489-1505, 1997.
- FLESCHE, F.M., GADELLA, B.M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim. Biophys. Acta*, v.1469, p. 197-235, 2000.
- FLORMAN, H.M.; TOMBERS, R.M.; FIRST, N.L. et al. An adhesion-associated agonist from the zona pellucida activates G protein-promoted elevations in internal  $Ca^{2+}$  and pH that mediate mammalian sperm acrosomal exocytosis. *Dev. Biol.*, v.135, p.133-146, 1989.
- FOOTE, R.H.; BROCKETT, C.C.; KAPROTH, M.T. Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. *Anim. Reprod. Sci.*, v.71, p.13-23, 2002.
- FOROUZANFAR, M.; SHARAFI, M.; HOSSEINI, S.M. et al. *In vitro* comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology*, v.73, n.4, p.480-487, 2010.

FRITS, M.; FRESCH, F.M.; GADELLA, B.M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim. Biophys. Acta*, v.1469, p.197-235, 2000.

FRITSCH, M. Eficiência de dois diluidores e três tempos de equilíbrio na congelação de sêmen bubalino. 1994. 103p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Santa Maria.

FUKUI, Y.; KOHNO, H.; TOGARI, T. et al. Fertility after artificial insemination using a synthetic semen extender in sheep. *J. Reprod. Dev.*, v.54, p.286-289, 2008.

GADELLA, B.M.; MILLER, N.G.A.; COLENBRANDER, B. et al. Flow cytometric detection of transbilayer movement of fluorescent phospholipid analogues across the boar sperm plasma membrane: elimination of labeling artifacts. *Mol. Reprod. Dev.*, v.53, p.108-125, 1999.

GADELLA, B.M.; RATHI, R.; BROWERS, J.F.H.M. et al. Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. *Anim. Reprod. Sci.*, v.68, p.249-265, 2001.

GARCIA, A.R.; NAHÚM, B.S.; LOURENÇO JUNIOR, J.B. et al. Associação de medroxiprogesterona ao protocolo Ovsynch para inseminação artificial em tempo fixo de búfalas cíclicas (*Bubalus bubalis*) criadas na Amazônia Oriental. *Acta Amaz.*, v.38, p.369-378, 2008.

GARNER, D.L.; THOMAS, C.A.; GRAVANCE, C.G. et al. Seminal plasma addition attenuates the dilution effect in bovine sperm. *Theriogenology*, v.56, p.31-40, 2001.

GINTHER, O.J.; KNOPF, L.; KASTELIC, J.P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two or three follicular waves. *J. Reprod. Fertil.*, v.87, p.223-230, 1989.

GIL, M.A.; ALMIÑANA, C.; ROCA, J. et al. Boar semen variability and its effects on IVF efficiency. *Theriogenology*, v.70, p.1260-1268, 2008.

GILL, R.C.; GANGWAR, P.C.; KOONER, D. S. Studies on the oestrus behaviour in buffaloes. *Indian J. Anim. Sci.*, v.43, p.472-475, 1973.

GIL, J.; RODRIGUEZ-IRAZOQUI, M.; LUNDEHEIM, N. et al. Fertility of ram semen frozen in Bioexcell® and used for cervical artificial insemination. *Theriogenology*, v.59, n.5-6, p.1157-1170, 2003.

GIMENES, L.U.; CARVALHO, N.A.T.; SÁ FILHO, M.F. et al. Ultrasonographic and endocrine aspects of follicle deviation, and acquisition of ovulatory capacity in buffalo (*Bubalus bubalis*) heifers. *Anim. Reprod. Sci.*, v.123, n.3-4, p.175-179, 2011.

GONÇALVES, A.A.; CASTRO, S.R.S.; GARCIA, A.R. et al. 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: Editora, p.451, 2011.

GOOD, N.E.; WINGER, G.D.; WINTER, W. et al. Hydrogen ion buffers for biological research. *Biochemistry*, v.5, n.2, p.467-477, 1966.

GRAHAM, J.K. Response of spermatozoa to freezing. In: Techniques for handling and utilization of transported cooled and frozen equine spermatozoa, 1995, Fort Collins. *Proceedings...* Fort Collins: Colorado State University Fort Collins, p.83-89, 1995.

GRAHAM, J.K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. *Vet. Clin. North Am.: Equine Pract.*, v.12, n.1, p.131-147, 1996.

GUPTA, P.S.P.; NANDI, S.; RAVINDRANATHA, P.M. et al. Isolation of preantral follicles from buffalo ovaries. *Veterinary Research*, v.148, p.543-544, 2001.

HAFEZ, E.S.E., HAFEZ, B. Ciclos Reprodutivos: Bovinos e bubalinos. 7ª ed., São Paulo, Manole, p.158-171, 2004.

HAFEZ, E.S.E., HAFEZ, B. Reproduction in Farm Animals. 7ª ed. Philadelphia: Lippincott Williams e Williams, 500p, 2000.

HAFEZ, E.S.E. Oestrus and some related phenomena in the buffalo. *J. Agric. Sci.*, v.44, p.165-172, 1954.

HALLAP, T. Assessment of sperm attributes of frozen-thawed AI doses from Swedish and Estonian dairy bulls sires. 2005. 34p. Tese de doutorado (Divison of comparative Reproduction, Obstetrics and Udder Health) - Department of Clinical Sciences - Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala.

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

HAMMADEH, M.E.; GREINE, R.S.; ROSENBAUM, P. et al. Comparison between human sperm preservation medium and test-yolk buffer on protecting chromatin and morphology integrity of human spermatozoa in fertile and subfertile men after freeze-thawing procedure. *J. Androl.*, v.22, p.1012-1018, 2001.

HAMMADEH, M.E.A.L.; HASANI, S.; ROSENBAUM, P. et al. Reactive oxygen species, total antioxidant concentration of seminal plasma and their effect on sperm parameters and outcome of IVF/ICSI patients. *Arch. Gynecol. Obstet.*, v.277, n.6, p.515-526, 2008.

HARRISON, R.A.P., GADELLA, M.B. Membrane changes during capacitation with special reference to lipid architecture. In: Fénichel, P., Parinaud, J., editors, Human sperm acrosome reaction. Paris and Montrouge, France: *Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd.*, p.45-65, 1995.

HENRY, M.; BRITO, M.F.; NEVES, B.P. et al. Exame andrológico de bubalinos. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.41, n.1, p.188-194, jan./mar. 2017.

HENRY, M., ECHEVERRI, A.M.L. Andrologia Veterinária Básica: Criopreservação espermática, *EV/UFG*, Belo Horizonte, Brasil, cap.12, v.1, p.170-183, 2013.

HINSCH, E.; HINSCH, K.D.; BOEHM, J.G. et al. Functional parameters and fertilization success of bovine semen cryopreserved in egg-yolk free and egg-yolk containing extenders. *Reprod. Dom. Anim.*, Berlin, v.32, p.143-149, 1997.

HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage semen. *Anim. Reprod. Sci.* v.62, n.1-3, p.2-22, 2000.

HU, J.H.; JIANG, Z.L.; LV, R.K. et al. The advantages of low-density lipoproteins in the cryopreservation of bull semen. *Cryobiology*, n.62, p.83-87, 2011.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2013. <http://www.ibge.gov.br/home>, 2013.

IN VITRO Brasil, 2016. Disponível em: <http://invitrobrasil.com.br/fiv-bubalinos.php>.

IBRAHIM, R.A. Seasonal changes in sperm production of buffalo bulls. M.V.Sc Thesis, Cairo University, 1985.

IRITANI, A. Problems of freezing spermatozoa of different species. In: *Proceedings... In: 9<sup>TH</sup> INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION ARTIFICIAL INSEMINATION.*, Madrid, Spain. v.1, p.115-131, 1980.

IVANOV, P., ZACHARIEV, S.J. Biologisehe Eigeschaften und Wirtschaftlichkeir der Buffel in Bulgarien. *Z. Tierz, Zuchtungsbiol.*, v.74, p.340-360, 1960.

JAINUDEEN, M.R. Reproduction in water buffalo. In: Morrow, D.A. (ed.) *Current therapy in theriogenology: diagnosis, treatment and prevention of reproduction diseases in animals.* Philadelphia: Saunders, p.443-449, 1986.

JEYENDRAN, R.S.; VANDER-VEN, H.H.; PEREZ-PELAEZ, M. et al. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characters. *J. Reprod. Fertil.*, v.70, p.219-228, 1984.

JIANG, Z.; LI, Q.; LI, W. et al. Effect of low density lipoproteins on DNA integrity of freezing-thawing boar sperm by neutral comet assay. *Anim. Reprod. Sci.*, v.99, p.401-407, 2007.

KALLET, R.H.; JASMER, R.M.; LUCE, J.M. The treatment of acidosis in acute lung injury with Tris-Hydroxymethyl-Aminomethane (THAM). *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, v.161, p.1149-1153, 2000.

KAMONPATANA, M.; SCHAMS, D.; VAN DER WIEL, D.F.M. Problems of reproduction in famale swamp buffalo. In: Seminar sponsored by FAO/SIDA/Govt of India, 1978, Karnal, India. *Proceedings... In: BUFFALO REPRODUCTION AND AI.* Rome: FAO, p.226-234, 1979.

KAMPSCHMIDT, R.F.; MAYER, D.; TAND HERMAN, H.A. *J. Dairy Sci.*, v.36, p.733-742, 1953.

KANAI, Y., SHIMIZU, H. Characteristics of the estrous cycles the swamp buffalo under temperate conditions. *Theriogenology*, v.19, p.593-601, 1983.

KANKOFER, M.; KOLM, G.; AURICH, J. et al. Activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 5°C. *Theriogenology*, v.63, p.1354-1365, 2005.

KARDIVEL, 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.

KEITH, S. L. Evaluation of new cryoprotectants for the preservation of equine spermatozoa. 1998. 104f. Dissertation (Master of Science) - Colorado State University, Fort Collins.

KHLIFAOU, M. Equine semen freezing: three cryoprotectants interest: glutamine, low density lipoproteins from chicken egg yolk and carnitine. 2004. PhD. Thesis. University of Rennes.

KLINC, P.; FRESE, D.; OSMERS, H. et al. Insemination with sex sorted fresh bovine spermatozoa processed in the presence of antioxidative substances. *Reprod. Dom. Anim.*, v.42, n.1, p.58-62, 2007.

KMENTA, I.; STROHMAYER, C.; MULLER-SCHLOSSER, F. et al. Effects of a lecithin and catalase containing semen extender and a second dilution with different enhancing buffers on the quality of cold-stored canine spermatozoa. *Theriogenology*, v.75, n.6, p.1095-1103, 2011.

- KUMAR, A.; SOLANKI, V.S.; JINDAL, S.K. et al. Oocyte retrieval and histological studies of follicular population in buffalo ovaries. *Anim. Reprod. Sci.*, v.47, p.189-195, 1997.
- LE VAN TY, D. C.; CHUPIN, D.; DRIANCOURT, M. A. Ovarian follicular populations in buffaloes and cows. *Anim. Reprod. Sci.*, v.19, p.171-178, 1989.
- LIMA, L.F. Influência de sistemas de refrigeração sobre a qualidade do sêmen ovino criopreservado em palhetas. 2008. 53f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília.
- LIPAR, J.L.; KETTERSON, E.D.; NOLAN, V.Jr. et al. Egg yolk layers vary in the concentration of steroid hormones in two avian species. *Gen. Comp. Endocrinol.* v.115, p.220 -227, 1999.
- LIPINSKI, L.C.; KOZIEKI, L.E.; PIASECKI Jr, S.J. Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF) fora do período de reprodução em búfalos (*Bubalus bubalis*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, Goiânia, Goiás, v.16, p.092-365, 2005.
- LIU, D.Y.; CLARKE, G.N.; BAKER, W.G. Relationship between sperm motility assessed with the Hamilton-Thorn motility analyzer and fertilization rates *in vitro*. *J. Androl.*, v.12, p.231-239, 1991.
- LODHI, L.A.; ZUBAIR, M.; QURESHI, Z.I. et al. Correlation between hypo-osmotic swelling test and various conventional semen evaluation parameters in fresh Nili-Ravi buffalo and sahiwal cow bull semen. *Pak. Vet. J.*, v.28, n.4, p.186-188, 2008.
- LUSIGNAN, M.F.; BERGERON, A.; LAFLEUR, M. et al. The major proteins of bovine seminal plasma interact with caseins and whey proteins of milk extender. *Biol. Reprod.*, v.85, n.3, p. 457-464, 2011a.
- LUSIGNAN, M.F.; MANJUNATH, P.; LAFLEUR, M. Thermodynamics of the interaction between bovine binder of sperm BSP1 and low-density lipoprotein from hen's egg yolk. *Thermochim. Acta*, v.516, p. 88-90, 2011b.
- MANN, T., LUTWAK-MANN, C. Male Reproduction Function and Semen, Springer. Berlin, 1981.
- MADAN, M.L.; SINGLA, S.K.; JAIN, G.C. Ovulatory response to different superovulatory treatment amongst buffaloes (*Bubalus bubalis*). In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND AI, 11, 1992, Dublin. *Proceedings...* Dublin: ICAR, v.1, p.172, 1992.
- MADER, D.R., PRICE, E.O. Effect of sexual stimulation on the sexual performance of Hereford bulls. *J. Anim. Sci.*, v.59, p.294-300, 1984.
- MAIA, M.S. Viabilidade espermática e geração de metabólitos reativos do oxigênio (ROS) no sêmen ovino criopreservado em diluidor aditivado de lauril sulfato de sódio (OEP), trolox-c e catalase. 2006. 147f. Dissertação (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu.
- MALO, C.; GIL, L.; GONZALEZ, N. et al. Comparing sugar type supplementation for cryopreservation of boar semen in egg yolk based extender. *Cryobiology*, v.61, p.17-21, 2010.
- MANJUNATH, P. New insights into the understanding of the mechanism of sperm protection by extender components. *Anim. Reprod.*, v.9, n.4, p.809-815, 2012.
- MANJUNATH, P.; NAUC, V.; BERGERON, A. et al. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. *Biol. Reprod.*, v.67, p.1250-1258, 2002.

- MANN, T., LUTWAK-MANN, C. Male Reproductive Function and Semen. Themes and trends in physiology, biochemistry and investigative andrology. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York, 445p, 1981.
- MANN, T., WHITE, I.G. Metabolism of Glycerol, Sorbitol and Related Compounds by Spermatozoa. *Nature*, v.178, p.142, 1956.
- MANIK, R. S.; MADAN, M. L.; SINGLA, S. K. Ovarian follicular dynamics in water buffaloes (*Bubalus bubalis*): ultrasonically monitoring individual follicles for wave hypothesis. *Theriogenology*, v. 41, p.246, 1994.
- MANIK, R.S.; SINGLA, S.K.; PALTA, P. et al. Ovarian follicular dynamics monitored by real time ultrasonography during oestrus cycle in buffalo (*Bubalus bubalis*). *Asian-Australas. J. Anim. Sci.*, v.11, p.480-485, 1998.
- MARTI, E.; MARTI, J.I.; MUIÑO-BLANCO, T. et al. Effect of the cryopreservation process on the activity and immunolocalization of antioxidant enzymes in ram spermatozoa. *J. Androl.*, v.29, n.4, 2008.
- MASSOTI, N. Estudo de conservação e fecundação de sêmen de touros diluídos em soro de leite de soja. 1964. 57f. Tese (Livre-Docência em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga.
- MATOS, D.L.; ARAÚJO, A.A.; ROBERTO, I.G. et al. Análise computarizada de espermatozoides: revisão de literatura. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.32, p. 225-232, 2008.
- MAXWELL, W.M.C., SÁLANON, S. Liquid storage of ram semen: a review. *Reprod. Fertil. Dev.*, v.5, p.613-38, 1993.
- MAZUR, P. Equilibrium, quasi-equilibrium and nonequilibrium freezing of mammalian embryos. *Cell Biophys.*, v.17, p.53-92.1990.
- MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications, *Am. J. Physiol. Cell*, v.247, cap.3, p.125-142, 1984.
- MCDougall, S.; BURKE, C.R.; MACMILLAN, K.L. et al. The effect of pretreatment with progesterone on the oestrous response to oestradiol-17 $\beta$  benzoate in the postpartum dairy cow. *Proceedings...* In: NEW ZEALAND SOCIETY ANIMAL PRODUCTION, v.52, p.157-160, 1992.
- MCPHAIL, D.B., GOODMAN, B.A. Tris buffer - a case for caution in its use for cooper containing systems. *Biochem. J.*, v.221, p.559-560, 1984.
- MEDEIROS, C.M.O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A.T.D. et al. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology*, v.57, n.1, p.327-344, 2002.
- MEIRELLES, L.S.; MALSCHITSKY, E.; NEVES, A.P. et al. Leite em pó desnatado não inativado e leite desnatado UHT para preservação e fertilidade do sêmen equino resfriado. *Ciênc. Rural*, v.28, p.467-470, 1998.
- MELLO, C.M.; ZAHN, F.S.; MARTIN, I. et al. Influence of semen storage and cryoprotectant on post-thaw viability and fertility of stallion spermatozoa. *J. Equine Vet. Sci.*, v.27, n.4, p.171-175, 2007.
- MEYERS, S.A. Spermatozoa response to osmotic stress. *Anim. Reprod. Sci.*, v.89, p.57-64, 2005.

MIES FILHO, A. A tecnologia de sêmen I. Inseminação Artificial, Porto Alegre: Sulina, v.2, p.404-468, 1987.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA. Instrução Normativa nº 36, de 27 de outubro de 2015. Instituir requisitos sanitários mínimos para a produção e comercialização de sêmen bovino e bubalino no País. Diário Oficial, 2015.

MIRÓ, J.; TABERNER, E.; RIVERA, M. et al. Effects of dilution and centrifugation on the survival of spermatozoa and the structure of motile sperm cell subpopulations in refrigerated Catalanian donkey semen. *Theriogenology*, v.72, p.1017-1022, 2009.

MISKA, A.K.; PATEL, S.H.; JOSHI, B.V. et al. Buffalo semen characteristics and its freezability under Indian conditions. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 4, 1994, São Paulo. *Proceedings...* São Paulo: FAO/FINEP, p.156-171, 1994.

MOHRI, H.; MASAKI, J. Glycerokinase and its possible role in glycerol metabolism of Bull spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, v.14, p.179-194, 1967.

MONTEIRO, B.M. Eficiência reprodutiva de búfalas leiteiras submetidas a protocolos de IATF à base de P<sub>4</sub>/E<sub>2</sub> e eCG durante as estações reprodutivas favorável e desfavorável. 2015. 81f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

MONTEIRO, B.M.; SOUZA, D. C.; VASCONCELLOS, G.S.F.M. et al. Ovarian responses of dairy buffalo cows to timed artificial insemination protocol, using new or used progesterone devices, during the breeding season (autumn-winter). *Anim. Sci. J.*, v.87, p.13-20, 2016.

MOOSE, G.; CARVALHO, J.B.P.; SANTO DE CAMPOS, B.D.E. et al. Efeito de diferentes diluidores na congelação e pós-descongelação de sêmen bubalino, submetido ao teste de termorresistência. *Bol. Indúst. Anim.*, Nova Odessa, v.64, n.3, p. 233-239, 2007.

MORTIMER, S.T. Casa-Practical aspects. *J. Androl.*, p.515-524, 2000.

MOTIMER, S.T. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Hum. Reprod. Update*, v.3, n.5, p.403-439, 1997.

MOUSSA, M.; MARTINET, V.; TRIMECHE, A. et al. Low density lipoproteins: extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*, New York, v.57, p.1695-1706, 2002.

MOUSTACAS, V.S.; ZAFFALON, V.G.; LAGARES, M.A. et al. Natural, but not lyophilized, low density lipoproteins were an acceptable alternative to egg yolk for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology*, v.75, p.300-307, 2011.

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

MUINO, R.; FERNANDEZ, M.; PENA, A.I. Post-thaw survival and longevity of bull spermatozoa frozen with an egg yolk-based or two egg yolk-free extenders after an equilibration period of 18 h. *Reprod. Domest. Anim.*, Berlin, v.42, p.305-311, 2007.

MURUGAVEL, K.; ANTOINE, D.; RAJU, M. S. et al. The effect of addition of equine chorionic gonadotropin to a progesterone-based estrous synchronization protocol in buffaloes (*Bubalus bubalis*) under tropical conditions. *Theriogenology*, v.71, n.7, p.1120-1126, 2009.



- MURPHY, M.G.; ENRIGHT, W.J.; CROWE, M.A. et al. Effect of dietary intake on pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle in beef heifers. *J. Reprod. Fertil.*, v.92, p.333-338, 1991.
- NAHAS, G. *In vitro* and *in vivo* effects of amine buffers. Introductory remarks. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v.92, n.2, p.337-340, 1961.
- NAIR, S.J.; BRAR, A.S.; AHUJA, C.S. et al. A comparative study on lipid peroxidation, activities of antioxidant enzymes and viability of cattle and buffalo bull spermatozoa during storage at refrigeration temperature. *Anim. Reprod. Sci.*, v.96, p.21-29, 2006.
- NAPOLITANO, F.; C. PACELLI, P.; GRASSO, F. The behaviour and welfare of buffaloes (*Bubalus bubalis*) in modern dairy enterprises. *Anim.*, v.7, n.10, p.1704-1713, 2013.
- NASIR, M.I.; BERNARDS, M.A.; CHARPENTIER, P. A. Acetylation of soybean lecithin and identification of components for solubility in supercritical carbon dioxide. *J. Agric. Food Chem.*, v.55, n.5, p.1961-1969, 2007.
- NEGLIA, G.; GASPARRINI, B.; DI PALO, R. et al. Comparison of pregnancy rates with two estrus synchronization protocols in Italian Mediterranean Buffalo cows. *Theriogenology*, v.60, p.125-133, 2003.
- NEGLIA, G.; NATALE, A.; ESPOSITO, G. et al. Effect of prostaglandin F<sub>2</sub>? at the time of AI on progesterone levels and pregnancy rate in synchronized Italian Mediterranean buffaloes. *Theriogenology*, v.69, p.953-960, 2008.
- NEGLIA, G.; VECCHIO, D.; RUSSO, M. et al. Efficacy of PGF<sub>2</sub> $\alpha$  on pre-ovulatory follicle and corpus luteum blood flow. *Reprod. Domest. Anim.* v.47, cap.1, p.26-31, 2012.
- NEVES, B.P. O uso da vagina artificial interna para a coleta de sêmen de touros bubalinos (*Bubalus bubalis*) com diferentes experiências sexuais. 2015a. 52f. Dissertação (Mestrado, Área de Concentração: Reprodução Animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- NEVES, B.P.; BRITO, M.F.; ANDRADE, G.O. et al. Buffalo semen cryopreservation (*Bubalus bubalis*) using commercial extender containing low-density lipoproteins. *Anim. Reprod.*, v.12, n.1, p.187, Jan./Mar., 2015b.
- NOLAN, J.P.; MARGAGEE, S.F.; POSNER, R.G. Flow cytometric analysis of transmembrane phospholipid movement in bull sperm. *Biochem.*, v.28, cap.34, p.3907-3915, 1995.
- NORBERG, J.; ÁRNER, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thiredoxin system. *Free Radic. Biol. Med.*, v.31, p.1287-1312, 2001.
- OBA, E. Tópicos atualizados ligados à reprodução na espécie bubalina. In: Contribuição ao estudo dos bubalinos: período de 1972-2001: palestras. Botucatu, SP: FMVZ/UNESP, p.179-198, 2003.
- OBA, E.; FUCK, E.J.; BICUDO, S.D. Preliminary study on different mediums for deep freezing of buffalo semen. In: Vale W.G, Barnabé, V.H.; MATTOS, J.C.A. *Proceedings...* In: 4<sup>th</sup> WORLD BUFFALO CONGRESS, São Paulo, Brazil. International Buffalo Federation, Roma, Italy, p. 579-581, 1994.
- OBA, E.; FUCK, E.J.; BICUDO, S.D. et al. Estudo preliminar de diferentes meios para congelamento de sêmen de búfalo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, Belo Horizonte. *Anais...*Belo Horizonte: CBRA, p.337, 1993.

- OHASHI, O.M. Inseminação artificial em bubalinos. In: GONÇALVES, P.B.D. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. 2.ed. Roca, p.97-110, 2008.
- OHASHI, O.M.; CORDEIRO, M.S.; MIRANDA, M.S. Biotecnologia da reprodução aplicada a bubalinos. *Rev. Ciênc. Agrár.*, v.45, p.58-63, 2006.
- OHASHI, O.M.; COSTA ALMEIDA, N.N.; CORDEIRO, M.S. et al. Produção *in vitro* de embrião (PIVE) na espécie bubalina. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.41, n.1, p.195-200, jan./mar. 2017.
- OHASHI, O.M.; SANTOS, S.S.D.; MIRANDA, M.S. et al. Morfologia do sistema genital, distúrbio reprodutivo e manejo do macho bubalino (*Bubalus bubalis*). *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.35, p.88-94, 2011.
- OKSAY, T.; NAZIROGLU, M.; ERGÜN, O. et al. N-acetyl cysteine attenuates diazinon exposure-induced oxidative stress in rat testis. *Andrologia*, v.45, n.3, p171-177, 2013.
- OSMAN, R.A.; ANDRIA, M.I.; JONES, A.D. Steroids induced exocytosis: the human sperm acrosome reaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.160, p.828-833, 1986.
- PACE M. M., GRAHAM E. F. Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. *J. Anim. Sci.*, Savoy, v.39, p.1144-1149, 1974.
- PAGL, R.; AURICH, J.E.; MULLER-SCHLOSSER, F. et al. Comparison of an extender containing defined milk protein fractions with a skim milk-based extender for storage of equine semen at 5°C. *Theriogenology*, New York, v.66, p.1115-1122, 2006.
- PALTA, P.; CHAUHAN, M.S. Laboratory production of buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. *Reprod. Fertil. Dev.*, v.10, p.379-391, 1998.
- PANDEY, A.K.; DHALIWAL, G.S.; GHUMAN, S.P.S. et al. Impact of preovulatory follicle diameter on plasma estradiol, subsequent luteal profiles and conception rate in buffalo (*Bubalus bubalis*). *Anim. Reprod. Sci.*, v.123, n.3-4, p.169-174, 2011.
- PAPA, F.O.; FELÍCIO, G.B.; MELO-ONA, C. M. et al. Effect of substituting soybean lecithin for egg yolk in an extender used for the cryopreservation of stallion semen. *Anim. Reprod. Sci.*, v.121, p.71-72, 2010.
- PAPA, F.O.; FELÍCIO, G.B.; MELO-ONA, C.M. et al. Replacing egg yolk with soybean lecithin in the cryopreservation of stallion semen. *Anim. Reprod. Sci.*, v.129, n.1-2, p.73-77, 2011.
- PAPA, P.M.; MAZIERO, R.D.; GUASTI, P.N. et al. Effect of glycerol on the viability and fertility of cooled bovine semen. *Theriogenology*, v.83, n.8, p.107-113, 2015.
- PARKER, K.I.; ROBERTSON, D.M.; GROOME, N.P. et al. Plasm concentrations of inhibin a and follicle-stimulating hormone differ between cows with two or three waves of ovarian follicular development in a single estrous cycle. *Biol. Reprod.*, v.68, p.822-828, 2003.
- PARKS, J.E.; ARION, J.A.; FOOTE, R.H. Lipids of plasma membrane and outer acrosomal membrane from bovine spermatozoa. *Biol. Reprod.*, v.37, p.1249-1258, 1987.
- PATRAT, C.; SERRES, C.; JOUANNET, P. The acrosome reaction in human spermatozoa. *Biol. cell*, v.92, p.255-266, 2000.

- PELLERANO, G. et al. Fixed Artificial Insemination in Buffalo: Effects of diferente doses of Estradiol Cipionate in Ovsynch protocol. *Proceedings...* In: III CONGRESSO NAZIONALE SULL'ALLEVAMENTO DEL BUFFALO SYMPOSIUM OF EUROPE AND THE AMERICAS, Ottobre 12-15, v.1, p.221, 2005.
- PEREIRA, E.C.M. Produção de oócitos e embriões bubalinos: efeitos da época do ano e da adição de óleo essencial de *Lippia origanoides* na maturação *in vitro*. 2015, 140p. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, UNESP.
- PHILLIPS, P.; LARDY, A.L. A yolk-buffer pabulum for the preservation of bull semen. *J. Dairy Sci.*, v.23, n.5, p.399-404, 1940.
- PICANÇO, N.S. Uso da Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF) em Bubalinos criados em sistema de produção na várzea no Estado do Amapá. 2006. 125f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Centro Agropecuário, Universidade Federal do Pará - UFPA, Belém.
- POLGE, C.; SMITH, A.U.; PARKES, A.S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, v.164, p.666, 1949.
- PORTO-FILHO, R.M.; BARUSELLI, P.S.; MADUREIRA, E.H. Uso da radiotelemetria para detecção do estro em fêmeas búfalas: luteólise durante duas fases do ciclo estral, ultrassonografia da ovulação e perfis hormonais. *Bol. Med. Vet.*, v.1, p.13-32, 2005.
- PORTO FILHO, R.M.; CARVALHO, N.A.T.; VIEL JÚNIOR, J.O. et al. eCG dosage reduction in a protocol for synchronization of ovulation for timed artificial insemination during the off breeding season in buffalo. In: BUFFALO SYMPOSIUM OF AMÉRICAS, 2, 2004, Corrientes, Argentina. *Proceedings...* Corrientes: BSA, 2004. (CD-ROM).
- PORTO-FILHO, R.M.; GIMENES, L.U.; MONTEIRO, B.M. et al. Detection of estrous behavior in buffalo heifers by radiotelemetry following PGF<sub>2</sub> $\alpha$  administration during the early or late luteal phase. *Anim. Reprod. Sci.*, v.144, p. 90-94, 2014.
- PRABHU, S.S., BHATTACHARYA, P. Influence of factors affecting sex drive on semen production of buffaloes. I - Physiological state of the "teaser" cow. *Indian J. Vet. Sci. Anim. Husband.*, v.24, n.1, p.35-50, 1954.
- PRADYUMMA RAO, V.D.; BHAIM REDDY, D.; GOPALAKRISNA, T. Note on estrous cycle and time of ovulation in Murrah buffaloes. *Indian J. Anim. Sci.*, v.52, p.534-535, 1982.
- PRESICCE, G.A. Reproduction in the water Buffalo. *Reprod. Domest. Anim.*, v.42, Supplement 2, p.24-32, 2007.
- PRESICCE, G.A.; SENATORE, E.M.; BELLA, A. et al. Ovarian follicular dynamics and hormonal profiles in heifer and mixed-parity Mediterranean Italian buffaloes (*Bubalus bubalis*) following an estrus synchronization protocol. *Theriogenology*, v.61, p.1343-1355, 2004.
- PURDY, P.H., GRAHAM, J.K. Effect of adding cholesterol to bull sperm membranes on sperm capacitation, the acrosome reaction, and fertility. *Biol. Reprod.*, v.71, p.522-527, 2004.
- PURSLEY, J.R.; MEE, M.O.; WILTBANK, M.C. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF<sub>2</sub> $\alpha$  and GnRH. *Theriogenology*, v.44, p.915-923, 1995.

QUEIROZ, A.C.L. Sincronização do ciclo estral e inseminação artificial em tempo fixo em búfalas criadas em várzea no município de Santarém-Pará. 2003. 125f. Especialização (Especialização em Produção e Sanidade Animal) - Centro de Produção e Sanidade Animal, Universidade Federal Rural da Amazônia - UFRA.

RAIZADA, B.C.; SATTAR, A.; PANDEY, M.D. A comparative study of freezing buffalo semen in two dilutors. In: Acharya, R.M.; Lokeshwar, R.R.; Kumar, A.T. (eds), *Proceedings In: 2<sup>nd</sup> WORLD BUFFALO CONGRESS*, New Delhi, India. International Buffalo Federation, Roma, Italy, p.66-74, 1990.

RASUL, Z.; AHMAD, N.; ANZAR, M. Changes in motion characteristics, plasma membrane integrity, and acrosome, morphology during cryopreservation of buffalo spermatozoa. *J. Androl.*, v. 22, n.2, p.278-283, 2001.

RASUL, Z.; ANZAR, M.; JALALI, S. et al. Effect of buffering systems on post-thaw motion characteristics, plasma membrane integrity, and acrosome morphology of buffalo spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.*, v.59, p.31-41, 2000.

RATH, D.; TOPFER-PETERSEN, E.; MICHELMANN, H.W. et al. Zona pellucida characteristics and sperm-binding patterns of *in vivo* and *in vitro* produced porcine oocytes inseminated with differently prepared spermatozoa, *Theriogenology*, v.63, p.352-362, 2005.

REED, M.L.; EZEH, P.C.; HAMIC, A. et al. Soy lecithin replaces egg yolk for cryopreservation of human sperm without adversely affecting postthaw motility, morphology, sperm DNA integrity, or sperm binding to hyaluronate. *Fertil. Steril.*, v.92, n.5, p.1787-1790, 2009.

REHMAN, F.U.; QURESHI, M.S.; KHAN, R.U. Effect of soybean based extenders on sperm parameters of Holstein Friesian bull during liquid storage at 4°C. *Pak. J. Zool.*, v. 46, n.1, p.185-189, 2014.

REIS, A.N.; MIRANDA, M.S.S.; SILVA, L.K.X. et al. Avaliação comparativa entre os diluidores TES-TRIS e ACP-112<sup>®</sup> e a associação com o óleo da Sálva do Marajó (*Lippia origanoides*) na qualidade do sêmen bubalino criopreservado. *Semina: Ciênc. Agrár.*, Londrina, v.38, n.6, p.3613-3628, nov./dez. 2017.

RANAWAT, P.; KHANDUJA, K.L.; PATHAK, C.M. Resveratrol-an ingredient of red wine abrogates the reproductive capacity in male mice. *Andrologia*, p.1-9, 2013.

RESENDE, O.A., ALMEIDA, J. Efeito do método de conservação do sêmen (congelado vs. refrigerado) nas taxas de concepção de vacas Brahman inseminadas em tempo fixo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 20, 2013, Uberlândia, MG. *Anais...* Belo Horizonte: CBRA, 2013.

RIBEIRO, H.F.L.; LÁU, H.D.; SILVA, A.O.A. et al. Preliminary report on artificial insemination in buffaloes of the Amazon region, through imported semen. In: CONGRESSO MUNDIAL DOS CRIADORES DE BÚFALOS, 4, v.3, 1994, São Paulo. *Anais...* São Paulo: Associação Brasileira dos Criadores de Búfalos, p.591-593, 1994.

RIBEIRO, H.F.L.; PICANÇO, N.S.; ROLIM FILHO, S.T. et al. Eficiência da Inseminação Artificial em Tempo Fixo com progesterona intravaginal na taxa de prenhez em búfalas criadas em diferentes sistemas de produção na Amazônia. In: XIX REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, Rio de Janeiro, p.211, 2005.

RIBEIRO, H.F.L.; SOUSA, J.S.; SILVA, A.O.A. et al. Taxa de prenhez em búfalas inseminadas na época chuvosa e na época seca com diferentes protocolos de sincronização e diferentes doses de eCG. *Rev. Ciênc. Agrár.*, n.43, p.70-76, jun/jul., 2006.

RIBEIRO FILHO, A.L.; SILVA, R.G.D.; CHALHOUB, M. et al. Influência do escore sobre a taxa de prenhez em búfalas (*Bubalus bubalis*) submetidas a protocolo de sincronização de ovulação para inseminação artificial em tempo fixo. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.27, n.3, p.471-472, 2003.

RHODES, F.M.; BURKE, C.R.; CLARK, B.A. et al. Effect of treatment with progesterone and oestradiol benzoate on ovarian follicular turnover in postpartum anoestrous cows and cows which have resumed oestrous cycles. *Anim. Reprod. Sci.*, v.69, n.3-4, p.139-150, 2002.

RHODES, F.M.; DE'ATH, G.; ENTWITLÉ, K.W. Animal and temporal effects on ovarian follicular dynamics in Brahman heifers. *Anim. Reprod. Sci.*, Amsterdam, v.38, p.265-277, 1995.

RHODES, F.M.; MCDUGALL, S.; BURKE, C.R. et al. Treatment of cows with an extended postpartum anestrous interval. *J. Dairy Sci.*, v.86, n.6, p.1876-1894, 2003.

ROCA, J.; CARRIZOSA, J.A.; CAMPOS, I. et al. Viability and fertility of unwashed Murciano Granadina goat spermatozoa diluted in Tris-egg yolk extender and stored at 5°C. *Small Rum. Res.*, v.25, p.147-153, 1997.

ROCA, J.; HERNANDEZ, M.; CARVAJAL, G. et al. Factor influencing boar sperm cryosurvival. *J. Anim. Sci.*, v.84, p.2692-2699, 2006.

ROCHA, N.M.A. Taxa de gestação em éguas inseminadas com sêmen resfriado de jumentos, utilizando diluidor à base de leite UHT desnatado - gema de ovo com duas concentrações de glicose. 2012. 190f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; SARAIVA, F.; WALLGREN, M. et al. Boar spermatozoa in the oviduct. *Theriogenology*, v.63, p.514-535, 2005.

ROOF, D.J.; BOWLEY, S.; PRICE, L.L. et al. Comparison of two commercial extenders for cryopreservation of goat semen without sperm washing. *Theriogenology*, v.77, p.412-420, 2012.

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

ROSSI, P.; VECCHIO, D.; NEGLIA, G. Seasonal fluctuations in the response of Italian Mediterranean buffaloes to synchronization of ovulation and timed artificial insemination. *Theriogenology*, v.82, p.132-137, 2014.

ROTA, A.; PENZO, N.; VICENTI, L. Hypoosmotic swelling (HOS) as a screening assay of testing in vitro fertility of bovine spermatozoa. *Theriogenology*, v.53, p.1415-1420, 2000.

SÁLANON, S., MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.*, v.62, p.77-111, 2000.

SÁLANON, S.; MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Anim. Reprod. Sci.*, Amsterdam, v.38, p.1-36, 1995.

- SALIBA, W.; GIMENES, L.; DRUMOND, R. et al. Efficiency of OPU-IVEP-ET of Fresh and Vitrified Embryos in Buffaloes. *Buffalo Bull. Bangkok: Int. Buffalo Information Ctr.*, v.32, p.385-388, 2013.
- SALING, P.M., STOREY, B.T. Mouse gamete interactions during fertilization in vitro: chlortetracycline as a fluorescent probe for the mouse sperm acrosome reaction, *J. Cell Biolol.*, v.83, p.544-555, 1979.
- SALISBURY, G.H.; FULLER, H.K.; WILLET, E.L. Preservation of bovine spermatozoa in yolk citrate diluent and Field results from its use. *J. Dairy Sci.*, v.14, n.11, p.905-910, 1941.
- SALMANI, H.; TOWHIDI, A.; ZHANDI, M. et al. *In vitro* assessment of soybean lecithin and egg yolk based diluents for cryopreservation of goat semen. *Cryobiology*, v.68, p.276-280, 2014.
- SANSONE, G.; NASTRI, M.J.F.; FABBROCINI, A. Storage of buffalo (*Bubalis bubalis*) semen. *Anim. Reprod. Sci.*, v.62, p.55-76, 2000.
- SENATORE, E.M.; VERBERCKMOES, S.; PASCALE, M. et al. A deep utero-tubal semen deposition in Mediterranean Italian buffaloes using a new artificial insemination device. *Reprod. Fertil. Dev.*, v.16, p.133, 2004.
- SEREN, E., PARMEGGIANI, A. Oestrous cycle in buffalo, *Bubalus bubalis*. Supplement, v.4, p.21-28, 1997.
- SETTERGREN, I. The ovarian morphology in clinical bovine gonadal hypoplasia with some aspects of its endocrine relations. *Acta Vet. Scand.*, v.5, p.28-92, 1964.
- SEVERO, N.C. História ilustrada da inseminação artificial. São Paulo: Livre Expressão, 408p, 2013.
- SHAHBA, M.I.; EL-SHESHTAWY, R.I.; EL-AZAB, A.I. Freezability of buffalo semen by using tris extender supplemented with different concentrations of LDL. *J. Inn. Pharm. Biol. Sci.* v.3, n.1, p.194-197, 2016.
- SHAHVERDI, A.; RASTEGARNIA, A.; TOPRAGGALEH, R.T. Effect of extender and equilibration time on post thaw motility and chromatin structure of buffalo bulls spermatozoa. *Cell J.*, Tehran, v.16, n.3, p.279-288, 2014.
- SILVA, A.R. Criopreservação do sêmen canino diluído em Tris: Avaliação morfológica, funcional e de suas interações com oócitos homólogos. 2005. 165f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Fortaleza.
- SILVA, P.F.N., GADELLA, B.M. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*, v. 65, p. 958-978, 2005.
- SILVA, K.M.G; GAMBOA, S.C.; RODRIGUES, A.S. et al. Adição de piruvato de sódio e trolox ao diluidor utilizado para congelamento de sêmen de garanhões férteis e subférteis. *Ciênc. Rural*, v.38, n.8, p. 2271-2277, 2008.
- SILVA, R.G.D.; RIBEIRO FILHO, A.L.; CHALOUB, M. et al. Comparação entre dois protocolos de sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo em búfalas (*Bubalus bubalis*). *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Porto Seguro, v.27, n.3, p.467-468, 2003.
- SILVA, A.O.A.; MOTA, A.V.; RIBEIRO, H.F.L. 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, p.467-470, 2002.

SINGER, P.F.N., NICHOLSON, G.L. The fluid mosaic model of the structure of cells membranes. *Science*, v.175, p.720-731, 1972.

SINGH, B.; CHAND, D.; SINGH, P. et al. Effect of vitamin C addition in the diluents on the quality of deep frozen Murrah buffalo bull (*Bubalus bubalis*) semen. *Int. J. Anim. Sci.*, v.11, p.131-132, 1996.

SINGH, R.K.; KUMARESAN, A.; CHHILLAR, S. et al. Identification of suitable combinations of *in vitro* sperma-function test for the prediction of fertility in buffalo bull. *Theriogenology*, v.86, p.2263-2271, 2016.

SINGH, V.K.; SINGH, A.K.; KUMAR, K. et al. Development of soya milk extender for semen cryopreservation of Karan Fries (Cross breed cattle). *Cryo Letters*, v.34, n.1, p.52-61, 2013.

SINGH, A.K.; SINGH, V.K.; NARWADE, B.M. et al. Comparative quality assessment of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen chilled (5°C) in egg yolk- and soya milk-based extenders. *Reprod. Domest. Anim.*, v.47, p.596-600, 2012.

SINGH, G.; SINGH, G.B.; SHARMA, S.S. et al. Studies on oestrus symptoms of buffalo heifers. *Theriogenology*, v.21, n.6, p.849-858, 1984.

SINHA, M.P.; SINHA, A.K.; SINGH, B.K. et al. The effect of glutadione on the motility enzyme leakage and fertility of frozen goat semen. *Anim. Reprod. Sci.*, v.41, p.237-243, 1996.

SIQUEIRA, J.B.; LEAL, L.S.; OBA, E. Dinâmica folicular ovariana na espécie bubalina. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.33, n.3, p.139-148, jul./set. 2009.

SOLTAN, W. M.; EL-SIEFY, E. M.; ABD EL-RAZEK, I. M.; EL-SHAMA, I. S. Efficacy of using soybean milk-based semen extender for freezability of buck spermatozoa. *Journal of Agricultural Research*, v.42, n.4, p.131-143, 2016.

SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W.; GRAHAM, J.K. et al. Cooled and frozen stallion semen. Fort Collins: Colorado State University. *Anim. Reprod. Biotechnol. Lab.*, 80p. Bulletin, n.9, 1999.

SREENIVASULA, R.P.; PUSHPA, R.G.; SAINATH, S.B. et al. Protective effects of N-Acetylcysteine against arsenic-induced oxidative stress and reprotoxicity in male mice. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, v.25, p.247-253, 2011.

STEINBACH, J., FOOTE, R.H. Osmotic pressure and pH effects on survival of frozen bovine spermatozoa. *J. Dairy Sci.*, v.50, p.205, 1967.

STORNELLI, M.C.; TITTARELLI, C.M.; SAVIGNONE, C.A. et al. Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. *Analecta Vet.*, v.25, n.2, p.28-35, 2005.

SUGULLE, A.H.; BHUIYAN, M.M.U.; SHAMSUDDIN, M. Breeding soundness of bulls and the quality of their frozen semen used in cattle artificial insemination in Bangladesh. *Liv. Res. Rural Dev.*, v.18, n.54, 2006.

SURESH, K.P.; NANDI, S.; MONDAL, S. Factors affecting laboratory production of buffalo embryos: A meta-analysis. *Theriogenology*, v.72, p.978-985, 2009.

TANEJA, M.; ALI, A.; SINGH, G. Ovarium follicular dynamic in water buffalo. *Theriogenology*, v.46, p.121-130, 1996.

TARDIF, A.L.; FARREL, P.B.; TROUERN-TREND, V. et al. Computer-assisted sperm analysis for assessing initial semen quality and changes during storage at 5°C. *J. Dairy Sci.*, v.80, n.8, p.1606-12, 1997.

TARIG, A.A.; WAHID, H.; ROSNINA, Y. et al. Effect of different concentrations of soybean lecithin and virgin coconut oil in Tris-based extender on the quality of chilled and frozen-thawed bull semen. *Vet. World*, v.10, june, 2017.

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

TAYLOR, C.T. Antioxidants and reactive oxygen species in human fertility. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, v.10, p.189-198, 2001.

THACKER, D.L.; ALMQUIST, J. O. Diluters for bovine semen. I. Fertility and motility of bovine spermatozoa in boiled milk. *J. Dairy Sci.*, v.36, n.2, p.173-180, 1953.

THUN, R.; HURTADO, M.; JANETT, F. Comparison of Biociphos-Plus® and TRIS-egg yolk extender for cryopreservation of bull semen. *Theriogenology*, New York, v.57, p.1087-1094, 2002.

TOELIHERE, M.R. Beitrage zur Biologie und Pathologie der Fortpflanzung beim weiblichen Sumpfbueffel in Indonesien. 1977. 118f. Dissertation - Universitaet Giessen, Veterinaermedizin Fakultaet, Giessen.

TRIMECHE, A.; ANTON, M.; RENARD, P. et al. Quail egg yolk: a novel cryoprotectant for the freeze preservation of Poitou jackass sperm. *Cryobiology*, v.34, p.385-393, 1997.

TULI, R.K.; MEHAR, S.; MATHAROO, J.S. Effect of different equilibration times and extenders on deep freezing of buffalo semen. *Theriogenology*, v.16, p.99-104, 1981.

TULSIANI, D.R.P.; YOSHIDA-KOMIYA, H.; ARAKI, Y. Mammalian fertilization: A carbohydrate-mediated event. *Biol. Reprod.*, v.57, p.487-494, 1997.

VALE, W.G. Avances biotecnológicos em reprodução de búfalos. *Tecnol. Marcha*, v.24, n.5, Revista Especial, p.89-90, 2011.

VALE, W.G. et al. The use of hormones for ovulation synchronization in buffaloes in the breeding and off breeding season followed by a timed artificial insemination (TAI). *Proceedings...* In: 5<sup>th</sup> ASIAN BUFFALO CONGRESS ON SOCIAL ECONOMIC CONTRIBUTION OF BUFFALO TO RURAL AREAS. Nanning-China, april, 18-22, v.1, p.594, 2006.

VALE, W.G. Sperm cryopreservation. In: COURSE ON BIOTECHNOLOGY OF REPRODUCTION IN BUFFALOES, 3, 1997. Caserta. Anais...Caserta: *Bubalus bubalis - J. Buffalo Sci. Technol.*, suppl. 4, p.129-140, 1997.

VALE, W.G. Bubalinos: fisiologia e patologia da reprodução. Campinas: *Fundação Cargil*, 86p., 1988.

VALE, W.G. Zyklus, Dauer und Symptome der Brunst sowie Zeitpunkt der ovulation bei Wasserbueffelkuehen (*Bubalus bubalis*) auf der Marajó-Insel. 1983. 99f. Dissertation (Doutorado) - Tieraertztlichen Hochschule Hannover, Hannover.



VALE, W.G.; RIBEIRO, H.F.L. Características reprodutivas dos bubalinos: puberdade, ciclo estral, involução uterina e atividade ovariana no pós-parto. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.29, n.2, p.63-73, abril/jun. 2005.

VALE, W.G.; RIBEIRO, H.F.L.; SOUSA, J.S. et al. Inseminação artificial em búfalos (*Bubalus bubalis*) na região amazônica. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 19, Belém. *Anais...*, p.91, 1984.

VALE, W.G.; SILVA, A.O.A.; SOUSA, J.S. Arrested development of the mesonephric ducts in a Murrah buffalo bull. In: BUFFALO SYMPOSIUM OF AMERICAS, 1, 2002, Belém, PA, 2002. *Proceedings...* Belém: BSA, 2002.

VALE, W.G.; SOUSA, J.S.; OHASHI, O.M. et al. Reproductive efficiency of buffalo in the Amazon Valley. Satellite Meeting "Reproduction in Tropical Environments" In: 13<sup>th</sup> INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, Rockhampton-Australia, 26-28 June, p. 17, 1996.

VALE, W.G.; SOUSA, J.S.; RIBEIRO, H.F.L. Preparation of a "Teaser" buffalo bull for use in artificial programs. *Buffalo J.*, v.10, ed.1, p.75-79, 1994.

VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, A.M.; HARING, R.M.; KAALLANSBERGEN, L.M.T.E. et al. Fertility results using bovine semen cryopreserved with extenders based on egg yolk and soy bean extract. *Theriogenology*, New York, v.54, p.57-67, 2000.

VARELA JUNIOR, A.S.; CORCINI, C.D.; ULGUIM, R.R. et al. Effect of low density lipoprotein on the quality of cryopreserved dog semen. *Anim. Reprod. Sci.*, v.115, p.323-327, 2009.

VASCONCELOS, J.L.M.; SÁ FILHO, O.G. Não adianta produzirmos um bezerro por vaca por ano precisamos produzir um bezerro de qualidade/vaca/ano. *Beef Point - Dicas de Sucesso*, 05/07/2010.

VECCHIO, D.; NEGLIA, G.; DI PALO, R. et al. Is a delayed treatment with GnRH, hCG or progesterone beneficial for reducing embryonic mortality in buffaloes? *Reprod. Domest. Anim.*, v.45, n.4, p.614-618, 2010.

VECCHIO, D.; NEGLIA, G.; GASPARINE, B. et al. Corpus luteum development and function and relationship to pregnancy during the breeding season in the Mediterranean buffalo. *Theriogenology*, v.77, p.1811-1815, 2012.

VERA-MUNOZ, O.; AMIRAT-BRIAND, L.; DIAZ, T. et al. Effect of semen dilution to low-sperm number per dose on motility and functionality of cryopreserved bovine spermatozoa using low-density lipoproteins (LDL) extender: Comparison to Triladyl<sup>®</sup> and Bioxcell<sup>®</sup>. *Theriogenology*, v.71, p.895-900, 2009.

VERBERCKMOES, S.; SOOM, A.V.; DEWULF, J. et al. Comparison of three diluents for the storage of fresh bovine semen. *Theriogenology*, v.63, n.3, p.912-922, 2005.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.I.; OCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, v.57, p.149-179, 2002.

VIEIRA DE SA, F. O leite - Noções Gerais. In: As Vacas Leiteiras, 7<sup>a</sup> ed. Colégio Técnico Agrícola, Lisboa, 1990.

VISHWANATH, R. Artificial insemination: the state of the art. *Theriogenology*, v.59, p.571-584, 2003.

- VISHWANATH, R., SHANNON, P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Anim. Reprod. Sci.*, v.62, p. 23-53, 2000.
- WALL, R.J., FOOTE, R.H. Fertility of bull semen frozen and store in clarified egg yolk - Tris-glycerol extender. *J. Dairy Sci.*, Savoy, v.82, p.817- 821, 1999.
- WANG, P.C. The swamp buffalo and it improvement in the Peoples Republic of China. In: Seminar sponsored by FAO/SIDA/Govt of Índia, 1978, Karnal, Índia. *Proceedings...* In: BUFFALO REPRODUCTION AND AI. Rome: FAO, p.152-154, 1979.
- WANG, P.C.; WEI, L.C.; WU, H. A study on the oestrus and its related phenomena of the Naning buffalo cows. *Acta Vet. Zoot. Sin.*, v.8, p.151-156, 1965.
- WARRIACH, H.M., AHMAD, N. Follicular waves during the oestrous cycle in Nili-Ravi buffaloes undergoing spontaneous and PGF2 $\alpha$  - induced luteolysis. *Anim. Reprod. Sci.*, v.3-4, p.332-337, 2007.
- WASSARMAN, P.M. Mammalian fertilization: molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis, and fusion. *Cell*, v.96, p.175-183, 1999.
- WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci.*, v.60-61, p.481-492, 2000.
- WATSON, P.F. Recent development and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.*, v.7, p.871-891, 1995.
- WATSON, P.F., MARTIN, C. A. The influence of some fractions of egg yolk on the survival of ram spermatozoa at 5 degrees C. *Austral. J. Biol. Sci.*, v.238, p.145-152, 1975.
- WEITZE, K.F.; PETZOLDT, R. Preservation of semen. *Anim. Reprod. Sci.*, v.28, p.229-235, 1992.
- WIGGIN, H.B.; ALMQUIST, J.O. Combinations of glycerol percent, glycerol equilibrium time, and thawing rate upon freezability of bull spermatozoa in plastic straws. *J. Dairy Sci.*, v.58, n.3, p.416-419, 1974.
- WILMUT, I.; YOUNG, L.; DE SOUSA, P. et al. New opportunities in animal breeding and production: an introductory remark. *Anim. Reprod. Sci.*, v.60, p.5-14, 2000.
- YAMAUCHI, S.H.; NAKAMURA, S.; LAY, K.M. et al. Characteristics of Okinawan Native Agu pig sperm after addition of low density lipoprotein to freezing extender. *J. Reprod. Dev.*, v.55, p.558-565, 2009.
- YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: Knobil, E.; Neill, J.D. (Eds.), *The physiology of reproduction*, Raven Press, New York, v.2, p.189-317, 1994.
- YINDEE, M.; TECHAKUMPHU, M.; LOHACHIT, C. et al. Follicular dynamics and oestrous detection in Thai postpartum Swamp Buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Reprod. Domest. Anim.* v.46, p.91-96, 2011.
- YOSHIDA, M. Conservation of sperms: current status and new trends. *Anim. Reprod. Sci.*, v.60-61, p.349-355, 2000.
- ZHANG, S.S.; HU, J.H.; LI, Q.W. et al. The cryoprotective effects of soybean lecithin on boar spermatozoa quality. *African J. Biotechnol.*, v.8, n.22, p.6476-6480, 2009.

ZICARELLI, L. Considerazioni sull'allevamento buffalino. Salerno: Regionale Sviluppo Agricolo in Campania, 70p., 1990.

ZICARELLI, L., VALE, W. G. Patrones reproductivos estacionales y no estacionales en el búfalo doméstico. In: Berdugo, J.A.; VALE, W.G. (Ed.). Memorias del Curso Internacional de Reproducción Bufalina, 2002, Medellín, Colombia. Medellín: CATI, p.33-58, 2002.

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.

ZORZETTO, M.F.; MARTIN, I.; SANCLER-SILVA, Y.F.R. et al. Comparison of three different extenders on Murrah buffaloes (*Bubalus bubalis*) semen freezability. *Andrologia*, Feb. v.50, n.1, 2018.

# **Capítulo 1 - PARTICULARIDADES DO CONDICIONAMENTO DE TOUROS BUBALINOS EM COLETA DE SÊMEN COM VAGINA ARTIFICIAL CONVENCIONAL PARA USO EM ESTAÇÕES REPRODUTIVAS FAVORÁVEL E DESFAVORÁVEL**

\*J. Almeida<sup>1</sup>, M. F. Brito<sup>1</sup>, V. A. B. Becerra<sup>1</sup>, B. P. Neves<sup>1</sup>, P. A. Auler<sup>1</sup>, J. P. Hadad<sup>2</sup>, M. Henry<sup>3</sup> e-mail: [jacialmeida01@yahoo.com.br](mailto:jacialmeida01@yahoo.com.br)

<sup>1</sup> Escola de Veterinária - Universidade Federal de Minas Gerais - Belo Horizonte, MG

<sup>2</sup> Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária - Universidade Federal de Minas Gerais- Belo Horizonte, MG

<sup>3</sup> Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias - Escola de Veterinária - Universidade Federal de Minas Gerais- Belo Horizonte, MG.

## **RESUMO**

O objetivo deste estudo foi avaliar o comportamento sexual e as características de condicionamento de reprodutores bubalinos submetidos à coleta de sêmen com vagina artificial. Trinta touros foram avaliados durante as estações reprodutivas favoráveis (março a maio) e desfavoráveis (novembro e dezembro) em propriedade localizada no estado de Minas, Brasil (Latitude 20°41'45" Sul e Longitude 44°49'37" Oeste). Os reprodutores foram submetidos a doze sessões de coleta, com quinze minutos cada, entre os anos de 2014 e 2017, onde tinham seu comportamento observado e registrado perante uma fêmea em cio natural ou induzido. Os dados foram analisados de forma descritiva de acordo com o sucesso ou não na ejaculação, sendo utilizado uma série de parâmetros comportamentais (cheirar urina no solo, cheirar vulva, lambar vulva, reflexo de Flehmen, coçar a cabeça na fêmea, dar cabeçada na fêmea, apoiar o queixo na garupa da fêmea, contração peniana intermitente antes da monta, exposição do pênis e monta incompleta sem exposição do pênis). Foi realizada uma análise de regressão logística multinível utilizando as variáveis respostas e explicativas mencionadas anteriormente. Os resultados mostraram que quando manifestados mais de três parâmetros, aumentava-se em 9,0% a chance de obter um ejaculado, valor que se eleva para 28,2% quando são observados de sete a nove parâmetros manifestados pelos reprodutores. Essas observações permitem concluir que é possível condicionar touros maduros sexualmente para coleta de sêmen através de vagina artificial para uso em programas de inseminação artificial e inseminação artificial em tempo fixo.

**Palavras-chave:** Comportamento sexual, Coleta de sêmen, Manejo reprodutivo.

## **1. INTRODUÇÃO**

Na reprodução, o papel do touro é inquestionável, já que o touro pode se acasalar com várias fêmeas. Esta importância se multiplica com o uso inseminação artificial convencional ou da inseminação artificial em tempo fixo (IATF), quando para o sucesso a boa resistência à criopreservação se soma às características desejáveis de qualidade seminal. Em ambas as formas de fertilização a boa libido do reprodutor é necessária para aumentar o potencial de cobertura a campo, particularmente após programas de sincronização de estro, ou permitir a coleta de sêmen para a inseminação artificial.

Adicionalmente, tem-se a sazonalidade reprodutiva, característica fisiológica da espécie bubalina; a dificuldade de encontrar sêmen no mercado, em face aos relatos de touros bubalinos que mesmo condicionados à coleta com vagina artificial convencional em Centrais se tornaram resistentes ao serviço artificial ao longo do tempo (Prabhu e Bhattacharya, 1954; Bernardes, 2017 - comunicação pessoal), dificultando e tornando inviável economicamente a sua manutenção em centrais de congelamento de sêmen. Isto se deve, principalmente por dois

motivos: 1) durante a coleta de sêmen, os animais são estimulados sexualmente de tal forma que as atividades prematórias (cortejo e reconhecimento da fêmea em cio) podem ser ignoradas para produzir o número desejado de ejaculações, no menor tempo possível (Mader e Price, 1984) e 2), pelo fato de machos desta espécie não manterem uma regularidade de ejaculados com qualidade, que permitam o congelamento por várias semanas seguidas, havendo várias coletas alternadas de sêmen com e sem qualidade para o congelamento e mesmo interrupção nas ejaculações sem motivo aparente.

Outro problema é a falta de conhecimento comportamental dos touros bubalinos envolvidos no processo de manejo, coleta e congelamento do sêmen. É negligenciado o fator que o búfalo é mais sensível e receoso, quando comparado com touros bovinos, requerendo mais tempo para se acostumar com a mudança de ambiente, pessoal envolvido no manejo e trato, além de necessitarem um tempo maior para adquirir confiança na pessoa envolvida na coleta e responderem adequadamente as metodologias utilizadas.

Já no campo há dificuldade de utilizar a eletro-ejaculação em búfalos, devido a uma maior sensibilidade destes aos estímulos elétricos (Ohashi, 2008), podendo ocasionar acidentes, principalmente em animais adultos. Porém, em animais mais jovens tem-se obtido algum sucesso (Ohashi *et al.*, 2011).

Diante de tantas dificuldades, a busca por conhecimento e aprimoramento nas técnicas de condicionamento e coleta de sêmen em búfalos, são fatores que tornam a atividade ainda mais desafiadora, mas ao mesmo tempo motiva e estimula os técnicos e profissionais, que trabalham com esta espécie, a melhorarem e buscarem novas estratégias para solução desse problema.

Uma vasta literatura surgiu em torno do búfalo, mas ainda são escassos os estudos científicos adequados de seu comportamento social, particularmente em relação ao condicionamento para coleta de sêmen com vagina artificial. Este estudo pretende agregar conhecimento nesse campo e compará-lo com a literatura histórica. Para isto, foi realizada uma avaliação do condicionamento animal e a aplicação de técnicas de manejo e seus prováveis efeitos na eficiência de coleta de sêmen em búfalos, durante as estações reprodutivas favoráveis e desfavoráveis para os reprodutores criados em propriedade particular, como ferramenta para otimizar o uso do sêmen resfriado e congelado, em programas de inseminação artificial (IA) e inseminação artificial em tempo fixo (IATF).

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado na Fazenda Bom Destino, no município de Oliveira/MG, Brasil (Latitude 20°41'45" Sul e Longitude 44°49'37" Oeste). O estudo foi realizado após aprovação de todos os procedimentos pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (EV/UFMG), segundo o protocolo nº 368/2015.

Os touros foram avaliados em coleta de sêmen, durante os períodos reprodutivos favorável "PRF" (outono-inverno; maio a julho) e reprodutivo desfavorável "PRD" (primavera-verão; dezembro a fevereiro, Zicarelli, 2010). Foram utilizados 30 touros de uma propriedade particular, durante os anos de 2014 a 2017, sendo utilizados 10 touros no ano de 2014 durante o PRD (novembro a dezembro), e para o PRF (março a maio) nos anos de 2015, 2016 e 2017 (9, 5 e 6 touros, respectivamente). Porém, 6 dos touros estiveram presentes em mais de um período de avaliação. Os touros apresentavam as seguintes características: idades entre 3 e 11 anos; peso de 620 a 1200 kg; ECC de 3,0 a 5 (1-5); das raças Murrah (n=21), Mediterrâneo (n=4) e Mestiços (n=5); criados em sistema extensivo e com experiência sexual com fêmeas. Estes touros foram previamente submetidos à avaliação clínica e andrológica de acordo com CBRA

(2013), posteriormente apresentados para uma fêmea em cio natural ou induzido com estrógeno e/ou prostaglandina, contida em tronco específico para coleta, na parte da manhã e tarde.

O tempo mínimo de 15 minutos foi estipulado para que o animal executasse a cópula (Vale, 2011). Também foi criada uma tabela, onde se anotavam os tipos e números de sinais manifestados pelos reprodutores (cheirar urina no solo, cheirar vulva, lambar vulva, reflexo de Flehmen, coçar a cabeça na fêmea, dar cabeçada na fêmea, apoiar o queixo na garupa da fêmea, contração peniana intermitente antes da monta, exposição do pênis e monta incompleta sem exposição do pênis) apresentados pelo animal durante o período de avaliação estipulado.

A coleta foi realizada com vagina artificial, com temperatura interna entre 42-45°C (Sansone *et al.*, 2000; Ohashi *et al.*, 2011; Vale, 2011). Acoplados a vagina foram utilizados copos coletores (tubos plásticos 15 mL), graduados e estéreis, previamente aquecidos e protegidos com uma camisa isotérmica, para evitar contato com os raios ultravioleta (UV) e as mudanças bruscas de temperatura que pudessem afetar o sêmen. Para cada coleta foi induzida uma falsa monta na primeira tentativa (sem coleta de sêmen, com intuito de aumentar a concentração espermática do ejaculado), sendo o ejaculado da segunda monta coletado e direcionado para o laboratório, colocado em banho-maria a 37°C, para as análises.

Para a análise estatística, a variável resposta (dependente ejaculou ou não) foi criada a partir de que se no momento de observação o touro conseguiu ou não ejacular, seja no solo ou ejaculação na vagina artificial. Já a variável explicativa (independente 9 fatores) foi criada a partir do número de eventos manifestados pelos touros nas observações durante as coletas de sêmen.

A variável explicativa foi definida em três categorias, a primeira é se o touro realizou entre zero e três parâmetros, sendo esta categoria a categoria de referência; a segunda categoria se o touro realizou entre quatro e seis parâmetros e a terceira se o touro realizou sete a nove dos parâmetros.

Neste contexto foi realizada uma análise de regressão logística multinível utilizando as variáveis respostas e explicativas descritas acima, sendo estas controladas pelo touro, a variância do touro foi controlada como uma variável aleatória e testada segundo o teste de Wald. Os touros (n=30) tiveram 12 momentos de acompanhamento, sendo realizado um modelo com todas as observações (Dohoo *et al.*, 2010).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As frequências médias dos eventos relacionados ao comportamento sexual de 30 touros bubalinos, observadas durante o período reprodutivo favorável e período reprodutivo desfavorável, foram estudadas em uma propriedade particular (Tabela 5), durante quatro anos (2014-2017). Assim como, as características físicas e morfológicas dos ejaculados *in natura* de cada touro e correlações entre os parâmetros de comportamento sexual, estão apresentados nas Tabelas 6 e 7.

Os resultados descritos nas Tabelas 5, 6 e 7, são provenientes de um período reprodutivo desfavorável (2014) e três períodos reprodutivos favoráveis (2015 a 2017), totalizando doze sessões de coleta para cada touro com vagina artificial, durante um tempo de até 15 minutos de tolerância por animal. Este tempo foi determinado devido ao macho bubalino ser considerado de mais baixa libido que os touros da espécie bovina (Vale *et al.*, 2008), demandando maior tempo para realizar os saltos e conseqüentemente as cópulas. Segundo Nikam *et al.* (2005), esse fato é atribuído a uma menor circulação de andrógenos. Portanto o tempo de reação do macho bubalino pode ser um pouco mais longo que aquele observado no bovino, em torno de 10 a 15 minutos (Vale, 2011). No entanto, touros já condicionados à coleta

com vagina artificial, necessitam apenas 1,9 minutos para realizarem o salto e terem seu sêmen coletado (Henry *et al.*, 2017a). Foi verificado ainda, que o tempo de reação dos touros, parece não ser influenciado pelas estações (Dixit *et al.*, 1984; Singh *et al.*, 2001 e Samo *et al.*, 2005).

Dentre os 30 touros avaliados, maior número de touros eram pertencentes a raça Murrah com 21 animais. Todos os animais possuíam mais de 3 anos de idade, considerados sexualmente maduros (Fischer e Bodhipaksha, 1992; Gordon, 1996 e Henry *et al.*, 2017b), com ECC acima de 3 e peso médio de 745,3 kg. Os animais apresentavam boas condições de nutrição e desenvolvimento ponderal, todos os touros possuíam experiência sexual à campo.

Para a CE foi obtido valor médio de 34,7 cm, sendo que todos os animais apresentaram CE acima do valor mínimo 30 cm para animais com mais de três anos (Henry *et al.*, 2017b) e 32 cm (CBRA, 2013), estando desta forma aptos a serem utilizados em reprodução, quando utilizado o parâmetro CE para a seleção de reprodutores. No entanto, apesar de importante, somente este parâmetro não garante que o touro possa ser utilizado como reprodutor. Dessa forma as características físicas e morfológicas do sêmen são de suma importância para a recomendação e liberação de um búfalo para a reprodução.

Na Tabela 5 verifica-se que apenas os seis primeiros e dois últimos touros da relação atingiram os valores mínimos de qualidade seminal (turbilhão, motilidade e vigor) recomendados pelo CBRA (2013) e que permitiriam sua liberação para a monta à campo. No entanto, é necessário fazer uma ressalva, de que todos esses animais estavam em lotes de vacas e realizando coberturas. Podendo, desta forma, justificar uma menor qualidade do sêmen de alguns touros, em função de uma exaustão sexual devido a um elevada relação touro:vacas verificada em alguns lotes (chegando em alguns casos a 1:100).

Entretanto, fica o alerta, de que muitas vezes, animais com boas características fenotípicas e ponderais, às vezes não apresentam características espermáticas suficientes para serem alocados junto com as fêmeas em reprodução. Nesta propriedade em particular, exames ginecológicos por palpação retal nos anos de 2014 (novembro), 2015 (fevereiro), 2016 (março) e 2017 (abril) diagnosticaram elevados percentuais de búfalas não gestantes [45,6% (230/504), 41,7% (148/355), 47,8% (215/450) e 30,4% (157/517), respectivamente], após as fêmeas terem passado toda as estações reprodutivas com touros. Diante desta constatação, fica o alerta da importância de se realizarem exames andrológicos nos reprodutores antes do início da estação reprodutiva.

Na média geral dos parâmetros espermáticos para os touros avaliados (Tabela 5) é possível verificar que o volume, a motilidade, a concentração e percentual de espermatozoides normais estão acima dos valores recomendados pelo CBRA (2013) para a espécie bubalina, sendo encontrados valores médios de 2,1 mL, 71,5%, 575,3x10<sup>6</sup>sptz/mL e 77,2%, respectivamente.

Porém, ejaculados com maiores volumes (3-4 mL) foram encontrados por Koonjaenak e Rodriguez-Martinez (2007), Sajjad *et al.* (2007) em ejaculados da raça Nili-Ravi. Em estudo recente Zorzetto *et al.* (2016), relataram ter obtido um volume de 3,6 a 4,5 mL em touros da raça Murrah. Esses resultados condizem com os resultados obtidos nesse estudo, em que touros de 3 a 11 anos apresentaram volumes médios de 2,1 mL, como citado acima. Porém, são inferiores aos 4 a 8 mL que geralmente são obtidos em touros adultos, plenamente maduros (Vale, 2011 e Ohashi *et al.*, 2011).

Tabela 5 - Biometria testicular e ponderal, e características físicas e morfológicas do sêmen de búfalos (30 animais) coletados durante o condicionamento com vagina artificial por até 15 minutos (12 sessões/animal), valores referentes ao melhor ejaculado obtido de cada touro.

Touros	Parâmetros												
	Raça	Idade (anos)	ECC (1-5)	Peso (kg)	CE (cm)	Aspecto	Volume (mL)	Turbilhão (0-5)	Motilidade (%)	Vigor (0-5)	Concentração (x10 <sup>6</sup> /mL)	DM (%)	N (%)
1	MUR	9	4	900	40	leitoso	2,9	3	90	4	780	9	80
2	MUR	8	4	920	38	cremoso	3,5	3	85	3	1960	10	80
3	MUR	6	3	740	37	cremoso	3,2	4	95	5	1440	7	85
4	MUR	6	4	650	32,5	leitoso	4,0	3	80	4	660	11	83
5	Mest.	6	4	870	37,5	leitoso	3,5	4	90	5	1220	4	90
6	MED	11	3	750	40	aquoso	3,0	3	90	5	1195	7	85
7	Mest.	9	3	890	39	aquoso	2,1	2	60	2	315	17	65
8	MUR	9	4	840	38	aquoso	1,1	2	50	1	125	21	65
9	MUR	4	5	1200	34	leitoso	2,1	3	70	2	360	10	80
10	MUR	3	3	700	33	aquoso	1,4	1	60	2	165	12	75
11	Mest.	4	3	650	35	-	-	-	-	-	-	-	-
12	MUR	4	4	720	34	aquoso	2,3	2	60	1	135	16	70
13	MUR	6	4	790	35	aquoso	1,1	3	70	2	315	11	85
14	MUR	4	4	680	34	leitoso	0,8	2	60	1	280	19	75
15	MUR	4	3	700	35	aquoso	1,1	1	70	2	330	10	80
16	MUR	11	3	820	36	leitoso	2,2	3	70	2	470	9	80
17	MED	3	3	580	32	aquoso	1,4	1	60	1	115	13	75
18	MED	3	4	620	33	aquoso	0,5	0	50	1	85	13	70
19	Mest.	5	4	650	35	leitoso	1,2	1	50	2	225	16	65
20	MUR	4	3	715	34	-	-	-	-	-	-	-	-
21	MUR	4	4	550	32	leitoso	1,5	2	70	2	500	10	75
22	MUR	4	3	600	31	aquoso	2,0	3	70	2	490	11	70
23	MUR	5	4	750	30	leitoso	2,1	4	80	4	900	8	85
24	MUR	4	3	720	33	aquoso	1,9	3	70	3	850	9	80
25	MED	3	3	630	32	leitoso	2,0	3	90	3	565	7	82
26	Mest.	4	4	660	33	-	-	-	-	-	-	-	-
27	MUR	5	4	715	34	aquoso	3,3	3	85	3	490	9	81
28	MUR	4	5	835	36	aquoso	1,5	3	75	2	398	10	79
29	MUR	5	4	735	35	leitoso	2,7	2	60	2	496	12	65
30	MUR	4	3	780	34	leitoso	3,6	4	70	3	668	9	79
<b>X±DV</b>	-	<b>5,4±2,3</b>	<b>3,6±0,6</b>	<b>745,3±129,4</b>	<b>34,7±2,3</b>	-	<b>2,1±1,0</b>	<b>2,5±1,1</b>	<b>71,5±13,4</b>	<b>2,6±1,3</b>	<b>575,3±449,0</b>	<b>11,1±3,9</b>	<b>77,2±7,1</b>

ECC: escore de condição corporal; CE: circunferência escrotal; DM: defeitos maiores; N: normais; MUR: Murrah; MED: Mediterrâneo; Mest.: Mestiço; X: média e DV: Desvio padrão.



Tabela 6 - Frequências médias dos eventos relacionados ao comportamento sexual de touros bubalinos (n=30), durante condicionamento para coletas de sêmen com vagina artificial por até 15 minutos (12 sessões/animal), nas estações reprodutivas favoráveis (outono e inverno) e desfavoráveis (primavera e verão) de 2014 a 2017.

Parâmetros	Número de tentativas (%/n)									Acumulado (%/N)			X/DV
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1-3	1-6	1-9	
Cheirar urina no solo	49,2/63	58,0/100	34,4/125	16,7/18	-	-	-	-	-	43,1/360	44,1/360	-	1,3±0,9
Cheirar vulva	100,0/5	69,1/55	47,8/138	25,0/92	20,0/15	100,0/1	-	-	-	35,6/360	44,1/360	-	1,3±0,9
Lamber vulva	100,0/4	92,0/25	61,1/72	39,6/91	29,9/77	13,8/29	12,5/8	-	-	23,2/360	43,8/360	44,1/360	2,2±0,9
Reflexo de Flehmen	100,0/11	56,6/113	37,1/140	18,4/38	33,3/3	100,0/1	-	-	-	41,5/360	44,1/360	-	2,2±0,8
Coçar a cabeça na ♀	68,6/67	40,2/102	41,6/89	24,4/41	20,0/5	0,0/1	0,0/1	-	-	40,5/360	44,1/360	-	1,4±0,9
Dar cabeçada na ♀	53,9/117	42,9/105	33,3/72	30,0/10	0,0/1	0,0/1	-	-	-	43,1/360	44,1/360	-	0,9±0,8
Apoiar o queixo na ♀	46,3/149	50,5/49	25,0/52	40,0/5	100,0/1	-	-	-	-	43,1/360	44,1/360	-	0,7±0,9
Contração peniana	83,3/10	100,0/3	92,3/13	91,2/34	72,6/51	46,8/47	31,6/38	14,7/34	8,0/20	8,2/360	37,6/360	44,1/360	0,8±0,9
Exposição do pênis	59,1/132	41,8/110	19,6/56	0,0/7	0,0/1	-	-	-	-	44,1/360	-	-	0,7±1,8
M. inc. s/exp. do pênis	57,7/156	36,5/96	20,0/50	0,0/3	0,0/1	-	-	-	-	44,1/360	-	-	1,3±0,9

% = percentagem das tentativas com ejaculação; n = número de tentativas; ♀ = fêmea; M.inc. s/exp. do pênis = Monta incompleta sem exposição do pênis e p<0,05). .

Tabela 7 - Coeficientes de correlações lineares fenotípicas entre as características de comportamento sexual em touros bubalinos (n=30), adultos, submetidos a coleta de sêmen com vagina artificial durante as estações reprodutivas favoráveis (outono e inverno) e estações reprodutivas desfavoráveis (primavera e verão) entre os anos de 2014 e 2017.

<b>Parâmetros</b>	<b>Cheirar urina no solo</b>	<b>Cheirar vulva</b>	<b>Lamber vulva</b>	<b>Reflexo de Flehmen</b>	<b>Coçar a cabeça na ♀</b>	<b>Dar cabeçada na ♀</b>	<b>Apoiar o queixo na ♀</b>	<b>Contração peniana</b>	<b>Exposição do pênis</b>
<b>Cheirar vulva</b>	0,3291839 <sup>ns</sup>								
<b>Lamber vulva</b>	0,9706328 <sup>***</sup>	0,4980601 <sup>ns</sup>							
<b>Reflexo de Flehmen</b>	0,3445921 <sup>ns</sup>	0,9640989 <sup>**</sup>	0,4067813 <sup>ns</sup>						
<b>Coçar a cabeça na ♀</b>	0,7629877 <sup>ns</sup>	0,215457 <sup>ns</sup>	0,9427476 <sup>**</sup>	0,1425599 <sup>ns</sup>					
<b>Dar cabeçada na ♀</b>	0,7725079 <sup>ns</sup>	0,263288 <sup>ns</sup>	0,9434002 <sup>**</sup>	0,0991088 <sup>ns</sup>	0,8444553 <sup>*</sup>				
<b>Apoiar o queixo na ♀</b>	0,1594234 <sup>ns</sup>	-0,5929301 <sup>ns</sup>	0,315879 <sup>ns</sup>	-0,4454725 <sup>ns</sup>	-0,4506901 <sup>ns</sup>	-0,7391352 <sup>ns</sup>			
<b>Contração peniana</b>	0,7699267 <sup>*</sup>	0,5358988 <sup>ns</sup>	0,8460538 <sup>**</sup>	0,471928 <sup>ns</sup>	0,8037585 <sup>**</sup>	0,8037663 <sup>**</sup>	0,6634858 <sup>*</sup>		
<b>Exposição do pênis</b>	0,8847054 <sup>ns</sup>	0,5508588 <sup>ns</sup>	0,9516336 <sup>***</sup>	0,465555 <sup>ns</sup>	0,931495 <sup>*</sup>	0,9724389 <sup>*</sup>	-0,3291481 <sup>ns</sup>	0,5859942 <sup>*</sup>	
<b>Monta incompl. s/exp. pênis</b>	0,844991 <sup>ns</sup>	0,5545297 <sup>ns</sup>	0,9439896 <sup>***</sup>	0,4747785 <sup>ns</sup>	0,9569032 <sup>**</sup>	0,9753304 <sup>*</sup>	-0,3461315 <sup>ns</sup>	0,5790225 <sup>ns</sup>	0,9888312 <sup>**</sup>

<sup>ns</sup> = Não significativo; \* = baixa correlação (p<0,05); \*\* = moderada correlação (p<0,01); \*\*\* = alta correlação (p<0,001) e ♀ = fêmea.

Já para os parâmetros de turbilhão e vigor e defeitos maiores, os valores médios encontrados (2,5, 2,6 e 11,1%, respectivamente) estão abaixo do recomendado pelo CBRA (2013). No entanto, estes valores baixos podem refletir apenas o momento da coleta.

Provavelmente vários desses touros, que não atingiram os parâmetros mínimos de qualidade seminal, poderiam fazê-lo, se fosse ofertado mais tempo para demonstrar (>15 minutos para a interação com a fêmea), haja vista que os animais foram avaliados em 12 sessões de tentativas de coletas num intervalo de no máximo 45 dias, alguns animais expostos a esse ambiente atípico e na presença humana, provavelmente demandariam maior tempo para adquirir confiança e realizar os saltos e ejaculações. Provavelmente uma mudança de alimentação, um descanso sexual, reduzir o número de fêmeas por touro, já que na propriedade foram observados touro com até 100 fêmeas por lote. Mas também há animais que provavelmente seriam retirados da reprodução, se um exame andrológico detalhado tivesse sido realizado antes do início da estação de monta. Com isto, provavelmente o percentual de vacas vazias ao final da estação reprodutiva seria bem menor que o reportado.

Quanto aos defeitos maiores, observou-se, nesse estudo, um predomínio de cauda fortemente dobrada ou enrolada, seguido dos defeitos de contorno anormal. Os defeitos menores mais encontrados foram de cauda dobrada ou enrolada e cauda enrolada na porção terminal. Esses resultados contradizem Saeed *et al.* (1990), que relataram em touros da raça Murrah, maior incidência de patologias na cabeça do espermatozoide (5,8%), enquanto que as anormalidades de peça intermediária foram menores que 1%. Esses mesmos autores relataram que o aparecimento de gota citoplasmática foi inferior a 1%, valor similar ao do presente estudo. No entanto, Zorzetto *et al.* (2016), relataram que dentre os defeitos menores a gota citoplasmática distal foi o segundo maior defeito encontrado. Isso pode ter ocorrido caso a idade, tratamento, protocolos, número de colheitas de sêmen e manejo usados pelos autores, sejam diferentes do utilizado no presente estudo, influenciando as alterações diferentes nos espermatozoides dos búfalos. Porém, ambos os trabalhos apresentam percentagens de defeitos morfológicos espermáticos dentro da faixa da normalidade recomendada pelo CBRA (2013) que é < 30%.

O aspecto cremoso foi o que apresentou maior concentração espermática 1960 e 1440x10<sup>6</sup>sptz/mL, seguida pelo aspecto leitoso. Entretanto, metade dos touros que ejacularam 50% (11/22) apresentaram ejaculados com aspecto aquoso. Os resultados para maior concentração obtidas de dois touros para o aspecto cremoso, diferem dos citados por Hafez e Hafez (2004), que reportaram ser a maior concentração de espermatozoides apresentada para o aspecto leitoso.

Os valores médios de concentração espermática encontrados nesse estudo 575,3x10<sup>6</sup>sptz/mL, são similares aos 524,3x10<sup>6</sup>sptz/mL relatados para a raça Murrah criados na Índia (Kumar *et al.*, 1993) e aos reportados por Rattan (1990) na raça Nili-Ravi e Koonjaenak e Rodriguez (2007). Porém, inferiores aos 1166,3x10<sup>6</sup>sptz/mL reportados por Aguiar *et al.* (1994), em estudo realizado na Bahia.

Ainda há necessidade de pesquisas para conhecer melhor o comportamento dos touros e desvendar as causas que os impedem de ejacular, pois Dixit *et al.* (1984), em um estudo realizado na Índia, já reportava uma taxa 34% de insucessos na tentativa de coleta seminal sem qualquer causa aparente. Passados mais de três décadas, e mesmo tendo-se aumentado o conhecimento de fisiologia, adaptabilidade e manejo dos búfalos, as causas que levam os reprodutores a não ejacular contínuam obscuras. Assim, o porquê de animais já condicionados e ejaculando com regularidade também deixarem de produzir sêmen com frequência e qualidade e em alguns casos não retornam mais a coleta nas centrais, continua um enigma.

Um ponto positivo dentre os animais avaliados é que todas as raças e mestiços tiveram representantes em ambas as categorias de animais que atenderam os requisitos de qualidade seminal recomendados pelo CBRA (2013), ficando evidente que estão adaptadas a região onde foram realizadas as avaliações reprodutivas dos touros bubalinos.

As frequências médias dos eventos relacionados ao comportamento sexual dos touros durante as avaliações frente a uma fêmea em cio contida em tronco para coleta de sêmen com vagina artificial estão sumarizadas na Tabela 6.

Nas primeiras tentativas de coleta de sêmen, quando os touros eram apresentados as fêmeas em cio, houve maior número de atos de cheirar urina e/ou lambar a vulva e reflexo de Flehmen, que diminuiu com o passar do tempo, a medida que o animal foi exposto várias vezes à fêmea em cio. Sugerindo que inicialmente, o touro identifica o *status* reprodutivo da fêmea por meio desses três eventos. No entanto, quando vários touros eram expostos as tentativas de coleta sequencialmente e urinavam próximo a fêmea durante o cortejo sexual, ocasionava um tempo maior de identificação do resíduo de urina no chão pelos touros que eram apresentados a fêmea na sequência. Isto em parte fez com que os animais demandassem um tempo maior para realizar os saltos e tentativas de cópula.

Outros recursos para testar a receptividade da fêmea foram as tentativas de monta e montas incompletas, no entanto, realizadas em menor intensidade. Isto talvez se deva ao fato dos búfalos serem mais desconfiados e gastarem um tempo maior para o salto na presença de humanos e mesmo pelo fato da fêmea estar contida em tronco.

Observou-se também que os touros realizaram serviços completos, durante todo os horários testados (manhã e tarde e noite), no entanto, a maioria dos animais responderam melhor nas primeiras horas da manhã, sendo este o horário eleito para a realização das tentativas de coleta. Durante os horários mais quentes do dia, os animais tiveram menor interesse em saltar e realizar os serviços completos, indicando possivelmente, sentirem mais os efeitos das altas temperaturas e comportamento de poupar energia.

Outra explicação para o maior interesse dos machos em identificar e saltar nas fêmeas nas primeiras horas do dia, se deve ao hábito de realizarem com maior frequência neste horário, estando presente com as fêmeas nos piquetes pela manhã quando os animais são manejados para o curral de ordenha. Os machos já procuram identificar as fêmeas receptivas e muitas vezes realizam a cópula antes mesmo de chegar ao curral, durante o percurso, reduzindo em alguns casos o interesse em saltar quando já presentes próximo ao curral de ordenha e na presença humana.

Dentre os 30 touros avaliados durante os PRF e PRD, apenas três animais não ejacularam em nenhuma das 12 sessões de coleta a que foram submetidos. Em contrapartida, dos dois touros que estiveram presentes em todos os anos de coleta, um acabou sendo condicionado a coleta com vagina artificial, chegando mesmo a realizar o salto e ejacular quando exposto à fêmea que não estava em cio. Isto ocorreu já no segundo ano de avaliações, indicando que os animais podem ser condicionados mesmo sendo manejados depois de adultos. No presente experimento, não foi verificada diferença na qualidade semeinal dos touros entre as estações avaliadas (período reprodutivo favorável e desfavorável).

No presente estudo houve alta correlação ( $P < 0,01$ ) dos parâmetros lambar vulvar com cheirar urina no solo, exposição do pênis com lambar vulva e monta incompleta sem exposição do pênis com lambar vulva (Tabela 7). Uma surpresa, foi verificar que a característica apoiar o queixo na fêmea, não teve nenhuma significância ( $P > 0,05$ ), com os parâmetros para os quais foi correlacionado e analisado.

Sing *et al.* (2015) reportaram que essas relações de comportamento sexual juntamente com a qualidade do sêmen têm grande significado para prever a qualidade e a fertilidade dos touros. Assim quando utilizados mais de três parâmetros associados a coleta de sêmen com vagina artificial, já se verifica um aumento de 9,0% na chance de obter um ejaculado. Percentual superior (28,2%) quando se observa entre sete e nove parâmetros por animal durante a coleta com vagina artificial (Tabela 7). Essas observações indicam que as características de comportamento sexual são dependentes.

Tabela 8 - Logística final mista para variáveis associadas com a coleta de sêmen de 30 touros bubalinos em 12 sessões (n=360) entre os anos de 2014 e 2017.

Variável	Odds ratio	EP	P
<b>0-2 parâmetros</b>	<b>1</b>	<b>Classe de referência</b>	
3 a 6 parâmetros	9,0	1,8	0,07
> 6 parâmetros	28,2	2,7	0,00
Variância entre touros	1,2	-	-

Odds ratio = chance de ocorrer.

Em relação às variáveis entre os parâmetros mencionados que estão associados a probabilidade de haver ejaculação, aumentou em 1,2 pontos a chance de se obter um ejaculado quando passamos de até seis parâmetros avaliados para sete a nove (Tabela 8), demonstrando uma relação de quantidade-resposta.

Segundo Ahmad *et al.* (1985) o comportamento sexual dos touros bubalinos foi estudado para estabelecer índices de seleção com o intuito de verificar problemas de infertilidade relacionados à libido. No passado os andrologistas adotaram diferentes critérios como sistemas de pontuação, tempo de reação, testes de exaustão, testes de depleção e capacidade de atendimento para a avaliação do comportamento sexual dos reprodutores bubalinos (Yassen *et al.*, 1974; Wierzbowski *et al.*, 1980). No entanto, com as mudanças ocorridas no sistema de manejo e criação dos búfalos (passando de extensiva para semi-confinamento e confinamento em menor escala), ocasionou algumas mudanças no comportamento dos animais, principalmente pelo fato de os reprodutores ficarem contidos em piquetes, baias e mesmo preso por cordas (Anzar *et al.*, 1993). Desta forma certos comportamentos sexuais foram modificados (sejam no tempo para execução ou mesmo o tipo de comportamento e sua intensidade de repetições).

O desempenho sexual geral de 30 touros búbalinos está demonstrado na Tabela 9, onde é possível observar que o número de ejaculados é superior ao número de saltos efetuados pelos touros. Isto ocorreu porque, alguns touros ejacularam sem realizar o salto sobre a fêmea, esses animais estavam tão excitados que iniciaram as contrações penianas e ejacularam antes mesmo de ensaiarem a monta.

Tabela 9 - Desempenjo sexual geral de touros bubalinos (n=30) em 12 sessões de coleta (n=360) durante os anos de 2014 a 2017.

Touros (n)	Ejaculação (%/n)		Saltos (%/n)	
	Tentativas bem-sucedidas	Tentativas mau-sucedidas	Tentativas efetuadas	Tentativas recusadas
24	57,3(165)	42,7(123)	50,4(145)	49,7(143)

n = número; % = percentual; Touros = 30 e Total de sessões de coleta = 360 .

Anzar *et al.* (1993) relataram ter coletado sêmen de 44 touros bubalinos da raça Nili-Ravi no Paquistão, sendo observado que o desempenho sexual geral dos animais foi o seguinte: tentativas bem-sucedidas de ejaculação, 70,7%; recusas a subir, 13,6%; recusas a ejacular, 12,0% e tentativas inúteis, 3,7%. No entanto, apesar dos resultados obtidos pelo grupo do Paquistão serem melhores do que aqueles reportados no presente estudo, não é possível fazer maiores especulações, devido a se tratar de um outro Continente (Asiático), raça diferente e por já terem se passados mais de duas décadas da realização deste estudo, o que provavelmente não repetiria os mesmos resultados se o estudo fosse repetido nos dias atuais .

Os touros bubalinos pertencentes as raças Murrah, Mediterrâneo e os mestiços entre estas duas raças não apresentaram diferenças em relação ao comportamento sexual e volume de sêmen produzido (p>0,05). No entanto, foi observado que os touros mais senis, dispndiam menos tempo com o cortejo e ejaculavam em um menor tempo quando na presença de uma fêmea no ápice do cio.

Após algumas exposições dos touros à fêmea em cio, observou-se que os animais perdiam o medo da presença humana e sentiam-se mais seguros para realizar o cortejo e os saltos, gastando menos tempo para realizar as ejaculações.

Não foram avaliadas as correlações entre idade, peso corporal e circunferência escrotal, uma vez que todos os animais possuíam idade, peso corporal, ECC e CE superiores a 3, 550 kg, 3 e 32 cm, respectivamente. Sendo todos considerados maduros sexualmente e ainda por estarem na mesma propriedade e sob as mesmas condições de manejo e alimentação.

Búfalos são considerados animais sociais, de comportamento gregário, no qual cada indivíduo pode ter seu comportamento modificado fortemente pela presença de outro indivíduo da mesma espécie e sexo ou mesmo espécie diferente (humana). Na bubalinocultura, o sistema adotado para produção de leite altera a estrutura social, pois a composição dos lotes é feita com animais de diferentes idades, produção e categorias (primíparas e múltíparas), além da mudança constante dos animais entre lotes (de acordo com a produção de leite), o que causa um estresse exacerbado.

No caso específico dos reprodutores, estes muitas vezes encontram-se em uma relação muito superior de touro/vaca ao recomendado para a espécie, chegando em algumas situações a relação touro/vaca de 1:100 ou mais de acordo com a formação dos lotes de ordenha. Situação esta, que muitas vezes exige demais do reprodutor, pois se houver 5 ou mais fêmeas em cio no mesmo dia este animal pode ter sua reserva espermática esgotada e não fertilizar as demais fêmeas que manifestarem cios nos dias subsequentes, ou pior, o reprodutor ter preferência por uma ou outra fêmea e cobrir estas repetidas vezes e não demonstrar interesse em copular com outras que possam também estar em cio.

Segundo Baruselli *et al.* (1993), em um sistema de monta natural comum nas criações extensivas de búfalos, deve-se respeitar a proporção touro/vaca, que é de 1 touro:15 a 25 vacas (animais jovens: 2 anos); 1 touro:25 a 35 vacas (3 anos); 1 touro:35 a 45 vacas (4 anos); 1 touro:45 a 60 vacas (animais adultos: > 5 anos). Mas estes valores podem ser superiores se o reprodutor tiver passado por um exame andrológico completo (com teste de libido), tendo sêmen de alta qualidade, ser de alto valor zootécnico e dependendo do ambiente onde se encontra (piquetes planos, boa alimentação, água *ad libitum*, sombra ou local para banho, etc.).

Os touros adultos geralmente não toleram outro reprodutor no mesmo lote, entretanto, touros jovens ou touros adultos que foram criados juntos e que nunca foram separados convivem sem brigas, desde que não sejam afastados nem mesmo por motivos de cobertura por alguns dias e mesmos horas. Caso isto ocorra, quando são reagrupados ao lote haverá briga.

É importante salientar que animais aspasdos (com chifres), são mais agressivos e dificultam o manejo com outro touro mocho. Além disso, há probabilidade de aumentarem as contusões e/ou lesões que comprometam a integridade física do animal (Menke *et al.*, 1999), como também impeçam o manejo para coleta de sêmen nos dias subsequentes. Isto se deve a traumas internos e estresse gerado com as brigas entre os mesmos.

Os machos bubalinos pós-argolados e cabrestiadados, permitem contenção a poucos metros um do outro, possibilitando desta forma o manejo de vários animais na mesma propriedade em uma pequena área para programas de reprodução com monta controlada. Mas esta situação não pode ser extrapolada para animais adultos (erados), e que venham de outras propriedades, pois neste caso, a simples visualização entre eles já é uma provocação, o que acaba resultando em rompimento de cordas ou laceração da mufla onde está fixada a argola de contenção, levando a grandes brigas e quiçá, não separado a tempo, até a morte de um e em casos mais extremos dos dois animais.

Quando os animais são apresentados a fêmeas em cio natural, respondem melhor do que quando apresentados a fêmeas com o cio induzido. Isto talvez se explique pelo fato de o momento em que as fêmeas que tiveram o seu cio induzido, terem sido expostas ao macho sem que ainda

tivessem no ápice do cio, sendo possível o macho detectar através da produção de ferormônios. Vale destacar que em algumas situações, a fêmea apresentava muco e saltava sobre as outras e, deixava-se ser montada. Mas quando apresentada ao reprodutor, este se manteve desinteressado.

#### 4. CONCLUSÕES

Os reprodutores bubalinos são passíveis de condicionamento para coleta de sêmen com vagina artificial em suas fazendas de origem.

Após doze sessões de tentativas de coleta seminal, os touros já respondem com uma certa regularidade a coleta de sêmen com o método de vagina artificial.

De todos os eventos estudados a contração peniana, foi o de maior importância na conduta sexual dos touros bubalinos, demonstrado pelas elevadas proporções de manifestação em relação a todos os comportamentos sexuais expressos, na presença de fêmea em estro.

Para nenhum dos eventos estudados individualmente foi observado um padrão temporal e homogêneo de expressão em relação à presença da fêmea em estro.

Durante os quatro anos de avaliação do comportamento e condicionamento dos touros para a coleta, foi verificado que os animais ejaculam tanto no período reprodutivo favorável quanto no período reprodutivo desfavorável.

Deve-se zelar pela sanidade animal dos touros, que serão mantidos na propriedade para uso do sêmen fresco ou refrigerado.

#### AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa, fator indispensável para o andamento e finalização do curso.

Ao senhor Marcelo Vargas Leão e João Vargas Leão, proprietários da Fazenda Pedreiras e Laticínio Bom Destino, por cederem os animais e instalações para a execução dos trabalhos de campo.

#### REFERÊNCIAS

AGUIAR, P.; ANDRADE, V.; ABREU, J. et al. Physical and morphological semen characteristics of buffaloes aged from four to eight years old. *Proceedings...* In: 4<sup>th</sup> INTERNATIONAL BUFFALO CONGRESS, São Paulo, Brazil, v.3, p.486-488, 1994.

AHMAD, M.; LATIF, I.; AHMAD, M. et al. Post mortem studies on infertile buffalo bulls: Anatomical and microbiological findings. *Vet. Res.*, v.11, p.104-109, 1985.

ANZAR, M.; AHMAD, M.; NAZIR, M. et al. Selection of buffalo bulls: sexual behavior and its relationship to semen production and fertility. *Theriogenology*, v.40, p.1187-1198, 1993.

BARUSELLI, P.S.; OLIVEIRA, J.F.S.; MENDES, M.L.M. Diagnóstico da bubalinocultura do Vale do Ribeira. Campinas. *Doc. Téc. CATI*, v.94, 16p., 1993.

CBRA-Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal. 3<sup>a</sup> ed, Belo Horizonte, 104p., 2013.

- DIXIT, N. K.; AGARWAL, S.P.; DWARAKNATH, P.K. Seasonal variations in serum levels of thyroid hormones and their relation with seminal quality and libido in buffalo bulls. *Theriogenology*, v.22, n.5, p.497-507, 1984.
- DOHOO, I.R.; MARTIN, W.; STRYHN, H. *Veterinary Epidemiologic Research*. 2<sup>a</sup> ed. Charlottetown, Canadá: University of Prince Edward Island, 865p., 2010.
- FISCHER, H.; BODHIPAKSHA, P. Reproduction in swamp buffaloes. In: Buffalo Production. Tulloh, N. M. and Holmes, J.H.G. (eds.). 1<sup>st</sup> edition, Elsevier Science Publisher, Amesterdam, Netherland, 1992.
- GORDON, I. *Controlled Reproduction in Cattle and Buffaloes*. 1<sup>st</sup> edition, CAB International, Willingford, U.K., p.432-466, 1996.
- HAFEZ, B., HAFEZ, E.S.E. *Reprodução animal*. 7<sup>a</sup> ed. Barueri: Manole, 2004.
- HENRY, M.; BRITO, M.F.; NEVES, B.P. et al. Exame andrológico de bubalinos. *Rev. Bras. Reprod. Anim.l*, Belo Horizonte, 41(1), 188-194, jan./mar., 2017b.
- HENRY, M.; BRITO, M.F.; NEVES, B.P. et al. Peculiarities of the buffalo species for andrological evaluation - results of four years of study and weekly semen collection schedule. *Anim. Reprod.*, v.14, (Suppl.1), p.1225-1233, 2017a.
- KOONJAENAK, S., RODRIGUEZ-MARTINEZ, M. Assessment of semen quality in Swamp Buffalo AI Bulls in Thailand. *Ital. J. Anim. Sci.*, v.6, (Suppl. 2), p.701-704, 2007.
- KUMAR, S.; SAHNI, K.L.; BENJAMIN, B.N. et al. Effect various levels of yolk on deep freezing and storage of buffalo semen in different diluters without adding glycerol. *Buffalo J.*, v.1, p.79-85, 1993.
- MADER, D.R., PRICE, E.O. Effect of sexual stimulation on the sexual performance of Hereford bulls. *J. Anim. Sci.*, v.59, p.294-300, 1984.
- MENKE, C.; WAIBLINGER, S.F.O.; LSCH, D.W. et al. Social behaviour and injuries of horned cows in loose housing systems. *Anim. Welfare*, v.8, p.243-258, 1999.
- NIKAN, S.R.; DESHMUKH, B.T.; VADNERE, N.B. et al. Comparative appraisal of seminal plasma lipid profile in buffalo and cow bulls. *J. Bombay Vet. Coll.*, v.13, p.46-49, 2005.
- OHASHI, O.M.; SANTOS, S.S. D.; MIRANDA, M.S. et al. Morfologia do sistema genital, distúrbio reprodutivo e manejo do macho bubalino (*Bubalus bubalis*). *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.35, p.88-94, 2011.
- OHASHI, O.M. Inseminação artificial em bubalinos. In: GONÇALVES, P.B.D. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. (2<sup>a</sup> ed.), Roca, p.97-110, 2008.
- PRABHU, S.S., BHATTACHARYA, P. Influence of factors affecting sex drive on semen production of buffaloes. I - Physiological state of the "teaser" cow. *Indian J. Vet. Sci. Anim. Husband.*, v.24, n.1, p.35-50, 1954.
- RATTAN, P.J.S. Physico-chemical constituents of buffalo bull semen. In: Acharya, R.M.; Lokeshwar, R.R.; Kumar, S. Eds. *Recent Advances in Buffalo Research*, v.3, p.26-30, 1990.



SAEED, A.; CHAUDHRY, R.; KHAN, I.H. et al. Morphology of semen buffalo bulls of different age groups. In: Acharya R. M. Recent advances in buffalo research. New Delhi: *Indian Soc. Buffalo Dev.*, p.17-19, 1990.

SAJJAD, S.; ALI, S.; ULLAH, N. et al. Blood serum testosterone level and its relationship with scrotal circumference and semen characteristics in Nili-Ravi buffalo bulls. *Pak. Vet. J.*, v.27, p.63-66, 2007.

SAMO, U. M.; BROHI, N.A.; KAKA, I. ET AL. Study on sexual behaviour and seminal quality characteristics of Kundhi buffalo bulls. *Pak. J. Biol. Sci.*, v.8, n.11, p.1628-1629, 2005.

SANSONE, G.; NASTRI, M.J.F.; FABBROCINI, A. Storage of buffalo (*Bubalis bubalus*) semen. *Anim. Reprod. Sci.*, v.62, p.55-76, 2000.

SINGH, S.; BHAKAT, M.; MOHANTY, T.K. et al. Sexual behavior and its relationship with semen quality parameters in Sahiwal breeding bulls. *Vet. World, Jun.*, v.8, n.6, p.745-749, 2015.

SINGH, P.; SENGUPTA, B.P.; TRIPATHI, V.N. Effect of multiple showering and vitamin supplementation on sexual behavior, quality and freezability of buffalo bull semen. *Asian-Austral. J. Anim. Sci.*, v.14, n.2, p.184-188, 2001.

VALE, W.G. Avances biotecnológicos em reprodução de búfalos. *Tecnología em Marcha. Rev. Esp.*, v.24, n.5, p.89-90, 2011.

VALE, W.G.; RIBEIRO, H.F.L.; SOUZA, J.S. et al. Seleção e avaliação andrológica do reprodutor bubalino. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.32, p.141-155, 2008.

WIERZBOWSKI, S.; NAZIR, M.; HAMBLIN, F.B. et al. Service ability and semen production of buffalo bulls. *World Anim. Review*, 33, 26-31, 1980.

YASSEN, A.M.; BADAWEY, A.M.; EL-BASHARY, A.S. et al. Semen production from buffalo bulls. *Alex. J. Agric. Res.*, v.22, p.341-348, 1974.

ZICARELLI, L. Enhancing reproductive performance in domestic dairy water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.*, v.67, p.443-455, 2010.

ZORZETTO, M.F.; SILVA, Y.F.R.S.; ZOCCA, S. et al. Aspectos físicos e morfológicos do sêmen de búfalos da raça Murrah em maturidade sexual. *Vet. Zootec.*, Dez. v.23, n.4, p.647-655, 2016.

## Capítulo 2 - VIABILIDADE DOS ESPERMATOZOIDES REFRIGERADOS A 5°C POR 120 HORAS: EFICIÊNCIA DE DIFERENTES EXTENSORES NA MANUTENÇÃO DO SÊMEN BUBALINO PARA UTILIZAÇÃO NA IATF

Jaci de Almeida<sup>a\*</sup>, Beatriz Parzewski Neves<sup>a</sup>, Mayara Ferreira Brito<sup>a</sup>, Verônica Alexandra Becerra Becerra<sup>a</sup> Patricia Alencar Auler<sup>a</sup>, João Paulo Hadad<sup>b</sup>, Marc Roger Jean Marie Henry<sup>c</sup>

[jacialmeida01@yahoo.com.br](mailto:jacialmeida01@yahoo.com.br), [biaparzewski@gmail.com](mailto:biaparzewski@gmail.com), [mayarafebrito@yahoo.com.br](mailto:mayarafebrito@yahoo.com.br),  
[mzv.veronicabecerra@hotmail.com](mailto:mzv.veronicabecerra@hotmail.com), [patricia\\_auler@yahoo.com.br](mailto:patricia_auler@yahoo.com.br), [henrym2601@gmail.com](mailto:henrym2601@gmail.com)

<sup>a</sup> Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. Av. Antônio Carlos, n.6627, Pampulha, Belo Horizonte, MG, 31270-901, Brasil.

<sup>b</sup> Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

<sup>c</sup> Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

\*Corresponding author. Tel.: +55 31 97174-3066

E-mail addresses: [jacialmeida01@yahoo.com.br](mailto:jacialmeida01@yahoo.com.br) (J. Almeida).

\*

### RESUMO

O objetivo do presente estudo foi verificar a efetividade de diferentes extensores utilizados para a refrigeração do sêmen bubalino em relação à manutenção da longevidade espermática ao longo do processamento. Amostras seminais de 11 touros da raça Murrah com idade de 4 a 6 anos foram preservadas a 5°C por 120 horas em sistema passivo de refrigeração (balcão frigorífico) utilizando os extensores TRIS com 10% LDL (substituindo a gema de ovo), Tolera D<sup>®</sup> (lecitina de soja substituindo a gema de ovo) e (Botu-Bov<sup>®</sup>). Estas amostras foram avaliadas subjetivamente no momento T0 (pós-coleta), T1, T24, T48, T72, T96 e T120 horas pós-diluição e refrigeração através da análise computadorizada do movimento espermático (CASA), integridade de membrana plasmática (Teste Hiposmótico). Cada reprodutor teve seu ejaculado analisado para as características físicas e morfológicas do sêmen, sendo estes fracionados em três alíquotas para cada um dos extensores. Os valores obtidos foram submetidos ao Teste de Friedman ( $p < 0,05$ ). A partir dos resultados alcançados pode-se concluir que houve melhor preservação das amostras mantidas sob refrigeração com o extensor Botu-Bov<sup>®</sup> à 5°C/120horas conferindo maior proteção contra injúrias e integridade de membrana espermática, quando comparado com os demais extensores. O extensor Botu-Bov<sup>®</sup> pode ser uma alternativa para o uso do sêmen de búfalos refrigerado na IA e IATF por até 48 horas, pois assim, permitiria que fossem realizadas de 2 a 3 coletas de sêmen por semana.

**Palavras chave:** Análise Computadorizada do Sêmen, longevidade espermática, teste hiposmótico.

### 1. INTRODUÇÃO

A viabilidade econômica de um sistema de produção pecuário está diretamente ligada aos índices de produtividade e estes são diretamente afetados pela eficiência reprodutiva e a seleção genética dos rebanhos. O aumento da produção na pecuária nacional pode ser obtido com o emprego de biotécnicas que otimizem o sistema de produção, buscando maior produção por hectare, de modo reduzir os custos de produção. Celeghini (2005) reportou que a utilização de biotécnicas aplicadas à

---

\* Autor para correspondência. Tel: +55 (31) 97174-3066/ +55 (31) 99171-0356 Fax:+55 (31) 3409-2230 E-mail: [jacialmeida01@yahoo.com.br](mailto:jacialmeida01@yahoo.com.br)

Universidade Federal de Minas Gerais - Escola de Veterinária - Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias, Av. Antônio Carlos, n.6627, Pampulha, Belo Horizonte, MG, 31270-901, Brasil.

reprodução permite maximizar o uso de genética superior, possibilitando o aumento de desempenho nos animais.

Várias biotécnicas reprodutivas são utilizadas no Brasil, porém, a mais difundida é a inseminação artificial (IA). A IA com sêmen criopreservado é uma biotécnica reprodutiva de custos mais acessíveis e que serve como ferramenta para o melhoramento genético dos rebanhos, inclusive para a espécie *Bubalus bubalis*. No entanto, a IA para búfalos é baseada no uso de sêmen congelado (Ribeiro *et al.*, 1994). Garner *et al.* (2001) reportaram que apesar dos avanços obtidos nos últimos anos, o congelamento celular ainda danifica as organelas e membranas do espermatozoide, induzindo, também, a mudanças na capacitação espermática e na reação acrossomal. Segundo Rasul *et al.* (2001), ao analisar os espermatozoides de búfalos, por meio do método CASA (análise computadorizada do sêmen), concluíram que o processo causa lesões no axonema diminuindo a capacidade de movimentação dos espermatozoides.

A redução na longevidade e fertilidade dos espermatozoides relacionada à criopreservação motivou o desenvolvimento de novos estudos para abordar a preservação do sêmen na forma refrigerada para a espécie bubalina (Dhami e Sahni, 1994; Adeel *et al.*, 2009; Akhter *et al.*, 2011b; Singh *et al.*, 2012; Almeida *et al.*, 2015; Almeida *et al.*, 2016a e Almeida *et al.*, 2017), também as LDLs têm sido alvo de pesquisas para o sêmen refrigerado (Almeida *et al.*, 2016b) e congelado de búfalos (Akhter *et al.*, 2011a; Brito, 2014 e El-Badry *et al.*, 2015), porém há escassez de informações sobre o uso das LDLs para o sêmen refrigerado de búfalos. A principal vantagem desse tipo de processamento representa a prevenção das injúrias relacionadas ao processo de congelamento, garantindo uma maior viabilidade espermática que por sua vez permite a redução da dose inseminante, otimização de reprodutores de alto mérito genético em programas de inseminação artificial, menor custo de estocagem, além da fácil utilização nos trabalhos de IA (Verberckmoes *et al.*, 2005 e Bucker *et al.*, 2009). Todas essas vantagens associadas atuam positivamente na redução dos custos de produção animal, viabilizando a implementação e a difusão de técnicas como a inseminação artificial (IA) e inseminação artificial em tempo fixo (IATF) nos mais diversos sistemas de produção pecuária nacionais.

Considerando que o tempo de armazenagem influencia a viabilidade do sêmen refrigerado (Batellier *et al.*, 2001), uma das principais indicações para o uso do sêmen bubalino conservado sob refrigeração são os programas de IATF (Almeida *et al.*, 2015; Almeida *et al.*, 2016a e Almeida *et al.*, 2017). Os protocolos permitem a inseminação de um grande número de animais em um curto intervalo de tempo (Bucker *et al.*, 2009), podendo-se incorporar a tecnologia de refrigeração do sêmen mesmo em detrimento a baixa longevidade destas amostras. Nesse sentido, o sêmen bubalino refrigerado representa uma alternativa promissora ao sêmen criopreservado, podendo atuar para o aumento das taxas de concepção nos programas de IA e IATF diminuindo os custos finais dos mesmos.

Esse estudo foi conduzido com o objetivo de comparar a qualidade pré e pós-refrigeração do sêmen de búfalos diluído em três meios extensores distintos (TRIS 10% LDL, Tolera D<sup>®</sup> e Botu-Bov<sup>®</sup>) em relação aos padrões da cinética espermática pela análise computadorizada (CASA) e integridade de membrana espermática pelo Teste Hiposmótico (HOST) para uso em programas de IA e IATF de búfalos.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Ética

O estudo foi realizado após aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (EV/UFMG), com a aprovação do nº 368/2015, segundo os princípios éticos de experimentação animal.

## 2.2. Local da execução do experimento

O experimento foi conduzido no Centro de Biotecnologia em Bubalinocultura, sediado na Fazenda Experimental de Produção Sustentável da UFMG, em Pedro Leopoldo, Minas Gerais, com altitude média de 710 metros, latitude 19°37'05" S e longitude 44°02'35" W.

## 2.3. Animais

Foram utilizados 11 búfalos, da raça Murrah, com idade entre 4 e 6 anos, mantidos em pastagem durante todo o experimento, com fornecimento de sal e água *ad libitum*. Estes animais já estavam condicionados a coleta de sêmen com vagina artificial e foram mantidos em regime de coleta semanal durante todo período experimental.

## 2.4. Coleta e processamento do sêmen

As coletas de sêmen foram feitas com o auxílio de vagina artificial com temperatura de 42-45°C, sendo realizada uma falsa monta (intuito de aumentar a concentração espermática) previamente a coleta de sêmen (segunda monta). Imediatamente pós-coleta cada ejaculado foi submetido às análises das características físicas e morfológicas do sêmen segundo Manual do CBRA (2013). Somente ejaculados com  $\geq 70\%$  de motilidade, vigor  $\geq 3$  e anormalidades espermáticas  $\leq 30\%$  e com no mínimo  $600 \times 10^6$  SPTZ/mL foram utilizados. Cada ejaculado foi fracionado em 3 alíquotas, sendo cada amostra diluída em um dos extensores para a obtenção de  $50 \times 10^6$  SPTZ/mL. O envase foi realizado em palhetas de 0,5 mL, acondicionadas em saco plástico submerso em recipiente com água (1,4 L) a 27°C. O frasco foi colocado em ambiente a 5°C (balcão frigorífico) obtendo-se uma curva de resfriamento de 0,25°C/minuto (de 27 a 5°C/média do período avaliado). As palhetas foram mantidas refrigeradas a 5°C pós-diluição por até 72 horas.

## 2.5. Reagentes

Para a obtenção das Lipoproteínas de Baixa Densidade (LDLs - substituindo a gema de ovo) foram utilizados ovos frescos produzidos em granja comercial. Os ovos foram devidamente higienizados e submetidos à técnica descrita por Neves *et al.* (2008). Composição do TRIS: TRIS (2,42 g), ácido cítrico (1,36 g), Frutose (1,0 g), Amicacina (83, 4 µg/mL), Equex 0,4%, LDL (10 mL) e H<sub>2</sub>O Milli-Q<sup>®</sup> autoclavada (completar 100 mL), adaptado de Brito (2014), sendo todos os reagentes utilizados da Sigma-Aldrich<sup>®</sup>. Os outros dois extensores utilizados são produtos comerciais, o primeiro com lecitina de soja substituindo a gema de ovo (Tolera D<sup>®</sup> - Inprehnha Biotecnologia e Desenvolvimento Avançado S.A., São Paulo, Brasil) e o segundo (Botu-Bov<sup>®</sup> - BotuPharma Biotecnologia Animal, São Paulo, Brasil).

## 2.6. Avaliação espermática

A avaliação da motilidade espermática imediatamente pós-diluição final foi realizada de forma subjetiva (microscópio de contraste de fase Nikon 200 - T0 horas). Para as avaliações subsequentes (T1, T24, T48, T72, T96 e T120 horas pós-diluição com refrigeração à 5°C) uma palheta depositada em tubo Eppendorf<sup>®</sup> de 1,5 mL e incubada em “banho-seco” a 37°C/5 minutos, até serem submetidas à análise da motilidade pelo sistema computadorizada CASA (modelo Sperm Class Analyzer - SCA<sup>®</sup> v.4.0). O Setup utilizado para análise do sêmen de búfalos foi: área da partícula (20 a 70 microns<sup>2</sup>), VCL (10 < Slow < 25 e Medium < 50), Progressividade (> 70% STR), Circular (< 50% LIN), Pontos para o VAP (5) e Conectividade (12). Para a análise CASA, gotas de 5 µL de cada amostra foram colocadas entre lâmina e lamínula, previamente mantidas a 37°C, sendo utilizados para a análise de cada amostra 5 campos capturados, homogêneos, com um mínimo de 200 células espermáticas em cada um deles.

Seguindo metodologia proposta por Farell *et al.* (1998), foram utilizados, para as ponderações sobre a eficácia dos diluidores empregados, quanto aos parâmetros cinéticos do CASA, um conjunto de parâmetros que, no estudo citado, apresentou maior correlação com a fertilidade. Esses parâmetros foram: Motilidade total (MT), Motilidade progressiva (MP), Velocidade Curvilínea (VCL), Velocidade de Trajeto (VAP), Velocidade Progressiva (VSL), Linearidade (LIN), Retilinearidade (STR), Índice de Oscilação (WOB), Amplitude do deslocamento Lateral de Cabeça (ALH) e Frequência de Batimentos de Cauda (BCF).

### 2.7. Concentração espermática

Utilizou-se a contagem de células na câmara hematocitométrica de Neubauer numa diluição de 1:200, em solução formol-salina-tamponada (Hancock, 1957), também sob microscopia óptica convencional em aumento de 400 vezes (CBRA, 2013).

### 2.8. Morfologia espermática

Para a avaliação da morfologia espermática usou-se uma alíquota de 50 µL de sêmen adicionada a 1000 µL de uma solução formol-salina-tamponada (Hancock, 1957), depositando-se estes conteúdos de avaliação em tubos Eppendorf® cônicos de 1,5 mL, sendo a análise realizada em câmara úmida, com microscópio de contraste de fase em aumento de 1000 vezes. As patologias foram classificadas em defeitos maiores (DM) e normais, segundo o preconizado pelo (CBRA, 2013).

### 2.9. Avaliação da integridade de membrana plasmática

Para o teste hiposmótico (HOST), uma alíquota de 50 µL de sêmen foi adicionada a 500 µL de uma solução hiposmótica contendo frutose-citrato de sódio a 121 mOsm/L (2,702 g de frutose + 1,324 g de citrato de sódio). Esta solução foi incubada por 30 minutos em banho-seco a 37°C e fixada em 200 µL de formol salina tamponada, para posterior análise em microscópio de contraste de fase (x1000), sendo contadas 200 células de acordo com a presença ou não de cauda enrolada (Melo *et al.*, 2005).

### 2.10. Delineamento e Análise estatística

O desenho amostral foi desenvolvido utilizando 3 extensores, 6 avaliações realizadas em diferentes momentos e 11 reprodutores, configurando um esquema de blocagem, caracterizando três fontes de variação (extensor, tempo de refrigeração e touro). Por se tratar de um desenho em blocos ao acaso com medidas repetidas em cada tratamento e animal, foi usado o teste de Friedman, sendo este realizado comparando par a par (comparação via “*pairwise*”). O pacote estatístico utilizado foi o STATA 12.0 Statistical Analysis Software (Statacorp, 2012).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As características físicas dos ejaculados *in natura* utilizadas para o experimento estão apresentadas na Tabela 10.

Para o sêmen *in natura*, todos os 11 touros analisados (Tabela 10) possuíam valores para os parâmetros espermáticos acima dos valores mínimos recomendados pelo CBRA (2013). A associação dos valores obtidos nos parâmetros seminais estudados, permitem fazer boa estimativa da capacidade fecundante de uma dada amostra (Severo, 2009), porém a seleção andrológica pode propiciar a escolha de reprodutores superiores, mas, por si só, não é capaz de prever eficazmente o potencial de refrigeração e congelamento do sêmen. Isto porque, o extensor muitas das vezes não protege igualmente os espermatozoides de ejaculados de touros diferentes, evidenciando as diferenças existentes entre os animais e seu material genético.

Tabela 10 - Características dos ejaculados de búfalos da raça Murrah (n=11) avaliadas imediatamente pós-coleta.

Animais	Volume (mL)	Turbilhão (0-5)	Motilidade Subjetiva (%)	Vigor (0-5)	Concentração ( $\times 10^6/\text{mL}$ )	DM (%)	Normais (%)
1	3	3	85	3	840	7	76
2	1.8	3	80	3	625	8	72
3	5	3	80	3	3195	5	81
4	1	3	85	4	1190	6	78
5	1	3	85	3	1135	10	70
6	1.1	4	90	4	1005	4	81
7	1	3	85	3	1190	7	71
8	2.1	3	80	3	930	9	75
9	2.1	4	90	4	985	6	79
10	3.5	4	90	3	1645	9	72
11	2.6	5	95	4	1425	3	86
<b>Média±DV</b>	<b>2,2±1,3</b>	<b>3,5±0,7</b>	<b>85,9±4,9</b>	<b>3,4±0,5</b>	<b>1287,7±658,2</b>	<b>6,7±2,1</b>	<b>76,5±4,8</b>

DM = Defeitos maiores; DV = Desvio padrão.

Os bons parâmetros encontrados para o sêmen *in natura* dos animais estudados se deve, em parte, ao fato destes estarem em regime de coleta seminal semanal, há pelo menos três anos, além do estabelecimento de manejo de coleta baseado na realização de falsa monta, visando obter ejaculado com melhor concentração e volume. Entretanto, o volume e a concentração espermática são variáveis, devido à sazonalidade, clima, hora, período de repouso sexual do animal e método de colheita (vagina artificial, eletroejaculador e/ou massagem das ampolas dos ductos deferentes).

Salvador *et al.* (2008) reportaram que a alta motilidade espermática inicial no sêmen *in natura* não garante, por si só, bom desempenho na congelamento, porém, permite que animais com altas taxas de queda de motilidade ainda apresentem aprovação no sêmen pós-congelamento. Segundo Cox *et al.* (2006), a motilidade espermática é comumente apontada como uma das mais importantes características associadas com a habilidade fertilizante do espermatozoide. Já Verstegen *et al.* (2002) relataram que a análise de sêmen pelo sistema CASA fornece uma classificação objetiva de uma dada população de espermatozoides e é considerada como um dos métodos mais confiáveis para avaliar a qualidade do sêmen.

Segundo Chacur (1996) e Chacur *et al.* (1997), a análise de múltiplos atributos de movimentos espermáticos por meio da técnica CASA e determinação da viabilidade espermática, por meio de técnicas de análise de membranas citoplasmáticas podem agregar maior sensibilidade à avaliação *in vitro* do sêmen bubalino.

A análise computadorizada do sêmen foi padronizada utilizando-se 5  $\mu\text{L}$  de cada amostra aguardando 5 minutos para a sedimentação e depois escolhidos cinco campos de um total de nove, sendo utilizada concentração de  $50 \times 10^6$  SPTZ/mL, tentando manter o máximo possível de homogeneidade entre as amostras analisadas.

Para o sêmen pós-diluição, não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) para os parâmetros de motilidade espermática (Tabela 11), encontrando-se estes acima de 96% para a Motilidade Total (MT) e 79% para a Motilidade Progressiva (MP).

Há escassez de literatura sobre a distribuição da velocidade espermática do sêmen fresco e refrigerado de búfalos analisados pelo sistema computadorizado CASA. Para o sêmen fresco, os valores de MT, MP e concentração espermática, encontrados neste estudo são superiores aos relatados por Mahmoud *et al.* (2013). Valores similares para MT também foram reportados por Becerra (2017) ao avaliar o sêmen fresco de búfalos com o meio extensor TRIS com 10% LDL. No entanto, para a MP a autora obteve menor motilidade (< 40%).

Tabela 11 - Efeitos de diferentes extensores utilizados para o sêmen de 11 búfalos (1 ejaculado/doador), pós-diluição (T1 horas - temperatura ambiente), e refrigerado à 5°C (T24, T48, T72, 96 e 120 horas) para os parâmetros de cinética espermática.

Parâmetros espermáticos	Tempo (horas)	Extensores		
		TRIS 10% LDL	Tolera D®	Botu-Bov®
MT (%)	1	96,3 <sup>a</sup>	96,1 <sup>a</sup>	96,5 <sup>a</sup>
	24	90,9 <sup>b</sup>	89,2 <sup>b</sup>	93,8 <sup>a</sup>
	48	88,0 <sup>a</sup>	87,5 <sup>a</sup>	91,3 <sup>a</sup>
	72	78,4 <sup>ab</sup>	75,7 <sup>b</sup>	85,1 <sup>a</sup>
	96	62,0 <sup>a</sup>	55,9 <sup>b</sup>	73,7 <sup>a</sup>
	120	44,2 <sup>b</sup>	45,1 <sup>ab</sup>	57,0 <sup>a</sup>
MP (%)	1	81,4 <sup>a</sup>	79,5 <sup>a</sup>	82,2 <sup>a</sup>
	24	72,8 <sup>a</sup>	64,8 <sup>b</sup>	75,8 <sup>a</sup>
	48	64,2 <sup>a</sup>	62,4 <sup>a</sup>	67,2 <sup>a</sup>
	72	50,4 <sup>ab</sup>	48,5 <sup>b</sup>	61,2 <sup>a</sup>
	96	35,0 <sup>b</sup>	29,6 <sup>b</sup>	48,5 <sup>a</sup>
	120	21,6 <sup>b</sup>	23,1 <sup>b</sup>	34,6 <sup>a</sup>
VCL (µm/s)	1	89,0 <sup>ab</sup>	98,0 <sup>a</sup>	80,6 <sup>b</sup>
	24	82,2 <sup>a</sup>	94,6 <sup>a</sup>	71,4 <sup>b</sup>
	48	89,9 <sup>a</sup>	81,8 <sup>ab</sup>	71,2 <sup>b</sup>
	72	85,0 <sup>a</sup>	69,8 <sup>b</sup>	63,8 <sup>b</sup>
	96	77,9 <sup>a</sup>	67,5 <sup>b</sup>	72,5 <sup>ab</sup>
	120	57,4 <sup>ab</sup>	64,1 <sup>a</sup>	50,8 <sup>b</sup>
VAP (µm/s)	1	57,2 <sup>b</sup>	76,2 <sup>a</sup>	63,0 <sup>b</sup>
	24	56,2 <sup>b</sup>	70,9 <sup>a</sup>	63,6 <sup>b</sup>
	48	55,3 <sup>a</sup>	62,5 <sup>a</sup>	56,2 <sup>a</sup>
	72	56,3 <sup>a</sup>	44,5 <sup>a</sup>	47,4 <sup>a</sup>
	96	48,4 <sup>a</sup>	43,1 <sup>a</sup>	46,2 <sup>a</sup>
	120	32,6 <sup>ab</sup>	37,1 <sup>a</sup>	29,0 <sup>b</sup>
VSL (µm/s)	1	32,0 <sup>b</sup>	48,4 <sup>a</sup>	49,2 <sup>a</sup>
	24	32,6 <sup>b</sup>	53,2 <sup>a</sup>	52,1 <sup>a</sup>
	48	27,9 <sup>b</sup>	44,2 <sup>a</sup>	47,6 <sup>a</sup>
	72	21,7 <sup>b</sup>	39,8 <sup>a</sup>	43,9 <sup>a</sup>
	96	25,4 <sup>b</sup>	29,0 <sup>ab</sup>	41,4 <sup>a</sup>
	120	18,1 <sup>a</sup>	20,1 <sup>a</sup>	22,2 <sup>a</sup>
LIN (%)	1	36,5 <sup>c</sup>	51,1 <sup>b</sup>	59,4 <sup>a</sup>
	24	36,9 <sup>c</sup>	56,2 <sup>b</sup>	68,9 <sup>a</sup>
	48	33,2 <sup>c</sup>	57,4 <sup>b</sup>	65,7 <sup>a</sup>
	72	31,3 <sup>c</sup>	48,8 <sup>b</sup>	69,9 <sup>a</sup>
	96	31,5 <sup>c</sup>	41,7 <sup>b</sup>	65,9 <sup>a</sup>
	120	29,1 <sup>c</sup>	37,4 <sup>b</sup>	44,8 <sup>a</sup>
STR (%)	1	59,5 <sup>c</sup>	68,8 <sup>b</sup>	80,4 <sup>a</sup>
	24	58,3 <sup>c</sup>	74,4 <sup>b</sup>	85,0 <sup>a</sup>
	48	45,1 <sup>c</sup>	75,1 <sup>b</sup>	85,1 <sup>a</sup>
	72	49,4 <sup>c</sup>	65,7 <sup>b</sup>	89,0 <sup>a</sup>
	96	57,9 <sup>c</sup>	63,8 <sup>b</sup>	90,3 <sup>a</sup>
	120	48,7 <sup>c</sup>	63,7 <sup>b</sup>	75,5 <sup>a</sup>
WOB (%)	1	62,3 <sup>b</sup>	73,7 <sup>a</sup>	74,9 <sup>a</sup>
	24	65,4 <sup>c</sup>	73,8 <sup>b</sup>	79,4 <sup>a</sup>
	48	67,4 <sup>b</sup>	77,8 <sup>a</sup>	78,1 <sup>a</sup>
	72	62,4 <sup>b</sup>	74,0 <sup>a</sup>	78,0 <sup>a</sup>
	96	62,2 <sup>b</sup>	62,6 <sup>b</sup>	73,3 <sup>a</sup>
	120	54,6 <sup>a</sup>	60,0 <sup>a</sup>	60,5 <sup>a</sup>
ALH (µm)	1	3,4 <sup>c</sup>	3,0 <sup>b</sup>	2,7 <sup>a</sup>
	24	3,3 <sup>b</sup>	3,2 <sup>b</sup>	2,2 <sup>a</sup>
	48	2,9 <sup>b</sup>	2,6 <sup>ab</sup>	2,2 <sup>a</sup>
	72	3,0 <sup>b</sup>	2,7 <sup>b</sup>	2,0 <sup>a</sup>
	96	3,0 <sup>a</sup>	3,0 <sup>a</sup>	2,8 <sup>a</sup>
	120	2,7 <sup>a</sup>	2,5 <sup>a</sup>	2,4 <sup>a</sup>
BCF (Hz)	1	10,0 <sup>b</sup>	8,9 <sup>b</sup>	11,1 <sup>a</sup>
	24	10,3 <sup>a</sup>	10,9 <sup>a</sup>	11,5 <sup>a</sup>
	48	10,2 <sup>b</sup>	11,1 <sup>ab</sup>	12,4 <sup>a</sup>
	72	10,3 <sup>b</sup>	10,7 <sup>b</sup>	12,5 <sup>a</sup>
	96	10,3 <sup>b</sup>	10,2 <sup>b</sup>	11,9 <sup>a</sup>
	120	9,7 <sup>a</sup>	10,4 <sup>a</sup>	10,1 <sup>a</sup>

Letras diferentes em cada característica espermática (linha), diferem estatisticamente entre si ( $p < 0,05$ ). VCL: Velocidade Curvilínea; VAP: Velocidade de Trajeto; VSL: Velocidade Progressiva; LIN: Linearidade; STR: Retilinearidade; WOB: Índice de Oscilação; ALH: Amplitude do Deslocamento Lateral de Cabeça; BCF e Frequência de Batimentos de Cauda.

Para os demais parâmetros cinéticos houve diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ), observados na pós-diluição seminal, verificando-se que o extensor Botu-Bov<sup>®</sup> apresentou os maiores valores para LIN, STR, WOB, ALH e BCF. Isto provavelmente ocorreu pela diferença de composição e concentração dos componentes presentes para cada um dos extensores utilizados, fazendo com que a osmolaridade e viscosidade do meio contribuísem para uma variação da cinética espermática.

Os resultados foram similares aos encontrados por Celegnini (2005) e que haviam sido esclarecidos por Mortiner (1997) e Hiraí *et al.* (1997) onde explicam que a densidade do meio pode influenciar diretamente na velocidade espermática. Um outro ponto que contribuiu para a diferença de viscosidade foi a presença de glicerol na composição dos meios comerciais, e que não está presente no meio TRIS 10% LDL, uma vez que os meios comerciais são indicados para a criopreservação. No entanto, Almeida *et al.* (2015 - comunicação pessoal) ao testarem o diluidor TRIS com 10 e 5% de LDL, com e sem glicerol, para a refrigeração do sêmen de búfalos à 5°C, não encontraram diferenças entre os tratamentos.

Para o tempo de 24 horas pós-refrigeração não foi verificada diferença ( $p > 0,05$ ) entre os extensores para a MT, porém, diferiu ( $p < 0,05$ ) para a MP, sendo os maiores percentuais a favor do meio TRIS 10% de LDL e Botu-Bov<sup>®</sup>, os quais se mantiveram acima de 70% (Tabela 11). No entanto, pode ser observado que as motilidades para os extensores não tiveram redução acentuada entre o sêmen *in natura* e refrigerado por até 24 horas, evidenciando que o processo de refrigeração foi eficiente em preservar os espermatozoides.

Outros estudos como o de Becerra (2017) com sêmen de búfalo refrigerado por 24 horas, reportou uma MT próxima a 90% e MP abaixo de 50%, utilizando o extensor TRIS com 10% LDL. Já Tarig *et al.* (2017), ao estudarem os efeitos de diferentes concentrações de lecitina de soja (LS) e óleo de coco virgem, em extensor TRIS para os parâmetros de qualidade de sêmen de bovinos, encontraram motilidade de 81,0% para o extensor com 1,25% de LS.

Almeida *et al.* (2016b), ao estudarem o sêmen refrigerado de búfalos em diferentes extensores por 24 horas, relataram ter encontrado valores médios para a MT e MP de 81,8 e 53,5%, respectivamente. Resultado inferior (60,0%) foi obtido por Sing *et al.* (2012), ao avaliar o sêmen de búfalos refrigerado à 5°C em meio extensor TRIS por 24 horas.

Quanto aos parâmetros cinéticos VSL, LIN, STR, WOB, ALH e BCF, o extensor Botu-Bov<sup>®</sup> foi superior ( $p < 0,05$ ) aos demais. No entanto, verificou-se que todos os diluidores foram eficientes em preservar o sêmen durante as primeiras 24 horas de refrigeração. O extensor Botu-Bov<sup>®</sup> apresentou os valores mais baixos para o ALH para o tempo de 24 horas de avaliação, indicando que o deslocamento lateral da cabeça do espermatozoide para esse meio tendeu a interferir menos na progressão da célula.

Arruda (2003) reportou que o maior valor numérico de ALH se traduz em pior qualidade espermática. Porém, este valor foi determinado matematicamente e ainda não foram estabelecidos limites máximos e mínimos para dizer o quanto de deslocamento da cabeça poderia interferir na motilidade progressiva ou mesmo no processo de fertilização do oócito (Celeghini, 2005 e Celeghini *et al.*, 2008).

O BCF foi igual para os extensores no sêmen refrigerado por 24 horas. Isto sugere que os meios extensores foram eficientes em preservarem as estruturas flagelares nas primeiras 24 horas de refrigeração. No entanto, em face da superioridade do extensor Botu-Bov<sup>®</sup> encontrada para a maioria dos parâmetros avaliados, este seria o extensor eleito para uso com 24 horas de refrigeração a 5°C.

Para o tempo de 48 horas o extensor Botu-Bov<sup>®</sup> apresentou os maiores valores para os parâmetros cinéticos avaliados, exceto para o VCL, onde extensores TRIS com 10% LDL e Tolera D<sup>®</sup> foram superiores. Não foi encontrada explicação conclusiva para este achado, uma vez que a MT



e MP não divergiram entre os extensores. No entanto, Blesbois *et al.* (1999) reportaram os efeitos da refrigeração sobre os componentes lipídicos da membrana plasmática de espermatozoides de aves, constatando diminuição dos lipídios totais de 820 para 620  $\mu\text{g}/10^9$  espermatozoides, após 48 horas de armazenamento a 5°C e também diminuição dos fosfolipídios de 75 a 60%. Os autores concluíram que ocorreram lise dos lipídios, peroxidação e/ou metabolismo endógeno dos lipídios da membrana espermática capazes de alterar sua composição, metabolismo e capacidade de fusão.

Em pesquisa recente, Becerra (2017) encontrou MT próxima a 70% e MP menor que 40% para o sêmen refrigerado de búfalos por 48 horas. Já Almeida *et al.* (2016b) ao pesquisarem o sêmen refrigerado de búfalos a 5°C em diferentes extensores por 48 horas, encontraram para a MT e MP (70,5 e 42,4%, respectivamente). Resultado similar para a motilidade (41,7%) foi obtido por Sing *et al.* (2012) ao avaliarem o sêmen refrigerado de búfalos à 5°C por 48 horas. Uma possível explicação para esse menor valor de motilidade encontrado pelos autores, provavelmente se deve aos diferentes períodos de coletas de sêmen e aos diferentes animais utilizados. É possível observar que o ALH foi menor para o extensor Botu-Bov<sup>®</sup>, tendo menor interferência na progressividade espermática (Tabela 11), o que é desejável para um extensor eficiente, sendo o extensor recomendado para uso após 48 horas de refrigeração.

Os extensores TRIS com 10% LDL e Botu-Bov<sup>®</sup> foram igualmente eficientes para MT e MP para o tempo de 72 horas de refrigeração (Tabela 6), sendo encontrados para as MT e MP valores superiores a 78 e 50%, respectivamente. Estes resultados indicam que a refrigeração para o sêmen de bubalinos é altamente eficiente em preservar os espermatozoides, corroborando com Dhami e Sahni (1994) em estudo com a mesma espécie. Resultados inferiores para a MT (< 50%) e MP (< 20%) foram encontrados por Becerra (2017) ao analisar o sêmen bubalino refrigerado por 72 horas.

Tarig *et al.* (2017) reportaram motilidade de 63,5% para o sêmen de bovinos refrigerado por 72 horas em meio contendo 1,3% de LS, resultado superior ao 31,7% encontrado por Sing *et al.* (2012), utilizando o extensor TRIS por 72 horas na refrigeração do sêmen bubalino à 5°C. Em trabalho com o sêmen refrigerado de búfalos à 5°C por 72 horas Almeida *et al.* (2016), reportaram ter obtido 55,9 e 30,9% para a MT e MP.

Os extensores Botu-Bov<sup>®</sup> e Tolera D<sup>®</sup> apresentaram valores similares ( $p>0,05$ ) para os parâmetros cinéticos VCL, VSL e WOB. Mas para o ALH e BCF o meio Botu-Bov<sup>®</sup> foi superior aos demais ( $p<0,05$ ), face aos resultados obtidos, o extensor Botu-Bov<sup>®</sup> foi superior aos demais para a maioria das características analisadas pós-refrigeração por 72 horas.

Após 96 horas de refrigeração o sêmen continua com boa motilidade, sendo encontrada MT superior a 70% para o extensor Botu-Bov<sup>®</sup>. Para a MP o Botu-Bov<sup>®</sup> apresentou diferença significativa ( $p<0,05$ ), superior aos demais diluidores com mais de 48% de MP.

Em estudo realizado por Becerra (2017), os valores encontrados para a MT e MP se mantiveram abaixo de 30%, indicando que, nas condições em que o experimento foi realizado, que a refrigeração a partir de 72 horas não foi eficaz em preservar os espermatozoides, impedindo desta forma a sua utilização em programas reprodutivos de inseminação. Resultado similar foi encontrado por Almeida *et al.* (2016b) ao estudarem o sêmen refrigerado de búfalos por 96 horas no sistema CASA, em que obtiveram para a MT 28,4% e para a MP 18,1%.

Os parâmetros cinéticos (LIN, STR, WOB e BCF) também se mantiveram superiores para o extensor Botu-Bov<sup>®</sup>. Esta diferença estatística em prol do Botu-Bov<sup>®</sup>, provavelmente se deva à menor densidade e viscosidade do extensor, uma vez que a motilidade para este meio esteve superior ao Tolera D<sup>®</sup> e igual ao TRIS com 10% LDL, indicando que com o passar dos dias o extensor com lecitina de soja tenda a se aglutinar e dificultar a movimentação dos espermatozoides. Já para o VAP e ALH os valores encontrados para ambos os extensores foram similares,

evidenciando que ambos os extensores foram eficientemente capazes de preservar o sêmen refrigerado.

Na última avaliação com 120 horas é possível verificar maior MT e MP para o extensor Botu-Bov<sup>®</sup>, estando os valores acima de 57 e 34%, respectivamente. Fazendo uma comparação com o sêmen congelado para a espécie bubalina, verifica-se que as normas internacionais postulam que no mínimo 50% dos espermatozoides devem ser móveis após o descongelamento (Zhang *et al.*, 1999). Já no manual do CBRA (2013) há recomendação para que se utilize o sêmen de búfalo pós-descongelamento que tenha no mínimo de 30% de motilidade. Conforme pode ser observado na Tabela 6, se forem atendidas estas premissas, o sêmen refrigerado até 120 horas pode ser utilizado sem problema. Entretanto, diante da facilidade de coleta do touro (condicionado a vagina artificial), presente na fazenda onde os trabalhos de inseminação serão realizados e podendo fazer uso do sêmen fresco pós-diluição e mesmo refrigerado por 24 e 48 horas, não se justifica utilizar o sêmen com motilidade inferior a obtida com 48 horas. Isto sem falar que o risco de haver taxa reduzida de prenhez após 48 horas de refrigeração é muito maior.

Além disso, mantendo-se intervalo de coleta de sêmen de 24 a 48 horas, é possível realizar de 2 a 3 coletas por semana dos mesmos animais com o intuito de usar em programas de IA e IATF, otimizando desta forma os animais e conseguindo inseminar um grande número de fêmeas em mesmo momento. Os demais parâmetros cinéticos mantiveram uma constância entre os tempos avaliados, encontrando-se os maiores valores sempre para o extensor Botu-Bov<sup>®</sup>.

O HOST foi escolhido para avaliar a integridade da membrana plasmática, uma vez que foi encontrada correlação comprovada entre os resultados do teste HOST e a taxa de fertilidade *in vivo* (Brito *et al.*, 2003) e, portanto, poderia ser usado para prever a fertilidade. No período pós-diluição, o HOST apresentou diferença estatística significativa entre os extensores ( $p < 0,05$ ) e, mesmo assim, todos os meios foram eficientes em proteger os espermatozoides, conforme Tabela 12.

Os percentuais de espermatozoides reagentes ao HOST, encontrados neste estudo para o sêmen *in natura*, foram superiores aos 84,5% relatados por Mahmoud *et al.* (2013). Também, superiores aos 83,3% encontrados por Becerra (2017) para o sêmen de búfalos *in natura*, utilizando o extensor TRIS com 10% LDL.

Tabela 12 - Efeitos de diferentes extensores utilizados para o sêmen de 11 búfalos (1 ejaculado/doador), pós-diluição (T0 horas - temperatura ambiente), e refrigerado à 5°C (T1, T24, T48 e T72 horas), para a integridade de membrana espermática (HOST).

Parâmetro	Tempo (horas)	Extensores		
		TRIS 10% LDL	Tolera D <sup>®</sup>	Botu-Bov <sup>®</sup>
HOST (%)	1	91,5 <sup>b</sup>	92,3 <sup>ab</sup>	92,9 <sup>a</sup>
	24	83,1 <sup>b</sup>	83,6 <sup>b</sup>	86,8 <sup>a</sup>
	48	75,7 <sup>b</sup>	76,6 <sup>b</sup>	80,1 <sup>a</sup>
	72	68,4 <sup>b</sup>	69,6 <sup>b</sup>	73,4 <sup>a</sup>

Letras distintas na mesma linha, diferem estatisticamente entre si ( $p < 0,05$ ). HOST: Teste Hiposmótico.

Outro estudo, realizado com sêmen refrigerado de búfalos à 5°C em extensor TRIS, utilizando o HOST para verificar a integridade de membrana dos espermatozoides Sing *et al.* (2012), reportaram 62,0% de espermatozoides reagentes para o sêmen pós-diluição.

Para a integridade de membrana espermática após 24 horas de refrigeração, houve diferenças significativa entre os extensores ( $p < 0,05$ ), sendo favorável ao extensor Botu-Bov<sup>®</sup>. Valores inferiores, aos encontrados neste estudo para o HOST, foram relatados por Tarig *et al.* (2017) para o sêmen de bovinos refrigerados por 24 horas (72,1%), em extensor TRIS com óleo de coco com 1,25% de LS. Becerra (2017) relatou percentual de 70,8% de espermatozoides reagentes ao HOST

para o período de 24 horas de avaliação do sêmen de búfalo refrigerado a 5°C. Sing *et al.* (2012), reportaram 48,7% de espermatozoides reagentes para o sêmen 24 horas pós-refrigeração utilizando o extensor TRIS para o sêmen de búfalos.

Após 48 horas de refrigeração à 5°C, houve diferença significativa entre os extensores ( $P < 0,05$ ), sendo novamente favorável ao extensor Botu-Bov<sup>®</sup>. Com os valores obtidos é possível verificar alto percentual de espermatozoides reagentes ao HOST, demonstrando que os extensores foram eficientes na proteção dos mesmos.

Em pesquisa recente, Becerra (2017), para o sêmen de búfalos refrigerado por 48 horas em extensor TRIS com 10% LDL, obteve 74,7% de espermatozoides com membrana espermática íntegra. Em outro estudo utilizando o extensor TRIS, Sing *et al.* (2012), reportaram 37,0% de espermatozoides reagentes para o sêmen de búfalos refrigerado.

Conforme pode ser observado na Tabela 12, os extensores foram eficazes em proteger a integridade da membrana espermática, por até 72 horas, sendo que para até este tempo de observação o extensor Botu-Bov<sup>®</sup> se manteve superior aos demais. Valor inferior foi relatado por Tarig *et al.* (2017) para o sêmen de bovinos refrigerados 72 horas em extensor TRIS com óleo de coco com 1,25% de LS (58,7%). Em outro estudo relacionado à integridade de membrana espermática, Becerra (2017) relatou ter encontrado 61,8% de espermatozoides reagentes ao HOST para o sêmen bubalino refrigerado por 72 horas em extensor TRIS com 10% LDL.

Em relação a cinética espermática, segundo Ahmed *et al.* (2016) os principais parâmetros para prever a fertilidade do sêmen de búfalo congelado e descongelado à campo são a MP, velocidade rápida, VAP, VSL e a integridade de membrana plasmática supravital. Se considerarmos os mesmos parâmetros cinéticos para o sêmen refrigerado de búfalos à 5°C, observa-se que o extensor Botu-Bov<sup>®</sup> apresentou valores similares ou superiores aos demais meios para a maioria dos parâmetros em todos os tempos estudados.

Durante as avaliações dos três extensores para a refrigeração, pelo tempo de até 120 horas, houveram várias alternâncias entre os extensores para alguns parâmetros cinéticos analisados e, desta forma acredita-se que os componentes presentes nos diluidores comerciais, principalmente no Botu-Bov<sup>®</sup>, poderiam estar agindo estimulando a frequência dos batimentos das células espermáticas através da produção de ATP. Entretanto, a composição exata desses diluidores não é revelada devido a sigilo industrial, impossibilitando fazer mais comentários.

Mesmo não havendo indicação de bula para a utilização dos meios comerciais (Botu-Bov<sup>®</sup> e Tolera D<sup>®</sup>) para a espécie bubalina, estes meios, assim como o TRIS com 10% de LDL foram eficientes em preservar a motilidade e integridade de membrana espermática, durante os tempos de refrigeração nas condições em que o experimento foi realizado, permitindo, desta forma, recomendar sua utilização para o sêmen refrigerado por até 48 horas a ser usado em programas de IA e IATF.

Até o momento, os métodos de criopreservação e técnicas de inseminação simples, não foram capazes de proporcionar porcentagens de prenhez semelhantes às aquelas encontradas com a monta natural. Portanto, é de suma importância o desenvolvimento de pesquisas que busquem métodos mais eficazes, visando à produção de amostras de sêmen de excelente qualidade, as quais permitiriam a obtenção de bons índices de fertilidade. Diante dos resultados obtidos nesse estudo e dados de outros trabalhos aqui mencionados, o sêmen refrigerado surge como uma alternativa para melhorar as taxas de prenhez em programas de IA e IATF, em criatórios de búfalos.

#### 4. CONCLUSÕES

Conclui-se que o diluente Botu-Bov<sup>®</sup> foi igual ou superior para a maioria dos parâmetros avaliados pelo CASA, constituindo nova opção viável de meio extensor para a refrigeração do sêmen de búfalos.

A integridade da membrana espermática foi melhor preservada pelo extensor Botu-Bov<sup>®</sup> para o sêmen de búfalos refrigerado à 5°C por até 72 horas.

Com base nos resultados obtidos, é possível concluir que o extensor Botu-Bov<sup>®</sup> mostrou potencial *in vitro* para manter a qualidade do sêmen (motilidade individual, viabilidade e integridade da membrana espermática) durante a refrigeração à 5°C. Portanto, pode ser usado como alternativa em programas de IA e IATF de búfalos por até 48 horas, visando melhorar as taxas de prenhes.

#### AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT da Pecuária) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por cederem parte dos recursos para compra de material do experimento e pela concessão da bolsa, fator indispensável para o andamento e finalização do curso.

#### REFERÊNCIAS

- ADEEL, M.; IJAZ, A.; ALEEM, M. et al. Improvement of liquid and frozen-thawed semen quality of Nili-Ravi buffalo bulls (*Bubalus bubalis*) through supplementation of fat. *Theriogenology*, v.71, p.1220-1225, 2009.
- AHMED, H.; ANDRABI, S.M.H.; ANWAR, M. et al. Use of post-thaw semen quality parameters to predict fertility of water buffalo (*Bubalus bubalis*) bull during peak breeding season. *Andrologia*, p.1-6, 2016.
- AKHTER, S.; ANSARI, M.S.; RAKHA, B.A. et al. Effect of low density lipoproteins in extender on freezability and fertility of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull semen. *Theriogenology*, v.76, p.759-764, 2011a.
- AKHTER, S.; ANSARI, M.S.; RAKHA, B.A. et al. *In vitro* evaluation of liquid-stored buffalo semen at 5°C diluted in soya-lecithin based extender (Bioxcell<sup>®</sup>), Tris-citric egg yolk, skim milk and egg yolk-citrate extenders. *Reprod. Domest. Anim.* v.46, p.45-49, 2011b.
- ALMEIDA, J.; BRITO, M.F.; NEVES, B.P. et al. Evaluation of the pregnancy rates in primiparous buffaloes submitted to FTAI with refrigerated semen vs. frozen during the unfavorable breeding station. *Proceedings...* In: 31<sup>ST</sup> ANNUAL MEETING OF THE BRAZILIAN EMBRYO TECHNOLOGY SOCIETY (SBTE); Cabo de Santo Agostinho, PE, Brazil, August 17<sup>th</sup> to 19<sup>th</sup>, 2017. Abstracts. 666, *Anim. Reprod.*, Jul./Sept. v.14, n.3, p.666, 2017.
- ALMEIDA, J.; NEVES, B.P.; BRITO, M.F. et al. Pregnancy rates of buffaloes (*Bubalus bubalis*) using cooled or frozen semen at fixed time artificial insemination (FTAI) - Preliminary results. In: XI CONGRESSO MUNDIAL DE BÚFALOS - Cartagena - Colômbia, *Med. Vet. y Zootec.* p.183, Septiembre/Diciembre, 2016a.

ALMEIDA, J.; BECERRA, V.A.B.; NEVES, B.P. et al. Refrigeração de sêmen bubalino (*Bubalus bubalis*) frente a diferentes extensores e avaliação da motilidade espermática no CASA. *Proceedings ...* In: 30<sup>th</sup> ANNUAL OF THE BRAZILIAN EMBRYO TECHNOLOGY SOCIETY (SBTE), Foz do Iguaçu, PR, Brazil. August 25<sup>th</sup> to 27<sup>th</sup>, 2016, and 32<sup>th</sup> MEETING OF THE EUROPEAN EMBRYO TRANSFER ASSOCIATION (AETE), Barcelona, Spain, Septembere 9<sup>th</sup> and 10<sup>th</sup>, 2016. Abstracts. *Anim. Reprod.*, Jul./Sept. v.13, n.3, p.557, 2016b.

ALMEIDA, J.; BRITO, M.F.; AULER, P.A. et al. Avaliação das taxas de prenhez em búfalas com o uso de sêmen refrigerado vs. congelado em programas de IATF durante a estação reprodutiva desfavorável. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, Belo Horizonte, MG. *Anais...* Belo Horizonte: CBRA. v.21, n.99, 2015.

ARRUDA, R.P.; BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G. et al. Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para espermatozoides de garanhões utilizando análises computadorizadas da motilidade (CASA) e citometria de fluxo. *Acta Sci. Vet.*, v.31 (Suplemento), Porto Alegre: UFRGS, p.228-229, 2003.

BATELLIER, F.; VIDAMENT, M.; FAUQUANT, J. et al. Advances in cooled semen technology. *Anim. Reprod. Sci.*, v.68, p. 181-190, 2001.

BECCERRA, V.A.B. Efeito da adição de *Aniba canelilla*, blueberry e polifenol de chá verde sobre a viabilidade *in vitro* de espermatozoides de búfalo (*Bubalus bubalis*) resfriados a 5°C. 2017. 69f. Dissertação (Mestrado) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte.

BLESBOIS, E.; GRASSEAU, I.; HERMIER, D. Changes in lipid content of fowl spermatozoa after liquid storage at 2 a 5°C. *Theriogenology*, v.52, p.325-334, 1999.

BUCHER, A.; KASIMANICKAM, R.; HALL, J.B. et al. Fixed-time AI pregnancy rate following insemination with frozen-thawed or fresh-extended semen in progesterone supplemented CO-Synch protocol in beef cows. *Theriogenology*, v.71, p.1180-1185, 2009.

BRITO, M.F. Uso de lipoproteínas de baixa densidade, extraídas da gema de ovo, para a criopreservação do sêmen de búfalos. 2014. 96f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

BRITO, L.F.; BARTH, A.D.; BILODEAU-GOESSEIS, S. et al. Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with *in vitro* fertilization rate. *Theriogenology*, v.60, p.1539-1551, 2003.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3<sup>a</sup> ed. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, Belo Horizonte. 104p., 2013.

CELEGHINE, E.C.C. Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre a membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes. 2005. 186f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C. et al. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin, *Anim. Reprod. Sci.*, v.104, n.2-4, p.119-131, 2008.

CHACUR, M.G.M. Avaliação da congelação de sêmen bubalino com diluidores Glicina-Gema, Tryladil® e TES em diferentes tempos de equilíbrio. 1996. 116f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

CHACUR, M.G.M.; OBA, E.; GONZALES, C.I.M. Equilibrium time influence on motility, vigor and membrana integrity of thawed buffalo semen using Tryladil®, glycine-egg-york and TES extenders. In: WORD BUFFALO CONGRESS. 5 1997. Caserta. *Anais...* Caserta, Italy, p.846-849, 1997.

COX, J.F; ALFARO, V.; MONTENEGRO, V. et al. Computer-assisted analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm migration in cervical mucus. *Theriogenology*, v.66, p.860-867, 2006.

DHAMI, A.J., SAHNI, K.L. Effects of various cooling from 30°C to 5°C, equilibration and diluent treatments on freezability, post-thaw thermoresistance, enzyme leakage and fertility of bubaline spermatozoa. *Buffalo J.*, v.2, p.147-159, 1994.

EL-BADRY, D. A.; RAWASH, Z. M.; MANAL, B. et al. The effect of LDL from different bird's eggs on the freezability of buffalo spermatozoa. *Global Vet.*, v.14, n.2, p.158-165, 2015.

FARRELL, P.B.; FOOTE, R.H.; MCARDLE, M.M. Media and dilution procedures tested to minimize handling effects on human, rabbit, and bull sperm for computer-assisted sperm analysis (CASA). *J. Androl.*, v.17, p.293-300, 1996.

GARNER, D.L.; THOMAS, C.A.; GRAVANCE, C.G. et al. Seminal plasma addition attenuates the dilution effect in bovine sperm. *Theriogenology*, v.56, p.31-40, 2001.

HANCOCK, J.L. The morphology of boar spermatozoa. *J. Reprod. Microsc. Soc.*, n.76, p.84-97, 1957.

HIRAI, M.; CERBITO, W.A.; WIJAYAGUNAWARDANE, M.P.B. et al. The effect of viscosity of semen diluents on motility of bull spermatozoa. *Theriogenology*, v.47, p.1463-1478, 1997.

MAHMOUD, K.G.M.; EL-SOKARY, A.A.E.; ABOU EL ROOS, M.E.A. et al. Sperm Characteristics in Cryopreserved Buffalo Bull Semen and Field Fertility. *Iranian J. Appl Anim. Sci.*, v.3, n.4, p.777-783, 2013.

MELO, M.I.V.; HENRY, M.; BEKER, A.R.C.L. Teste hiposmótico para avaliação da viabilidade do sêmen equino resfriado com diferentes diluidores. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.57, n.6, p.757-763, 2005.

MORTIMER, S.T. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Hum. Reprod. Update*, v.3, n.5, p.403-439, 1997.

NEVES, M.M. Extração das lipoproteínas de baixa densidade da gema do ovo de *Gallus domesticus* e sua aplicação na criopreservação do sêmen canino. 2008. 116f. Tese (Doutorado) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte.

RASUL, Z.; AHMAD, N.; ANZAR, M. Changes in motion characteristics, plasma membrane integrity, and acrosome, morphology during cryopreservation of buffalo spermatozoa. *J. Androl.* v.22, n.2, p.278-283, 2001.

RIBEIRO, H.F.L.; LÁU, H.D.; SILVA, A.O.A. et al. Preliminary report on artificial insemination in buffaloes of the Amazon region, through imported semen. In: CONGRESSO MUNDIAL DOS CRIADORES DE BÚFALOS, 4, v.3, 1994, São Paulo. *Anais...* São Paulo: Associação Brasileira dos Criadores de Búfalos, p.591-593, 1994.

SALVADOR, D.F.; ANDRADE, V.J.; VALE FILHO, V.R. et al. 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.*, v.60, n.3, p.587-593, 2008.

SEVERO, N. C. Influência da qualidade do sêmen bovino congelado sobre a fertilidade. *H. Vet.*, ano 28, Jan-Fev, n.167, p.36-39, 2009.

SINGH, A.K.; SINGH, V.K.; NARWADE, B.M. et al. Comparative quality assessment of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen chilled (5°C) in egg yolk- and soya milk-based extenders. *Reprod. Domest. Anim.* v.47, p.596-600, 2012.

STATA CORP. Stata: Release 12. Statistical Software. College Station, TX: StataCorp LP, 2012.

TARIG, A.A.; WAHID, H.; ROSNINA, Y. et al. Effect of different concentrations of soybean lecithin and virgin coconut oil in Tris-based extender on the quality of chilled and frozen-thawed bull semen. *Vet. World.* 10, june, 2017.

VERBERCKMOES, S.; SOOM, A.V.; DEWULF, J. et al. Comparison of three diluents for the storage of fresh bovine semen. *Theriogenology*, v.63, p.912-922, 2005.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; OCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, v.57, n.1, p.149-179, 2002.

ZHANG, B.R.; LARSSON, B.; LUNDEHEIM, N. et al. Prediction of bull fertility by combined in vitro assessments of frozen-thawed semen from young dairy bulls entering an AI-Programme. *Int. J. Androl.* v.22, p.253-260, 1999.

### Capítulo 3 - USO DE SÊMEN BUBALINO REFRIGERADO COMO ESTRATÉGIA PARA INCREMENTAR AS TAXAS DE CONCEPÇÃO EM PROGRAMAS DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO, DURANTE O PERÍODO REPRODUTIVO DESFAVORÁVEL

J. Almeida<sup>a\*</sup>, M.F. Brito<sup>a</sup>, B.P. Neves<sup>a</sup>, V.A.B. Becerra<sup>a</sup>,  
P.A. Auler<sup>a</sup>, J.P. Hadad<sup>b</sup>, P.S. Baruselli<sup>d</sup>, Marc Henry<sup>c</sup>

<sup>1</sup> Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

<sup>2</sup> Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

<sup>3</sup> Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

<sup>4</sup> Departamento de Reprodução Animal, VRA-FMVZ-USP, São Paulo, São Paulo, Brasil.

\*Corresponding author. Tel.: +55 31 97174-3066

E-mail addresses: [jacialmeida01@yahoo.com.br](mailto:jacialmeida01@yahoo.com.br) (J. Almeida).

#### RESUMO

O objetivo do estudo foi comparar a eficiência reprodutiva de búfalas leiteiras submetidas a protocolos de IATF, à base de progesterona/estrógeno (P<sub>4</sub>/E<sub>2</sub>) e eCG, durante a estação reprodutiva desfavorável, utilizando sêmen refrigerado (SR) e sêmen congelado (SC). Foram utilizadas 446 búfalas em lactação (> 40 dias pós-parto) distribuídas aleatoriamente em 4 blocos: B1 (n = 143), B2 (n = 34), B3 (n = 90) e B4 (n = 179), sendo cada bloco subdividido em 2 para que houvesse a IA com SR e SC do mesmo ejaculado de cada touro. Assim a subdivisão dos blocos ficou da seguinte forma: B1 (SR = 71 e SC = 72); B2 (SR = 18 e SC = 16); B3 (SR = 47 e SC = 43) e B4 (SR = 90 e SC = 89), sendo que os blocos correspondiam aos anos de 2014, 2015, 2016 e 2017, respectivamente. Foram utilizados ejaculados de 8 touros Murrah obtidos por coleta com vagina artificial. As amostras de sêmen foram fracionadas em 2 alíquotas: uma diluída em extensor comercial Botu-Bov<sup>®</sup> para a refrigeração (BB-SR, G1) e a outra diluída no mesmo extensor, e usado para congelamento (BB-SC, G2). As alíquotas do grupo BB-SR, G1 foram refrigeradas a 5°C/24 horas utilizando uma geladeira. As outras alíquotas do grupo BB-SC, G2 foram refrigeradas igualmente, e após as 4 horas de equilíbrio a 5°C, foram acondicionadas a 5 cm da superfície de nitrogênio líquido, utilizando-se uma caixa de isopor de 21 litros. Para a sincronização foi usado o protocolo iniciado em dia aleatório do ciclo estral. Na tarde (T) D0 (14:00hs), os animais receberam 2,0 mg i.m de BE (Estrogin<sup>®</sup>, Farmavet, SP, Brasil) e implante auricular (CRESTAR<sup>®</sup> 3,0 mg de P<sub>4</sub>, MSD, Brasil), no D9 (T) retirada do implante e aplicação de 400UI i.m eCG (Folligon<sup>®</sup> 5000, MSD, Brasil) + 0,530 mg de PGF<sub>2α</sub> Cloprostenol i.m (Sincrocio<sup>®</sup>, Ourofino, SP, Brasil). No D10 (T) aplicados 1,0 mg i.m de BE (Estrogin<sup>®</sup>), no D12 (8:00hs) IA. No D42 foram realizados os diagnósticos de gestação por US (Aloka-SSD 500, probe de 5 MHz, Tokyo, Japan), para verificar as taxas de concepção (TC). As TC totais foram de 48,2% (G1) e 34,6% (G2) para os anos de 2014 a 2017, obtendo-se uma diferença estatística significativa (p<0,05) de 13,6%. Conclui-se que búfalas leiteiras apresentaram TC superior para o sêmen refrigerado, quando submetidas a programas de IATF à base de P<sub>4</sub>/E<sub>2</sub> e eCG.

**Palavras-chave:** Fertilidade, sincronização do estro, sêmen refrigerado.

#### 1. INTRODUÇÃO

O rebanho bubalino brasileiro é estimado em 1.319.478 cabeças (FAO, 2016), entretanto, apenas 1% das fêmeas em idade reprodutiva são inseminadas (IBGE, 2013). Isto se deve principalmente ao pequeno número de reprodutores com qualidade genética disponíveis;



reduzido número de búfalos em coleta para congelamento de sêmen nas Centrais Comerciais, ocasionando falta de sêmen no mercado nacional, situação que se agrava pela proibição de importar animais de países da Ásia e Itália que apresentam bubalinocultura mais avançada.

Existem ainda outros fatores como a falta de programas práticos e viáveis de inseminação artificial (IA) que possibilitem a multiplicação de genética superior com a utilização em larga escala de sêmen importado da Itália ou Bulgária; dificuldade de detecção do estro na espécie, devido à baixa frequência de comportamento homossexual durante o estro (Baruselli, 1992), períodos variáveis de aceitação de cio variando entre 6-48 hs (Porto-Filho *et al.*, 1999), acarretando dificuldade e levando a um maior custo com mão-de-obra (Baruselli, 1996) e uma restrição de material com genética superior.

Face aos diversos problemas mencionados anteriormente, algumas soluções têm sido propostas, como: o uso da IATF, que permite inseminar um grande número de vacas em dia e hora pré-determinada, sem a necessidade de observação de cio. Além disso, a IATF possibilita, a inseminação de um grande número de vacas no início da estação de monta, diminuindo o intervalo entre partos e permiti o descarte de fêmeas que ficariam vazias no final da estação de monta (Baruselli *et al.*, 2004). Esta técnica permite ainda, antecipar a concepção e a parição dentro das respectivas estações reprodutivas, além de aumentar a probabilidade de nova prenhez na estação subsequente e concentrar os nascimentos (Gottschall *et al.*, 2008). Pesquisas relataram que a IATF é uma biotecnia que agrega os benefícios do melhoramento genético com o manejo reprodutivo, pois permite que um número maior de búfalas, sejam artificialmente inseminadas e possibilita adicionalmente a inseminação em épocas desfavoráveis (primavera e verão) para a reprodução natural (Carvalho *et al.*, 2011).

É sabido que os espermatozoides criopreservados tem uma menor meia-vida no trato reprodutor feminino, em comparação com sêmen fresco (Curry, 2000) e que a redução do número ou qualidade do espermatozoide utilizado para inseminação resulta numa diminuição exponencial na fertilidade dos animais (Watson, 2000).

Vislumbrando solucionar os problemas relacionados ao sêmen congelado, o sêmen refrigerado surge como uma alternativa para minimizar os danos causados aos espermatozoides no processo de congelamento. Os danos causados pelo resfriamento são potencialmente menores daqueles causados pelo congelamento tendo como desvantagem a menor longevidade da preservação dos espermatozoides fora do trato reprodutivo. No entanto, o sêmen resfriado preserva melhor a viabilidade espermática que por sua vez permite a redução da dose inseminante, possui maior longevidade no trato reprodutor feminino, assegurando taxas de fertilização mais elevadas. Isto é particularmente interessante no caso de ovulação assíncrona no momento da inseminação (Bucher *et al.*, 2009). O uso da técnica de resfriamento como alternativa ao congelamento permite a otimização e inclusão em programas de IA de reprodutores de alto mérito genético que possuem espermatozoides com baixa resistência ao congelamento. Além disto a ausência de custos relacionados à estocagem e simplicidade na manipulação/utilização na IA quando comparado ao sêmen congelado (Vishwanath, 2003).

Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo comparar a eficiência reprodutiva de búfalas leiteiras submetidas a protocolos de IATF à base de progesterona/estrógeno ( $P_4/E_2$ ) e eCG, durante a estação reprodutiva desfavorável (primavera e verão), comparando o sêmen refrigerado e sêmen congelado.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Ética

O presente estudo foi realizado após aprovação de todos os procedimentos pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (EV/UFMG), segundo o protocolo nº 368/2015.

### 2.2. Local do experimento

O experimento foi conduzido na Fazenda Bom Destino, localizada no Distrito de Morro do Ferro em Oliveira, Minas Gerais, Latitude 20°41'45" Sul e Longitude 44°49'37" Oeste, no período reprodutivo desfavorável (PRD - primavera e verão), durante os anos de 2014 a 2017.

### 2.3. Reprodutores utilizados

Foram utilizados oito touros Murrah (*Bubalus bubalis*) da própria fazenda, com as seguintes características médias: 6,4 anos de idade; escore de condição corporal (ECC) = 3,6 (1-5); peso 763,8 kg e PE = 36,9 cm. Os reprodutores apresentavam histórico de fertilidade conhecida, eram mantidos separados das fêmeas, sendo selecionados a partir de pré-condicionamento para coleta com vagina artificial e apresentasse ejaculado que atendesse as características físicas e morfológicas segundo recomendação do Manual de Andrologia (CBRA, 2013).

### 2.4. Coleta do sêmen

As coletas foram realizadas com vagina artificial, à temperatura interna entre 42-45°C (Sansone *et al.*, 2000; Ohashi *et al.*, 2011 e Vale, 2011). Acoplados a vagina foram utilizados copos coletores (tubos plásticos 15 mL), graduados e estéreis, previamente aquecidos e protegidos com uma camisa isotérmica para evitar contato com os raios ultravioleta (UV) e as mudanças bruscas de temperatura, que pudessem afetar o sêmen. Antes de cada coleta foi induzida uma falsa monta na primeira tentativa (sem coleta de sêmen, com intuito de aumentar a concentração espermática do ejaculado), sendo o ejaculado da segunda monta coletado e imediatamente direcionado para o laboratório, colocado em banho-maria a 37°C, para as análises de motilidade e vigor espermático, usando microscopia de luz.

### 2.5. Concentração e processamento do sêmen

A concentração espermática foi determinada utilizando uma câmara de Neubauer, para a obtenção, após diluição final,  $50 \times 10^6$  SPTZ/mL. A amostra de sêmen foi dividida em duas alíquotas: uma diluída em extensor comercial Botu-Bov<sup>®</sup> (Botupharma, Botucatu/SP, Brasil) para a refrigeração (BB-SR) e outra diluída no mesmo extensor, e usada para congelamento (BB-SC). Após o envase em palhetas de 0,5 mL (IMV<sup>®</sup> Technologies, L'Aigle Cedex, França), as amostras foram submetidas a dois tipos de processamento. Inicialmente o sêmen diluído em BB-SR e BB-SC, tiveram as amostras (palhetas) acondicionadas em saco plástico e, então, submersos em recipiente de vidro com água (260 mL) a 27°C. O recipiente a 27°C foi colocado dentro de outro recipiente de vidro contendo água (0,5 L) estabilizada na geladeira (frigobar vertical com as dimensões: 47 cm de largura x 59,5 cm de altura x 45 cm de profundidade) a temperatura constante de 5°C. As amostras permaneceram, desta forma, por 4 horas de equilíbrio, obtendo-se curva de resfriamento de 0,25°C/minuto (de 27 a 5°C/média do período avaliado). Após esse tempo, o sêmen destinado a ser refrigerado foi mantido por mais 20 horas a temperatura de refrigeração de 5°C. As palhetas do grupo congelamento, foram dispostas a 5 cm da superfície do nitrogênio líquido (N<sub>2</sub>) colocadas em uma caixa de poliestireno (39,0 cm de

comprimento x 19 cm de largura e 30,0 cm de altura). Após 20 minutos as palhetas foram submersas no N<sub>2</sub>. Todas as amostras foram avaliadas antes da utilização para inseminação artificial; cujas normas mínimas de qualidade foram: sêmen refrigerado (motilidade total > 50% e total de defeitos de espermatozoides ≤ 20%) e sêmen congelado (motilidade total > 30% e total de defeitos de espermatozoides ≤ 20%).

## 2.6. Transporte do sêmen

No ano de 2017, por fatores não identificados, houve dificuldade em conseguir touros que mantivessem uma regularidade de ejaculados com qualidade e, que permitissem a refrigeração e congelamento do sêmen, nas semanas em que seriam realizadas as IATF, a mesma propriedade onde estavam as matrizes a serem inseminadas. Diante desse problema, foi necessário coletar e processar o sêmen para a refrigeração e congelamento de touros presentes em outra propriedade, localizada a 230 km do local onde seriam realizadas as inseminações.

Após os processos de refrigeração e congelamento do sêmen dos touros, que seriam utilizados para as IAs, o material foi preparado e transportado até o local onde seriam realizados as IAs. Para isso, o sêmen refrigerado a 5°C, foi acondicionado em uma caixa de poliestireno própria para o transporte, mantendo uma temperatura constante de 5°C até a chegada a propriedade onde seria utilizado. Após chegar a propriedade, esse material era colocado em uma geladeira com temperatura de 5°C, permanecendo até o outro dia, quando seria utilizado no período da manhã, apresentando um tempo de aproximadamente 24 horas a 5°C.

A outra parte do ejaculado que foi congelada de forma idêntica ao que vinha sendo realizado nos anos anteriores, foi acondicionada em botijão de nitrogênio e transportada até o local onde seriam realizadas as IAs. Ambos os tipos de sêmen foram transportados em um mesmo veículo e manipulados pelos mesmos indivíduos, que realizaram os processamentos dos ejaculados para os anos anteriores do experimento.

## 2.7. Matrizes utilizadas

Foram utilizadas 446 fêmeas da raça Murrah e mestiças com as seguintes características médias: idade = 5,7 anos; ECC = 3,8 (1-5); peso = 654,3 kg, multíparas e lactantes (> 40 dias pós-parto) distribuídas igualmente entre os grupos e mantidas em pastagem de Tifton (*Cynodon spp*) durante todo o experimento, com livre acesso à sal mineral e água *ad libitum*.

## 2.8. Distribuição das fêmeas para inseminação artificial

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro blocos de acordo com o ano: B1 = 143 (2014), B2 = 34 (2015), B3 = 90 (2016) e B4 = 179 (2017), sendo cada bloco subdividido em dois para que houvesse a IA com sêmen refrigerado (SR) ou congelado (SC) do mesmo ejaculado e do mesmo touro, mantendo-se um equilíbrio entre animais cíclicos e acíclicos entre os grupos. Assim a subdivisão dos blocos ficou da seguinte forma esquematizada: B1 (SR = 71 e SC = 72); B2 (SR = 18 e SC = 16); B3 (SR = 47 e SC = 43) e B4 (SR = 90 e SC = 89).

## 2.9. Protocolo de sincronização

As fêmeas foram submetidas a avaliações de dinâmica ovariana com um transdutor linear de 5.0 MHz (Aloka-SSD 500, Tokyo, Japan). As avaliações ultrassonográficas foram realizadas pelo mesmo examinador, usando as mesmas configurações e resoluções de imagem. As fêmeas foram avaliadas de acordo com: ciclicidade a búfala foi considerada cíclica quando da presença de um CL ao momento da colocação do iP4 (CLD0) e búfalas não cíclicas ( $\emptyset F < 0,3$  mm) mensurou-se o diâmetro dos folículos ( $\emptyset F$ ). Outra avaliação ultrassonográfica foi

realizada no dia da IA (D12) para verificar a resposta dos animais ao protocolo e posteriormente todos os animais independentemente da resposta apresentada foram inseminados.

Na sincronização do ciclo estral foi utilizado o seguinte protocolo: Na tarde (T) D0 (14:00hs), os animais receberam 2,0 mg i.m de benzoato de estradiol (BE, Estrogin<sup>®</sup>, Farmavet, SP, Brasil) e implante auricular (CRESTAR<sup>®</sup> 3,0 mg de P<sub>4</sub>, MSD, Brasil), no D9 (T) retirada do implante e aplicação de 400UI i.m eCG (Folligon<sup>®</sup> 5000, MSD, Brasil) + 0,530 mg de PGF<sub>2</sub> $\alpha$  Cloprostenol i.m (Sincrocio<sup>®</sup>, Ourofino, SP, Brasil). No D10 (T) aplicados 1,0 mg i.m de BE (Estrogin<sup>®</sup>), na manhã (M) D12 (8:00hs) IA.

### 2.10. Diagnóstico de gestação

No D42 foi utilizado a ultrassonografia (US - Aloka-SSD 500, transdutor de 5 MHz, Tokyo, Japan), para verificar a prenhez. Sendo considerado como positivo quando visualizada a vesícula embrionária e/ou confirmado com a visualização dos batimentos cardíacos do embrião. Os touros foram colocados nos lotes somente 15 dias depois da IA para não gerar confundimento na hora do diagnóstico de gestação.

### 2.11. Análise estatística

Para a análise estatística, a variável diagnóstico de prenhez, foi utilizada como variável dependente. As variáveis ano da inseminação, idade, peso, dias pós-parto e ECC foram utilizadas como variáveis independentes buscando uma associação entre essas e a dependente. Em alguns momentos foram utilizadas a forma de preservação do sêmen como uma segunda fonte de variação. Foi verificada a existência de associação através de tabelas de contingência utilizando o teste qui-quadrado (Sampaio, 2007).

No caso de verificação de associação entre o diagnóstico de prenhez e alguma variável com mais de duas categorias (nominal) foi utilizado a regressão logística para verificar quais das categorias tinham associação e a força da associação medida pela razão de chances (*odds ratio*) (Dohoo, 2010).

## 3. RESULTADOS

### 3.1. Caracterização da atividade ovariana

Na Tabela 13 encontram-se sumarizadas as classificações das estruturas ovarianas das búfalas submetidas a ultrassonografia, durante os quatro anos de estudo. É possível verificar que mais de 50% dos animais encontravam-se em anestro antes do início do protocolo de indução de cio. Observou-se também que os animais possuem maior atividade cíclica no ovário direito quando comparado ao esquerdo ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença entre o percentual de folículos dominantes por ovário, já o percentual de animais com folículos pequenos (anestro) foi superior a soma dos dois ovários com folículos dominantes.

Tabela 13 - Estruturas ovarianas das búfalas submetidas ao exame ginecológico antes da indução e sincronização do cio para inseminação artificial em tempo fixo, somatório dos anos de 2014 a 2017.

Estruturas ovarianas					
Ausência n(%)	CLOD n(%)	CLOE n(%)	FDOD n(%)	FDOE n(%)	Total n(%)
257/57,6 <sup>a</sup>	121/27,1 <sup>b</sup>	55/12,3 <sup>c</sup>	6/1,3 <sup>d</sup>	7/1,6 <sup>d</sup>	446/100,0

Médias com letras distintas diferem entre si ( $p < 0,05$ ); n = número e % = percentagem. CLOD = Corpo lúteo no ovário direito; CLOE = Corpo lúteo ovário esquerdo; FDOD = Folículo dominante ovário direito e FDOE = Folículo dominante ovário esquerdo.

### 3.2. Caracterização do diâmetro folicular ( $\emptyset$ )

Dentre os quatro anos avaliados, verifica-se que a caracterização dos folículos ( $\emptyset F$ ) variou, sendo possível observar que no ano de 2014, os folículos presentes estavam agrupados em duas categorias de acordo com o tamanho folicular (Tabela 14). Nos dois anos consecutivos de avaliação (2015 e 2016) os animais apresentaram os ovários com caracterização similar, sendo enquadrados na mesma categoria.

Tabela 14 - Valores médios de diâmetro folicular das búfalas submetidas ao exame ginecológico antes da indução e sincronização do cio para inseminação artificial em tempo fixo, durante os anos de 2014 a 2017.

Anos	Diâmetro folicular		
	< 0,50 mm % (n/N)	0,50-10,0 mm % (n/N)	>10,0 mm % (n/N)
2014	0,0(0/143)	45,5(65/143)	54,5(78/143)
2015	0,0(0/34)	100,0(34/34)	0,0(0/34)
2016	0,0(0/90)	100,0(90/90)	0,0(0/90)
2017	100,0(179/179)	0,0(0/179)	0,0(0/179)
<b>Total</b>	<b>40,1<sup>a</sup>(179/446)</b>	<b>42,4<sup>a</sup>(189/446)</b>	<b>17,5<sup>b</sup>(78/446)</b>

Médias com letras distintas nas linhas diferem entre si ( $p < 0,05$ ); % = porcentagem; n = número de fêmeas de acordo com o diâmetro folicular e N = total de fêmeas avaliadas por grupo. \* Estão inclusas as fêmeas com corpo lúteo.

A taxa de ciclicidade total durante os três primeiros anos de estudo foi de 59,9% (267/446) para as búfalas sincronizadas durante a período reprodutivo desfavorável (Tabela 14).

### 3.3. Efeito ano

As taxas de gestação totais (SR + SC) encontradas para os quatro anos de avaliação, não diferiram entre si, mantendo-se sempre inferior a 50% (Tabela 15).

Tabela 15 - Taxas médias de concepção total de acordo com o ano, entre búfalas que foram submetidas a IATF (sêmen refrigerado e congelado), durante o período reprodutivo desfavorável (outubro a dezembro) entre os anos de 2014 a 2017.

Anos	Gestantes % (n/N)
2014	39,2(56/143)
2015	44,1(15/34)
2016	43,3(39/90)
2017	41,9(75/179)
<b>Total</b>	<b>41,5(185/446)</b>

% = porcentagem; n = número de fêmeas por grupo; N = total de fêmeas avaliadas por grupo e  $p > 0,05$ .

### 3.4. Tipo de sêmen utilizado (refrigerado e congelado)

Observa-se que o uso e produção de sêmen bubalino na forma refrigerada, é positivamente superior ( $p < 0,05$ ) ao sêmen congelado, para taxa de concepção na IATF, em protocolos durante o período reprodutivo desfavorável (Tabela 16). Houve uma diferença na taxa de concepção entre o sêmen refrigerado e congelado de 11,8; 12,5; 25,1 e 9,5% favorável ao sêmen refrigerado para os anos de 2014, 2015, 2016 e 2017, respectivamente.

Tabela 16 - Taxas médias de concepção de acordo com o ano, em búfalas que foram submetidas a IATF, durante o período reprodutivo desfavorável (outubro a dezembro), utilizando sêmen refrigerado ou congelado nos anos de 2014 a 2017.

Anos	Tipo de sêmen	
	Refrigerado %(n/N)	Congelado %(n/N)
2014	45,1 <sup>a</sup> (32/71)	33,3 <sup>b</sup> (24/72)
2015	50,0 <sup>a</sup> (09/18)	37,5 <sup>b</sup> (06/16)
2016	55,3 <sup>a</sup> (26/47)	30,2 <sup>b</sup> (13/43)
2017	46,6 <sup>a</sup> (42/90)	37,1 <sup>b</sup> (33/89)
<b>Total</b>	<b>48,2<sup>a</sup>(109/226)</b>	<b>34,6<sup>b</sup>(76/220)</b>

Médias com letras distintas nas linhas diferem entre si ( $p < 0,05$ ); % = percentagem; n = número de fêmeas gestantes e N = total de fêmeas avaliadas por grupo.

### 3.5. Efeito dias pós-parto

Quando avaliada a taxa de concepção entre os animais de acordo com o número de dias pós-parto, verifica-se que os melhores resultados obtidos para o sêmen refrigerado e congelado foram no intervalo entre 60 e 90 dias pós-parto (Tabela 17).

Tabela 17 - Taxas médias de concepção de acordo com o número de dias pós-parto, em búfalas que foram submetidas a IATF, durante o período reprodutivo desfavorável (outubro a dezembro), utilizando sêmen refrigerado ou congelado, somatório dos anos de 2014 a 2017.

Tipo de sêmen	Taxas de concepção em dias pós-parto		
	30-60 %(n/N)	60-90 %(n/N)	> 90 %(n/N)
Sêmen refrigerado	48,5 <sup>Aa</sup> (16/33)	56,9 <sup>Aa</sup> (33/58)	44,4 <sup>Aa</sup> (60/135)
Sêmen congelado	30,6 <sup>Ba</sup> (11/36)	38,6 <sup>Ba</sup> (22/57)	33,9 <sup>Ba</sup> (43/127)
<b>Total</b>	<b>39,1<sup>b</sup>(27/69)</b>	<b>47,8<sup>a</sup>(55/115)</b>	<b>39,3<sup>b</sup>(103/262)</b>

Médias com letras distintas (maiúscula na coluna e minúscula na linha) diferem entre si ( $p < 0,05$ ); % = percentagem; n = número de fêmeas gestantes e N = total de fêmeas avaliadas por grupo.

### 3.6. Efeito do escore de condição corporal (ECC)

Na Tabela 18 é possível observar que as búfalas respondem bem ao protocolo de sincronização, quando possuem ECC superior a 3 e menor que 4,5. Ficando evidente que o baixo como o elevado ECC foram prejudiciais a concepção para a espécie.

Tabela 18 - Taxas médias de concepção de acordo com o escore de condição corporal (ECC) em búfalas submetidas à IATF, no período reprodutivo desfavorável (outubro a dezembro) de 2014 a 2017.

Taxa de concepção	Escore de Condição Corporal			Total
	≤ 3,0 %(n/N)	> 3,0 e ≤ 4,0 %(n/N)	> 4,0 e ≤ 5,0 %(n/N)	
Sêmen refrigerado	48,2 <sup>Aa</sup> (27/56)	48,1 <sup>Aa</sup> (64/133)	48,6 <sup>Aa</sup> (18/37)	<b>48,2<sup>A</sup>(109/226)</b>
Sêmen congelado	45,8 <sup>Aa</sup> (33/72)	32,5 <sup>Bb</sup> (37/114)	17,6 <sup>Bc</sup> (6/34)	<b>34,5<sup>B</sup>(76/220)</b>
<b>Total</b>	<b>46,9<sup>a</sup>(128)</b>	<b>40,9<sup>b</sup>(247)</b>	<b>33,8<sup>c</sup>(71)</b>	<b>41,5(185/446)</b>

Médias com letras distintas (maiúscula na coluna e minúscula na linha) diferem entre si (p<0,05); % = taxa de concepção; n = número de fêmeas gestantes e N = número de fêmeas avaliadas por grupo.

### 3.7. Concepção geral por diâmetro folicular

Os animais foram divididos em três grupos de acordo com o diâmetro folicular (Tabela 19).

Tabela 19 - Taxas médias de concepção das búfalas submetidas a IATF, de acordo com o diâmetro folicular, durante os anos de 2014 a 2017 de acordo com o diâmetro folicular durante os anos de 2014 a 2017.

Anos (2014 a 2017)	Diâmetro folicular		
	< 0,5 mm %(n/N)	< 0,5 mm %(n/N)	< 0,5 mm %(n/N)
Taxa de concepção*	41,9 <sup>a</sup> (75/179)	39,2 <sup>a</sup> (74/189)	46,2 <sup>a</sup> (36/78)

\* p>0,05; % = percentagem; n = número de fêmeas gestantes e N = total de fêmeas avaliadas por grupo.

### 3.8. Efeito touro

A variável touro não afetou a taxa de concepção das búfalas nos anos de estudo durante os períodos reprodutivos desfavoráveis (Tabela 20).

Tabela 20 - Taxas médias de concepção na IATF de búfalas com sêmen refrigerado e congelado por touro (n=8), durante os períodos reprodutivos desfavoráveis (outubro a dezembro) de 2014 a 2017.

Parâmetros	Reprodutores							
	1 %(n/N)	2 %(n/N)	3 %(n/N)	4 %(n/N)	5 %(n/N)	6 %(n/N)	7 %(n/N)	8 %(n/N)
Prenhez	40,0 <sup>a</sup> (36/90)	40,4 <sup>a</sup> (19/47)	47,6 <sup>a</sup> (20/42)	39,2 <sup>a</sup> (29/74)	36,7 <sup>a</sup> (11/30)	43,0 <sup>a</sup> (34/79)	43,9 <sup>a</sup> (25/57)	40,7 <sup>a</sup> (11/27)

\* p>0,05); % = percentagem; n = número de fêmeas gestantes e N = total de fêmeas avaliadas por grupo.

### 3.9. Logística final mista

Tabela 21 - Resultados do fator de risco (*Razão de Odds Ratio*) para a taxa de concepção bubalina, com o uso do sêmen refrigerado e congelado, em protocolos de sincronização contendo progesterona, estrógeno e eCG, durante o período reprodutivo desfavorável (outubro a dezembro).

Variável	OD (%)	EP
Sêmen refrigerado	48,2 <sup>a</sup>	33,2
Sêmen congelado	34,5 <sup>b</sup>	32,1
Variância entre sêmen	13,7	04,6

Médias com letras distintas nas colunas diferem entre si ( $p < 0,05$ ); % = Percentagem; OR = Odds Ratio; EP = Erro padrão.

### 3.10. Teste de comparação de proporções

Tabela 22 - Taxas médias de concepção e probabilidade de prenhez após a sincronização estral em função do tipo de sêmen utilizado para búfalos.

Tipo de sêmen	Concepção (%)	Probabilidade de prenhez	Z (chances)
Sêmen refrigerado	48,2 <sup>a</sup>	41,7	-
Sêmen congelado	34,5 <sup>b</sup>	28,3	-
Variância entre sêmen	13,7	4,6	2,9

Médias com letras distintas nas colunas diferem entre si ( $p < 0,05$ ) e % = Percentagem de prenhez.

## 4. DISCUSSÃO

Durante o PRD (primavera e verão), as búfalas não fertilizadas apresentam alta incidência de anestro fisiológico, o que aumenta o intervalo parto concepção e, conseqüentemente, afeta negativamente o desempenho reprodutivo (Baruselli *et al.*, 2009). Os resultados apresentados na Tabela 13 demonstraram uma alta taxa de anestro 57,6%, concentrada no ano de 2017. A provável explicação para este achado se deve ao momento em que os animais foram avaliados pelo exame ginecológico e de ultrassonografia, período de fevereiro a início de março, momento em que ainda não tinham começado a ciclar de acordo com a localização da propriedade em relação a linha do equador.

Outros fatores que podem ter contribuídos para o alto índice de fêmeas em anestro no ano de 2017 foram: substituição de uma parte do rebanho da fazenda, sendo adquiridos animais de outras regiões do Brasil que pertenciam a outra categoria (primíparas) diferente dos animais trabalhados nos anos anteriores (multíparas). Estes animais possuíam ECC inferior aos animais oriundos da propriedade, além de serem animais mestiços da raça Mediterrânea, diferentes dos animais mestiços da raça Murrah que predominavam na fazenda. Adicionalmente, houve mudança de manejo dos animais nesse ano específico (2017), ocorrendo a redução do fornecimento de suplementação de silagem de milho no cocho; migração dos animais para o sistema de pastejo em piquetes de Tifton (*Cynodon spp*); mudança no horário da ordenha da tarde (passando de 16:00 hs para e 14:00 hs), fatores que certamente geraram maior estresse.

Segundo Rhodes *et al.* (2003) ovulação e o estro pós-parto em bovinos de leite, são atrasados pela redução do efeito de retroalimentação positiva do estradiol (E<sub>2</sub>) sobre a liberação



do LH pela hipófise e da concentração sanguínea de metabólicos tais como a insulina e o fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-1), causadas por uma variedade de fatores ambientais. Ainda segundo estes autores, a ingestão limitada de energia, as baixas reservas corporais, o aumento no direcionamento de energia para a produção de leite, a amamentação e as doenças do periparto podem ser citados como os principais fatores relacionados ao atraso no retorno à ciclicidade ovariana. Efeitos similares devem ocorrer com as fêmeas bubalinas em produção leiteira, explicando dessa forma em parte, os elevados índices de anestro encontrados neste estudo.

O segundo parâmetro com maior percentual encontrado foi o de animais que apresentavam 27,1% de CLOD contra 12,3% de CLOE. Tendência esta que contraria os achados de Danell (1987), reportando 48,8% de CLOD e 51,2% de CLOE. Porém, outros estudos devem ser realizados para confirmar os resultados desta pesquisa e verificar se há realmente uma diferença de presença de CL entre os ovários, ou ainda se há diferença entre os percentuais de CLs durante os PRF (outono e inverno) e PRD (primavera e verão).

Na avaliação dos ovários antes da IA através da ultrassonografia, foi possível observar que nos três primeiros anos de estudo os ovários apresentavam folículos com diâmetro superior a 0,50 mm, sendo que no ano de 2014 (45,5%) dos folículos encontravam-se entre 0,50 e 10,0 mm e 54,5% maior que 10,0 mm (Tabela 14). Nos dois anos consecutivos (2015 e 2016) todos os animais apresentaram folículos com diâmetro entre 0,50 e 10,0 mm.

Já no último ano de avaliação ovariana, foi verificado que todos os animais estavam acíclicos (Tabela 14). A provável explicação para este achado se deve ao momento em que os animais foram avaliados pelo exame ginecológico e ultrassonográfico, período de fevereiro a início de março, momento em que as fêmeas ainda não tinham começado a ciclar, de acordo com a estação e latitude da localização da propriedade.

No presente estudo, trabalhando no período de transição para a entrada na estação reprodutiva fisiológica, as taxas de concepção totais não tiveram diferença significativa ( $p>0,05$ ) para os quatro anos de avaliação, variando de 39,2 a 44,1% (Tabela 15). Os valores encontrados, estão próximos aos relatados por outros pesquisadores que trabalharam com a mesma dosagem de eCG (400UI) para búfalas durante a PRD (Porto Filho *et al.*, 2004 e Frares *et al.*, 2013), sendo reportado 43,1 e 37,0%, respectivamente. Também há relatos de fêmeas em anestro (PRD) com taxas de concepção superiores 62,7% após indução (Carvalho *et al.*, 2016).

Foi possível verificar que não houve diferença estatística significativa ( $p>0,05$ ) entre os tipos de sêmen utilizados (SR e SC) para os anos avaliados (Tabela 16). No entanto, houve diferença estatística significativa ( $p<0,05$ ) entre os tipos de sêmen utilizados (SR e SC) dentro de cada ano, sendo os resultados favoráveis ao sêmen refrigerado. Observou-se taxas de concepção de 48,2% para os animais inseminados com sêmen refrigerado e de 34,6% para os animais inseminados com sêmen congelado, sendo obtida uma diferença estatística significativa ( $p<0,05$ ) de 13,7%.

Embora a quantidade de espermatozoides que atingem o local de fertilização seja reduzida em relação ao número de espermatozoides utilizados na dose inseminante (Januskauskas e Zilinskas, 2002), pode-se supor que o sêmen bubalino refrigerado garanta um maior número de espermatozoides acessórios intactos capazes de fertilização em comparação com sêmen congelado, justificando assim o uso de sêmen refrigerado.

As inseminações realizadas no presente estudo foram efetuadas no período da manhã seguindo orientação descrita por Baruselli (1994). Isto, porque, segundo o autor, a taxa de concepção em animais inseminados pela manhã é superior as taxas obtidas com as inseminações realizadas no período da tarde (72,2 e 46,3%, respectivamente). No entanto esses valores foram obtidos para sêmen congelado e não para sêmen refrigerado.

O intervalo entre parto e realização da IA exerceu um efeito sobre o índice de fertilidade obtido. O intervalo de 60 a 90 dias mostrou valores de fertilidade superiores, isto foi notado somente para o sêmen congelado (Tabela 17). O sêmen refrigerado apresentou diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) ao sêmen congelado para todas os períodos de dias pós-parto considerados. A explicação mais plausível para os resultados superiores de fertilidade entre 60 e 90 dias pós-parto encontradas neste estudo, se devem a fertilidade ser menor com poucos dias pós-parto, isto porque o primeiro estro é menos fértil, seja devido à sua precocidade, ou porque ainda não ocorreu a total recuperação do sistema reprodutor das fêmeas, e/ou devido aos animais ainda apresentarem menor condição corporal ao início do tratamento hormonal.

O estresse térmico desencadeia em vacas de leite alterações nas concentrações plasmáticas de hormônios e metabólitos, como é o caso da elevação na produção e secreção dos glicocorticóides, em especial o cortisol. Níveis elevados de cortisol, em decorrência do estresse, são capazes de inibir a secreção de GnRH pelo hipotálamo e de LH pela hipófise, hormônios essenciais na fase folicular e pré-ovulatória (Breen *et al.*, 2005). Efeitos similares provavelmente ocorrem com as búfalas leiteiras, o que ajuda a explicar os efeitos observados nesse estudo. Entretanto, nossos dados não permitem uma avaliação precisa porque o “n” é pequeno.

Já os resultados inferiores obtidos para a categoria com maior intervalo de dias pós-parto, se deve provavelmente a animais que mantiveram uma aciclia por um período mais prolongado no pós-parto, ou mesmo porque nem todas as fêmeas ovulam após serem submetidas a um protocolo de sincronização. Neste contexto, o ideal é que se realizassem avaliações ultrassonográficas nos animais no dia da IA e somente os animais que tivessem respondido positivamente ao protocolo de sincronização sejam inseminados. No entanto, neste estudo após a avaliação ultrassonográfica no dia da IA, todos os animais foram inseminados, para verificar se haveria alguma diferença em relação aos tipos de sêmen utilizados (SR e SC), tendo em vista que o sêmen refrigerado permanece viável no tracto reprodutor feminino por mais tempo comparado ao sêmen congelado. Assim todas as fêmeas que foram sincronizadas foram inseminadas.

Outras possíveis causas de resultados inferiores obtidos nas taxas de concepção, nos animais com maior tempo pós-parto, poderiam ser associadas as diferenças entre raça, categoria animal (primíparas ou múltíparas, lactantes ou solteiras), tamanho do folículo dominante no momento da indução de ovulação e manifestação de estro ao fim do protocolo (Sá Filho *et al.*, 2009) ou outras causas desconhecidas.

As taxas de concepção encontradas para as fêmeas em relação ao tipo de sêmen utilizado (Tabela 18), indicam não existir diferença estatística significativa ( $p > 0,05$ ) para o sêmen refrigerado entre os diferentes tipos de ECC. Mas houve interação significativa, sendo que não houve diferença significativa entre o sêmen refrigerado e congelado no  $ECC \leq 3$  ( $p > 0,05$ ). No entanto, foi verificada uma diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) para o sêmen congelado entre os diferentes ECC. Diferença que se manteve entre os diferentes tipos de sêmen refrigerado e congelado para os  $ECC > 3$  e  $\leq 5$  ( $p < 0,05$ ). Os ECC superiores a 4 tiveram as menores taxas de concepção para o sêmen congelado nas condições em que o estudo foi realizado. Segundo Borchardth *et al.* (2018), isto é explicado pela hipótese que o ECC elevado tem influência negativa retardando o tempo de ovulação, e com isso os espermatozoides do sêmen congelado capacitando mais rápido no útero tem redução na fertilização, efeito compensado com o uso de sêmen refrigerado. Porém, novas pesquisas tem que ser delineadas para testar esta hipótese.

Na Tabela 19 são mostradas as taxas de concepção gerais de acordo com o diâmetro folicular, onde não se verifica diferença estatística significativa ( $p > 0,05$ ) entre os grupos estudados. Valores similares foram encontrados por Porto-Filho *et al.* (2004) ao utilizar a mesma quantidade de eCG usado neste estudo 400 UI, obtendo-se uma taxa de concepção de

43,1% para animais com diâmetro folicular médio de 1,38 cm. Em trabalho posterior Monteiro *et al.* (2016) também utilizando a mesma quantidade de eCG (400UI), reportaram diâmetro folicular médio de 1,42 cm para búfalas em PRD, associado a uma taxa de prenhez de 61,5%, evidenciando que a presença de folículos maiores nos ovários no ato da IA aumenta a chance de fertilização.

Para a inseminação das búfalas submetidas a sincronização em PRD foram utilizados sêmen de 8 touros (Tabela 20). Não sendo verificada diferença estatística significativa entre os touros ( $p > 0,05$ ). Dentre os touros utilizados houve uma diferença de 10,95 pontos entre o touro com menor e maior taxa de concepção (36,7 e 47,6%, respectivamente). O elevado número de touros utilizados se deve a dificuldade de condicionamento para coleta de sêmen de touros nas fazendas, e mesmo após o condicionamento, a inconstância na manutenção dos ejaculados e qualidade dos mesmos, que permitissem sua utilização em maior frequência. É importante lembrar que para cada dia de inseminação o sêmen do mesmo ejaculado/touro foi utilizado refrigerado ou congelado. Entre dias de inseminação houve a alternância de doador mantendo-se para todo experimento a premissa do mesmo ejaculado para refrigeração e congelamento. Para todos os dias de IA os valores de concentração por dose foram corrigidos durante os processos de refrigeração e congelamento para que não houvesse favorecimento entre nenhum dos tipos de sêmen utilizados.

Os dados “*Odds Ratio*” mostraram um risco maior de concepção para o sêmen refrigerado em búfalas leiteiras (Tabela 21). Esta informação está em acordo com a literatura (Almeida *et al.*, 2016), permitindo mencionar que as fêmeas bubalinas inseminadas com o sêmen refrigerado correm maior risco de concepção porque este tipo de sêmen possui menos injúrias no seu processo de produção (Watson, 2000 e Bucher *et al.*, 2009), assim como uma vida útil mais longa no tracto reprodutor feminino comparado ao sêmen congelado (Bucher *et al.*, 2009 e Borchardth *et al.*, 2018), influenciando em redução de custos.

A hipótese de que o uso de sêmen refrigerado poderia melhorar a fertilidade em búfalas sobre o uso de sêmen descongelado foi suportada pelo aumento relativo de 13,7%, na taxa de concepção em prol do sêmen refrigerado (Tabela 22). Este resultado obtido através do teste de comparação de proporções evidencia que, apesar do sêmen congelado ter vantagens em relação à seu período de armazenamento, ele tem a desvantagem de causar dano celular e perda de espermatozoides viáveis durante a criopreservação. Foi verificado ainda que o uso do sêmen refrigerado em búfalas sincronizadas por protocolos contendo P<sub>4</sub>, eCG e BE possuem 4,6 mais chances de se tornarem gestantes comparado ao sêmen congelado.

Diante dos resultados encontrados no estudo, no qual as taxas de concepção obtidas com o sêmen refrigerado foram superiores as obtidas com o sêmen congelado, este tipo de sêmen representa uma alternativa promissora ao sêmen congelado para ser usado em programas de IATF com búfalos. Esta alternativa tem o potencial de reduzir custos com protocolos, uma vez que aumenta o número de animais que se tornam gestantes por tentativa. Também apresenta um menor custo com estocagem do sêmen, pois não utiliza nitrogênio (Singh *et al.*, 2012).

É importante ressaltar que a dificuldade encontrada em certas ocasiões foi manter a regularidade no sucesso da coleta de sêmen dos doadores. Neste contexto, mais pesquisas são necessárias para solucionar este problema e tornar exequível a coleta de sêmen em búfalos nas propriedades, para uso na forma refrigerada em IATF. Entretanto, é importante lembrar que, para o sucesso do programa de sincronização para IATF com o uso do sêmen refrigerado, é determinante o rígido controle da nutrição, sanidade, boas práticas de manejo, treinamento da mão-de-obra, custo *vs.* benefício e qualidade e armazenamento do sêmen, respeitando as normas para coleta, processamento e utilização deste material de acordo com as recomendações do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento e do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal.

## 5. CONCLUSÕES

Em búfalos, as taxas de fertilização foram superiores utilizando-se sêmen refrigerado por 24 horas comparativamente ao congelado.

O sêmen bubalino refrigerado representa uma alternativa promissora ao sêmen congelado, podendo atuar para o aumento das taxas de concepção (C/IA), diminuição do custo final dos programas de IATF e melhorar o aspecto sanitário.

## AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT da pecuária) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por cederem parte dos recursos para compra de material do experimento e pela concessão da bolsa, fator indispensável para o andamento e finalização do curso.

Ao senhor Marcelo Vargas Leão e João Vargas Leão, proprietários da Fazenda Pedreiras e Laticínio Bom Destino, por cederem os animais, parte do material para os experimentos e instalações para a execução dos trabalhos de campo.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, J.; NEVES, B.P.; BRITO, M.F. et al. Pregnancy rates of buffaloes (*Bubalus bubalis*) using cooled or frozen semen at fixed time artificial insemination (FTAI) - Preliminary results. In: XI CONGRESSO MUNDIAL DE BÚFALOS - Cartagena - Colômbia, *Med. Vet. y Zootec.*, Septiembre/Diciembre, 2016.
- BARUSELLI, P.S. Reprodução de bubalinos. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE BUBALINOCULTURA, 1, 1996, Cruz das Almas, BA. *Anais...* Cruz das Almas, BA: UFBA, p.117-153, 1996.
- BARUSELLI, P.S. Sexual behaviour in buffaloes. *Proceedings...* 4<sup>th</sup> WORLD BUFFALO CONGRESS, v.1, p.158-173, 1994.
- BARUSELLI, B.P. Atividade ovariana e comportamento reprodutivo no período pós-parto em búfalos (*Bubalus bubalis*). 1992. 99f. (Dissertation), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.
- BARUSELLI, P.S.; CARVALHO, N.A.T.; JACOMINI, J.O. Eficiência uso da inseminação artificial em búfalos. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Suplemento, Belo Horizonte, v.6, p.104-110, Dez., 2009.
- BARUSELLI, P.S.; REIS, E.L.; CARVALHO, N.A.T. et al. eCG increase ovulation rate and plasmatic progesterone concentration in Nelore (*Bos indicus*) heifers treated with progesterone releasing device. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION-ICAR. Porto Seguro. *Proceedings...* 2004.
- BORCHARDT, S.; SCHULLER, L.; WOLF, L. et al. Comparison of pregnancy outcomes using either an Ovsynch or a Cosynch protocol for the first timed AI with liquid or frozen semen in lactating dairy cows. *Theriogenology*, v.107, p.21-6, 2018.
- BREEN, K.M.; BILLINGS, H.J.; WAGENMAKER, E.R. et al. Endocrine basis for disruptive effect of cortisol on preovulatory events. *Endocrinology*, v.146, p.2107-2115, 2005.

BUCHER, A.; KASIMANICKAM, R.; HALL, J.B. et al. Fixed-time AI pregnancy rate following insemination with frozen-thawed or fresh-extended semen in progesterone supplemented CO-Synch protocol in beef cows. *Theriogenology*, v.71, p.1180-1185, 2009.

CARVALHO, N.A.T.; BERNARDES, O.; BARUSELLI, P.S. Desestacionalização dos partos para a produção de leite de búfalas à pasto no centro sul do Brasil. *Pesq. Tecnol.*, v.8, p.1-5, 2011.

CARVALHO, N.A.T.; SOARES, J.,; BARUSELLI, P.S. Strategies to overcome seasonal anestrus in water buffalo. *Theriogenology*, v.86, p.200-206, 2016.

CBRA. Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal. 3ª ed. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, Belo Horizonte. 104p, 2013.

CURRY, M.R. Cryopreservation of domestic livestock. *Rev. Reprod.*, v.5, p.46-52, 2000.

DOHOO, I.R.; MARTIN, W.; STRYHN, H. Veterinary Epidemiologic Research. 2ª ed. Charlottetown, Canadá: University of Prince Edward Island, 865p., 2010.

FRARES, L.F.; WEISS, R.R.; KOZICKI, L.E. et al. Estrus Synchronization and Fixed-Time Artificial Insemination (FTAI) in Dairy Buffaloes during Seasonal Anestrus. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, v.56, n.4, p.575-580, July-August, 2013.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2016. <http://faostat3.fao.org/download/Q/QA/>

GOTTSCHALL, C.S.; MARQUES, P.R.; CANELLAS, L.C. et al. Aspectos relacionados à sincronização do estro e ovulação em bovinos de corte. *Hora Vet.*, v.164, p.43-48, 2008.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home>, 2013.

JANUSKAUSKAS, A., ZILINSKAS, H. Bull semen evaluation post-thaw and relation of semen characteristics to bull's fertility. *Veterinarija ir zootechnik*, v.39, p.1-8, 2002.

MONTEIRO, B.M.; DE SOUSA, D.C.; VASCONCELLOS, G.S. et al. Ovarian responses of dairy buffalo cows to timed artificial insemination protocol, using new or used progesterone devices, during the breeding season (autumn-winter). *Anim. Sci. J.*, v.87, p.13-20, 2016.

OHASHI, O.M.; SANTOS, S.S.D.; MIRANDA, M.S. Morfologia do sistema genital, distúrbio reprodutivo e manejo do macho bubalino (*Bubalus bubalis*). *Rev. Bras. Reprod. Anim.* v.35, p.88-94, 2011.

PORTO-FILHO, R.M.; BARUSELLI, O.S.; MADUREIRA, E.H. et al. Detecção de cio em búfalas através do sistema de radiotelemetria. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.23, p.356-358, 1999.

PORTO FILHO, R.M.; CARVALHO, N.A.T.; VIEL JÚNIOR, J.O. et al. eCG dosage reduction in a protocol for synchronization of ovulation for timed artificial insemination during the off breeding season in buffalo. *Proceedings...* In: 2<sup>nd</sup> BUFFALO SYMPOSIUM OF AMERICAS. Corrientes, CD-room, 2004.

RHODES, F.M.; McDOUGALL, S.; BURKE, C.R. et al. Treatment of cows with extended postpartum anestrus interval. *J. Dairy Sci.*, v.86, p.1876-1894, 2003.

- SÁ FILHO, O.J, MENEGHETTI, M, PERES, R. et al. Fixed time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows. II. Strategies and factors affecting fertility. *Theriogenology*, v.72, p.210-218, 2009.
- SAMPAIO, I.B.M. Estatística Aplicada à Experimentação Animal. 3ª ed. Ed. Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte, Brasil, 264p., 2007.
- SANSONE, G.; NASTRI, M.J.F.; FABBROCINI, A. Storage of buffalo (*Bubalis bubalis*) semen. *Anim. Reprod. Sci.*, v.62, p.55-76, 2000.
- SINGH, A.K.; SINGH, V.K.; NARWADE, B.M. Comparative quality assessment of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen chilled (5°C) in egg yolk- and soya milk-based extenders. *Reprod. Domest. Anim.*, v.47, p.596-600, 2012.
- VALE, W.G. Avances biotecnológicos em reproducción de búfalos. *Tecnol. Marcha.*, v.24, n.5, p.89-90, 2011.
- VISHWANATH, R. Artificial insemination: the state of the art. *Theriogenology*, v.59, p.571-584, 2003.
- WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci.* v.60-66, p.481-492, 2000.

## Capítulo 4 - USO DE SÊMEN BUBALINO REFRIGERADO COMO ESTRATÉGIA PARA INCREMENTAR A TAXA DE CONCEPÇÃO EM PROGRAMAS DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO DURANTE O PERÍODO REPRODUTIVO FAVORÁVEL

Jaci Almeida<sup>a</sup>, Beatriz P. Neves<sup>a</sup>, Mayara F. Brito<sup>a</sup>, Verônica A. B. Becerra<sup>a</sup>,  
Patrícia A. Auler<sup>a</sup>, João P. Hadad<sup>b</sup>, Pietro S. Baruselli<sup>d</sup>, Marc Henry<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Campus Pampulha,  
Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil,  
Cep 31270-901.

<sup>b</sup> Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária, Campus Pampulha,  
Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil,  
Cep 31270-901.

<sup>c</sup> Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias, Escola de Veterinária, Universidade Federal  
de Minas Gerais, UFMG, Campus Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil,  
Cep 31270-901.

<sup>d</sup> Departamento de Reprodução Animal, VRA-FMVZ-USP, São Paulo, São Paulo, Brasil.  
Cep 05508-270

Corresponding author. Tel.: +55 31 97174-3066

E-mail addresses: [jacialmeida01@yahoo.com.br](mailto:jacialmeida01@yahoo.com.br) (J. Almeida).

### RESUMO

Objetivou-se comparar a eficiência do uso do sêmen refrigerado versus congelado sobre a taxa de concepção em búfalas submetidas a inseminação artificial em tempo fixo (IATF - Ovsynch) nos meses de maio a junho. Foram utilizados os ejaculados de 2 touros Murrah obtidos por coleta com vagina artificial; as amostras de sêmen foram fracionadas em 2 alíquotas; uma diluída em extensor comercial Botu-Bov<sup>®</sup> para a refrigeração (BB-R, grupo refrigerado) e uma diluída no mesmo extensor o para congelamento (BB-C, grupo congelado). As amostras foram refrigeradas a 5°C por 24 horas até 5°C em uma taxa de 0,25°C/minuto e mantidas nesta temperatura por 24 horas grupo BB-R e após quatro horas de equilíbrio as amostras BB-C foram congeladas a 5 cm da superfície de nitrogênio líquido. A partir de 30 dias pós-parto, 90 búfalas foram submetidas ao seguinte esquema de sincronização em dia aleatório do ciclo estral: D0 (14:00hs), aplicação de 20 µg i.m de GnRH (Cystorelin<sup>®</sup>, Merial; USA), no D7 (14:00hs) 0,530 mg i.m. de PGF<sub>2α</sub> (Croniben<sup>®</sup>, Biogênese - Bagó, BA, Argentina); no D9 (14:00hs) 20 µg i.m de GnRH (Cystorelin<sup>®</sup>) e no D10 (6:00hs da manhã) foi realizada a IA. As variáveis consideradas foram escore de condição corporal (ECC), dias pós-parto (DPP), diâmetro folicular (DF) na hora da IA, presença ou ausência de muco genital (MG) e touro. A ultrassonografia (Aloka-SSD 500, probe de 5 MHz, Tokyo, Japan), foi realizada 30 dias após a IA. A taxa de concepção total foi de 44,4%, sendo observado diferença significativa (p<0,05) para as variáveis tipo de sêmen (SR = 57,8 e SC = 31,1%); ovários com corpos lúteos (CLOD = 64,4 e CLOE = 35,6%) e ECC (3 = 20,0 e 4 = 80,0%). Já para as variáveis totais DPP; DF; MG e touros não houve diferença estatística entre os tipos de sêmen (p>0,05), obtendo-se 41,7, 48,3 e 43,2%; 45,0 e 44,2%; 44,3 e 45,0%; 45,5 e 43,9%, respectivamente. O SR apresentou 2,5 vezes mais chance de concepção comparado ao SC quando utilizado em protocolos Ovsynch.

**Palavras-chave:** Sincronização de cio, sêmen líquido, ovsynch, taxa de concepção.

### 1. INTRODUÇÃO

A população bubalina brasileira (*Bubalus bubalis*) é estimada em 1.319.478 cabeças (FAO, 2016), tendo mantido um crescimento constante nos últimos anos. Simultaneamente ao crescimento quantitativo do rebanho bubalino, existe a necessidade de incremento qualitativo na

produção, inclusive no tocante às características reprodutivas, a fim de se acelerar os efeitos positivos do melhoramento genético, que possibilita progressos genéticos significativos nos animais de produção.

Com o intuito de incrementar a eficiência reprodutiva e produtiva nos rebanhos bubalinos, diversas biotécnicas da reprodução têm sido recomendadas, dentre elas a IA, IATF, PIVE e TE. No entanto, apesar da IA ser uma das principais biotecnicas empregadas nas espécies domésticas e uma importante ferramenta para difusão de material genético superior de origem paterna, é empregada em apenas 1% das fêmeas bubalinas em idade reprodutiva (IBGE, 2013). Isto se deve principalmente à dificuldade na identificação das manifestações de estro, sendo detectado apenas 3,4 a 16,7% do comportamento de homossexualidade durante o estro (Baruselli, 1994 e Crudeli *et al.*, 1996) e que associada a suas variações de duração entre 6 a 48 horas (Porto-Filho *et al.*, 2004), tornam sua detecção mais trabalhosa e a primeira IA mais laboriosa em face de dificuldade em determinar o momento apropriado para sua realização.

Para solucionar o problema de detecção de cios, foram desenvolvidos protocolos de sincronização que permitem executar a IATF sem a necessidade de observar o estro, facilitando o manejo do rodeio e otimizando o uso no campo desta biotecnica. Nas fêmeas bubalinas cíclicas (com a presença de corpo lúteo), durante a estação reprodutiva favorável (outono e inverno), a sincronização de cios e ovulação por métodos hormonais (Ovsynch) tem apresentado resultados encorajadores ao redor de 50% (Baruselli, 1999; Crudeli *et al.*, 2008 e Chaikhun *et al.*, 2010) e em algumas situações superiores à 60,0% para o uso de IATF (Beber *et al.*, 2002; Campanile *et al.*, 2005 e Campanile *et al.*, 2013).

A moderna reprodução animal tem como base a utilização do sêmen congelado para a fertilização das diversas espécies de animais de produção. Entretanto o processo de criopreservação causa um decréscimo significativo na motilidade espermática de búfalos de 32,5 a 58,8% (Oba *et al.*, 1993) e 51% (Rasul *et al.*, 2000). Uma das principais causas se deve a alterações na bioquímica estrutural dos espermatozoides, promovendo a morte dessas células por afetar diferentes compartimentos citológicos (Yoshida, 2000). As lesões parciais que ocorrem nos espermatozoides durante o equilíbrio da refrigeração tornam-se mais evidentes na congelação e descongelação (Tardif *et al.*, 1997).

Diversos estudos envolvendo várias espécies animais indicaram que os espermatozoides congelados têm uma menor meia-vida no tracto reprodutor feminino, assegurando taxas de fertilização menos elevadas, mesmo no caso de ovulação assíncrona no momento da inseminação, em comparação com sêmen refrigerado (Curry, 2000; Bucher *et al.*, 2009 e Borchardth *et al.*, 2018) e que a redução do número ou qualidade do esperma utilizado para inseminação pode resultar numa diminuição exponencial na fertilidade dos animais (Watson, 2000).

Neste contexto, o sêmen refrigerado surge como uma alternativa para minimizar os danos causados aos espermatozoides no processo de congelamento, apresentando como principais vantagens à prevenção das injúrias relacionadas ao processo de congelamento (Bucher *et al.*, 2009 e Borges-Silva *et al.*, 2015), garantindo uma maior viabilidade espermática que por sua vez permite a redução da dose inseminante (Al Naib *et al.*, 2011 e Xu, 2014) e uso mais generalizado de touros geneticamente superiores, limitando os efeitos negativos da tecnologia de sexagem (Xu, 2014). Outras vantagens do sêmen refrigerado são o menor custo de armazenamento e simples manipulação (Vishwanath e Shannon, 2000; Vishwanath, 2003 e Crespilho *et al.*, 2012), ser utilizado em programas de IATF (Adeel *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2012; Saha *et al.*, 2014 e Borges-Silva *et al.*, 2015), permitindo inseminar neste caso um grande número de fêmeas em dia e hora pré-determinada, sem a necessidade de observação de cio (Baruselli *et al.*, 2004).



Embora existam algumas evidências em vacas bovinas que indiquem que a fertilidade é superior quando do uso do sêmen líquido (Bucher *et al.*, 2009; Borges-Silva *et al.*, 2015 e Papa *et al.*, 2015), há uma escassez de informações publicadas sobre a fertilidade do sêmen líquido em comparação com o sêmen congelado em búfalas leiteiras.

O presente trabalho objetivou avaliar a diferença entre as taxas de concepção de búfalas múltiparas sincronizadas com o protocolo Ovsynch, e inseminadas com sêmen refrigerado e sêmen congelado durante o período reprodutivo favorável (outono e inverno).

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Ética

O presente estudo foi realizado após aprovação de todos os procedimentos pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (EV/UFMG), segundo o protocolo nº 368/2015.

### 2.2. Local do experimento

O experimento foi conduzido na Fazenda Bom Destino, localizada no Distrito de Morro do Ferro em Oliveira, Minas Gerais, Latitude 20°41'45" Sul e Longitude 44°49'37" Oeste, no período de maio a junho de 2016.

### 2.3. Reprodutores utilizados

Como doadores de sêmen foram utilizados 2 touros Murrah (*Bubalus bubalis*), com média de 9 anos de idade; ECC = 4 (1-5) e peso médio de 920 kg. Os reprodutores apresentavam históricos de fertilidade conhecida e eram mantidos separados das fêmeas, sendo selecionados a partir de exames andrológicos e coleta de ejaculados que atendessem as características físicas e morfológicas segundo recomendação do Manual de Andrologia (CBRA, 2013).

### 2.4. Coleta do sêmen

As coletas foram realizadas com vagina artificial, com temperatura interna entre 42-45°C (Sansone *et al.*, 2000; Ohashi *et al.*, 2011 e Vale *et al.*, 2011). Acoplado a vagina foram utilizados copos coletores (tubos plásticos 15 mL), graduados e estéreis, previamente aquecidos e protegidos com uma camisa isotérmica para evitar contato com os raios ultravioleta (UV) e as mudanças bruscas de temperatura que pudessem afetar o sêmen. Antes da coleta foi induzida uma falsa monta na primeira tentativa de salto (sem coleta de sêmen, com intuito de aumentar a concentração espermática do ejaculado), sendo o ejaculado da segunda monta coletado e imediatamente direcionado para o laboratório, colocado em banho-maria a 37°C, para as análises de motilidade e vigor espermático, usando microscopia de luz.

### 2.5. Concentração e processamento do sêmen

A concentração espermática foi estimada utilizando uma câmara de Neubauer, para obtenção de  $50 \times 10^6$  SPTZ/mL pós diluição final. A amostra de sêmen foi dividida em duas alíquotas, diluídas em extensor comercial Botu-Bov<sup>®</sup> (Botupharma, Botucatu/SP, Brasil) para refrigeração e para congelamento. Após o envase nas palhetas de 0,5 mL (IMV<sup>®</sup> Technologies, L'Aigle Cedex, França), as amostras foram submetidas a dois tipos de processamento. Inicialmente o grupo refrigerado (BB-R) e grupo congelado (BB-C), tiveram as amostras acondicionadas em saco plástico e, então, submersos em recipiente de vidro com água (260 mL)

a 27°C e colocado dentro de outro recipiente de vidro (500 mL) a temperatura constante de 5°C na geladeira (frigobar vertical com as dimensões: 47 cm de largura x 59,5 cm de altura x 45 cm de profundidade), por 4 horas de equilíbrio, obtendo-se curva de resfriamento de 0,25°C/minuto (de 27 a 5°C/média do período avaliado). Após esse tempo, o sêmen refrigerado foi mantido por mais 20 horas a temperatura de refrigeração de 5°C, e o sêmen congelado, foi colocado em uma caixa de poliestireno com as dimensões internas: 39,0 cm de comprimento x 19 cm de largura e 30,0 cm de altura. Posteriormente, as palhetas foram acondicionadas a 5 cm da superfície do nitrogênio (N<sub>2</sub>), por 20 minutos e posteriormente imersas em N<sub>2</sub>. Todas as amostras de sêmen foram avaliadas antes da utilização para inseminação artificial. As normas mínimas de qualidade para inclusão no experimento foram: sêmen refrigerado (motilidade total > 50% e total de defeitos de espermatozoides ≤ 20%) e sêmen congelado (motilidade total > 30% e total de defeitos de espermatozoides ≤ 20% após raqueados).

## 2.6. Distribuição das fêmeas para inseminação artificial

Na IATF foram utilizadas 90 fêmeas da raça Murrah e mestiças com idade média de 5,7 anos; ECC = 3 e 4 (escala de 1-5); peso médio de 617,6 kg, múltiparas (> 2 partos) e lactantes (> 30 dias pós-parto) e mantidas a pasto sob pastagem de tifton (*Cynodon spp*) durante todo o experimento, com livre acesso à sal mineral e água *ad libitum*. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em três blocos: B1 (n = 35), B2 (n = 30) e B3 (n = 25), sendo estas submetidas a IA em 3 dias consecutivos.

## 2.7. Protocolo de sincronização

A sincronização seguida para o protocolo de IATF foi realizado na mesma fazenda onde foi coletado o sêmen do reprodutor. Em um dia aleatório do ciclo estral foi utilizado o seguinte protocolo: No D0 (14:00hs), os animais receberam 20 µg i.m de GnRH (Cystorelin<sup>®</sup>, Merial; USA), no D7 (14:00hs) aplicou-se 0,530 mg i.m. de PGF<sub>2</sub>α (Croniben<sup>®</sup>, Biogênese - Bagó, BA, Argentina); no D9 (14:00hs) aplicou-se 20 µg i.m de GnRH (Cystorelin<sup>®</sup>) e no D10 (6:00hs da manhã) IA (alternadamente), com os 2 tipos de sêmen. Para o aquecimento do sêmen refrigerado e descongelamento, foi utilizada a temperatura de 37°C/30s.

## 2.8. Diagnóstico de gestação

Todas as búfalas foram submetidas a ultrassonografia (Aloka-SSD 500, probe de 5 MHz, Tokyo, Japan), no D30 para verificar a concepção. Foram consideradas como prenhas quando visualizada a vesícula embrionária e/ou confirmado com presença dos batimentos cardíacos fetais.

## 2.9. Análise estatística

Para a análise estatística a variável diagnóstico de prenhes foi utilizada como variável dependente. As variáveis idade, peso, dias pós-parto e ECC foram utilizadas como variável independente buscando uma associação entre essas e a dependente. Em alguns momentos foram utilizadas a forma de preservação do sêmen como uma segunda fonte de variação. Foi verificada a existência de associação através de tabelas de contingência utilizando o teste qui-quadrado (Sampaio, 2007).

No caso de verificação de associação entre o diagnóstico de prenhez e alguma variável com mais de duas categorias (categórica nominal) foi utilizado a regressão logística para verificar quais das categorias tinham associação e a força da associação medida pela razão de chances (*odds ratio*) (Dohoo *et al.*, 2010).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Caracterização da atividade ovariana

Todos os animais estudados ovularam, sendo encontrado um maior número de corpos lúteos no ovário direito em relação ao esquerdo ( $p < 0,05$ ) conforme Tabela 23.

Tabela 23 - Características das estruturas ovarianas das búfalas submetidas ao exame ginecológico e utilizadas na inseminação artificial com o protocolo Ovsynch durante o período reprodutivo favorável (maio a junho).

Características ovarianas	%(n/N)
CLOD	64,4 <sup>a</sup> (58/90)
CLOE	35,6 <sup>b</sup> (32/90)
<b>Total</b>	<b>100(90/90)</b>

Médias com letras distintas diferem entre si ( $p < 0,05$ ); CLOD = corpo lúteo ovário direito; CLOE = corpo lúteo ovário esquerdo; % = Percentagem de concepção; n = número de estruturas e N = número de ovários.

#### 3.2 Caracterização do diâmetro folicular ( $\emptyset$ )

Os diâmetros dos folículos dominantes mensurados no dia da IATF encontram-se expressos na Tabela 24. Os folículos ovarianos foram classificados de acordo com seu diâmetro ( $\emptyset$ ) em folículos médios (tamanho entre 0,50 mm e 10,0 mm) e folículos grandes (tamanho  $\geq 10,0$  mm). Houve uma prevalência do número de animais com folículos  $\geq 10,0$  mm dentre as 90 fêmeas avaliadas, sendo encontrados 70 animais com  $\emptyset$  folicular  $\geq 10,0$  mm e 20 animais com  $\emptyset$  folicular entre 0,50 mm e 10,0 mm.

Tabela 24 - Taxas de concepção das búfalas submetidas a inseminação artificial com sêmen refrigerado ou congelado de acordo com o diâmetro folicular, submetidas a sincronização com o protocolo Ovsynch.

Tipo de sêmen	Diâmetro folicular	
	0,50-10,0 mm %(n/N)	>10,0 mm %(n/N)
Sêmen refrigerado	62,5 <sup>Aa</sup> (05/08)	56,8 <sup>Aa</sup> (21/37)
Sêmen congelado	33,3 <sup>Ba</sup> (04/12)	30,3 <sup>Ba</sup> (10/33)
<b>Total</b>	<b>45,0<sup>a</sup>(09/20)</b>	<b>44,2<sup>a</sup>(31/70)</b>

Médias com letras distintas (maiúscula na coluna e minúscula na linha) diferem entre si ( $p > 0,05$ ); % = Percentagem de concepção; n = número de fêmeas gestantes e N = número fêmeas inseminadas.

#### 3.3 Taxas de concepção total por tipo de sêmen utilizado (refrigerado e congelado)

Quando se comparam as taxas de concepção por tipo de sêmen utilizado (refrigerado e congelado), verifica-se que há uma diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) a favor do sêmen refrigerado (Tabela 25).

Tabela 25 - Taxas de concepção com sêmen refrigerado ou congelado em búfalas submetidas a IATF com Ovsynch, durante o período reprodutivo favorável (maio a junho).

<b>Tipo de sêmen</b>	<b>Gestantes %(n/N)</b>
Sêmen refrigerado	57,8 <sup>a</sup> (26/45)
Sêmen congelado	31,1 <sup>b</sup> (14/45)
<b>Total</b>	<b>44,4(40/90)</b>

Médias com letras distintas na coluna diferem entre si ( $p < 0,05$ ); % = Percentagem de concepção; n = número de fêmeas gestantes ou não gestantes e N = número total de fêmeas.

### 3.4. Efeito dias pós-parto

Na Tabela 26 verificam-se as taxas de concepção para os intervalos de dias pós-parto, em búfalas que foram inseminadas com sêmen refrigerado ou congelado. Para os 3 grupos analisados, não foram detectadas diferenças estatísticas significativas ( $p > 0,05$ ). No entanto, houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os diferentes tipos de sêmen (SR e SC) avaliados.

Tabela 26 - Taxas de concepção de acordo com o número de dias pós-parto em búfalas no período reprodutivo favorável (maio a junho), utilizando sêmen refrigerado e congelado, submetidas a sincronização com o protocolo Ovsynch.

<b>Tipo de sêmen</b>	<b>Dias pós-parto</b>		
	<b>30-60 %(n/N)</b>	<b>60-90 %(n/N)</b>	<b>&gt; 90 %(n/N)</b>
Sêmen refrigerado	54,6 <sup>Aa</sup> (6/11)	66,7 <sup>Aa</sup> (10/15)	52,6 <sup>Aa</sup> (10/19)
Sêmen congelado	30,8 <sup>Ba</sup> (4/13)	28,6 <sup>Ba</sup> (04/14)	33,3 <sup>Ba</sup> (06/18)
<b>Total</b>	<b>41,7<sup>a</sup>(10/24)</b>	<b>48,3<sup>a</sup>(14/29)</b>	<b>43,2<sup>a</sup>(16/37)</b>

Médias com letras distintas (míscula na coluna e minúscula na linha) diferem entre si ( $p < 0,05$ ); % = Percentagem de concepção; n = número de fêmeas gestantes e N = número fêmeas inseminadas.

### 3.5. Efeito escore de condição corporal (ECC) e tipo de sêmen utilizado

Houve uma diferença grande entre o número de animais presentes em cada uma das duas categorias avaliadas de ECC (EEC 3 = 19 e ECC 4 = 71), não sendo verificada diferença estatística significativa ( $p > 0,05$ ) nas taxas de concepção em relação ao ECC (Tabela 27).

Tabela 27 - Taxas médias de concepção de acordo com o ECC das búfalas, durante o período reprodutivo favorável (maio a junho), submetidas a IATF com Ovsynch.

<b>Categoria</b>	<b>Escore de Condição Corporal</b>		<b>Total %(n/N)</b>
	<b>3 %(n/N)</b>	<b>4 %(n/N)</b>	
Gestantes	42,1 <sup>a</sup> (08/19)	45,1 <sup>a</sup> (32/71)	<b>44,4<sup>a</sup>(40/90)</b>

Médias com letras iguais não diferem entre si ( $p > 0,05$ ); % = Percentagem de concepção; n = número de fêmeas gestantes e N = número fêmeas inseminadas.

No entanto, houve diferença estatística na taxa de concepção por tipo de sêmen (SR e SC) de acordo com o escore de condição corporal (Tabela 28).

Tabela 28 - Taxas de concepção para cada tipo de sêmen de acordo com o ECC, entre búfalas durante o período reprodutivo favorável (maio a junho), submetidas a IATF com Ovsynch.

Tipo de sêmen	Escore de Condição Corporal	
	3 %(n/N)	4 %(n/N)
Sêmen refrigerado	19,2 <sup>Ab</sup> (5/26)	80,8 <sup>Aa</sup> (21/26)
Sêmen congelado	21,4 <sup>Ab</sup> (3/14)	78,6 <sup>Aa</sup> (11/14)
<b>Total</b>	<b>20,0<sup>b</sup>(8/40)</b>	<b>80,0<sup>a</sup>(32/40)</b>

Médias com letras distintas (minúsculas nas linhas) diferem entre si ( $p < 0,05$ ); % = Percentagem de concepção; n = número de fêmeas gestantes e N = número fêmeas inseminadas.

### 3.6. Concepção por atividade cíclica em diferentes ovários

Na Tabela 29 verifica-se que não há diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) entre as taxas de concepção de acordo com a presença de corpo lúteo para os diferentes ovários e também entre os diferentes tipos de sêmen (refrigerado e congelado).

Tabela 29 - Taxas de concepção com sêmen refrigerado ou congelado em búfalas submetidas a IATF com Ovsynch, durante o período reprodutivo favorável (maio a junho) de acordo com a presença de corpo lúteo nos ovários direito e esquerdo.

Tipo de sêmen	Características ovarianas	
	CLOD %(n/N)	CLOE %(n/N)
Sêmen refrigerado	33,3 <sup>a</sup> (15/45)	24,4 <sup>a</sup> (11/45)
Sêmen congelado	24,4 <sup>a</sup> (11/45)	6,7 <sup>a</sup> (03/45)
<b>Total</b>	<b>28,9<sup>a</sup>(26/90)</b>	<b>15,6<sup>a</sup>(14/90)</b>

Médias com letras distintas nas colunas diferem entre si ( $p < 0,05$ ); CLOD = corpo lúteo no ovário direito; CLOE = corpo lúteo no ovário esquerdo; % = Percentagem de concepção; n = número de fêmeas gestantes e N = número fêmeas inseminadas.

### 3.7. Efeito muco genital

Em referência à presença de muco, foi verificado que 78,9% (71/90) das búfalas sincronizados apresentaram muco no momento da IA. Na Tabela 30 é possível verificar que não houve diferença estatística significativa ( $p > 0,05$ ) para as taxas de concepção totais entre os animais que apresentavam ou não muco genital. No entanto, houve diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) para os diferentes tipos de sêmen usados.

Tabela 30 - Taxas de concepção das búfalas inseminadas com sêmen refrigerado ou congelado de acordo com presença ou ausência de muco no momento da IATF, utilizando o protocolo Ovsynch.

Tipo de sêmen	Muco genital no momento da IA	
	Com muco %(n/N)	Sem muco %(n/N)
Sêmen refrigerado	56,8 <sup>Aa</sup> (21/37)	62,5 <sup>Aa</sup> (05/08)
Sêmen congelado	30,3 <sup>Ba</sup> (10/33)	33,3 <sup>Ba</sup> (04/12)
<b>Total</b>	<b>44,3<sup>a</sup>(31/70)</b>	<b>45,0<sup>a</sup>(09/20)</b>

Médias com letras distintas nas colunas diferem entre si ( $p < 0,05$ ); IA = Inseminação artificial; % = Percentagem de concepção; n = número de fêmeas gestantes e N = número fêmeas inseminadas.

### 3.8. Efeito touro

O touro não afetou a taxa de concepção ( $p>0,05$ ) para os diferentes tipos de sêmen utilizados (Tabela 31). No entanto, quando comparado os tipos de sêmen entre si, é possível observar uma diferença estatística significativa ( $p<0,05$ ) entre as taxas de concepção, sendo encontrado melhor resultado para as fêmeas inseminadas com sêmen refrigerado. Fato este ocorrido para a taxa de concepção entre o sêmen dos 2 touros usados na sincronização com o protocolo Ovsynch.

Tabela 31 - Taxas de concepção de búfalas (n=90) utilizando sêmen refrigerado ou congelado, por touro (n=2), durante o período reprodutivo favorável (maio a junho) com a IATF usando Ovsynch.

Tipo de sêmen	Touros	
	1 %(n/N)	2 %(n/N)
Sêmen refrigerado	64,7 <sup>a</sup> (11/17)	53,6 <sup>a</sup> (15/28)
Sêmen congelado	25,0 <sup>b</sup> (04/16)	34,5 <sup>b</sup> (10/29)
<b>Total</b>	<b>45,5<sup>a</sup>(15/33)</b>	<b>43,9<sup>a</sup>(25/57)</b>

Médias com letras distintas nas colunas diferem entre si ( $p<0,05$ ); \*Todas as vacas estavam ciclando; % = Percentagem de concepção; n = número de fêmeas gestantes e N = número fêmeas inseminadas.

### 3.9. Logística final mista

Tabela 32 - Resultados do fator de risco (*Razão de Odds Ratio*) para a taxa de concepção bubalina, com o uso do sêmen refrigerado ou congelado em protocolos de sincronização com Ovsynch durante o período reprodutivo favorável (maio a junho).

Variável	OR	EP	P
Sêmen refrigerado	33,0 <sup>a</sup>	14,5	0,01
Sêmen congelado	13,7 <sup>b</sup>	41,3	0,29
Variância entre sêmen	19,3	-	-

Médias com letras distintas na coluna diferem entre si ( $p<0,05$ ); OR = Odds Ratio; EP = Erro padrão.

### 3.10. Teste de comparação de proporções

Tabela 33 - Taxa de concepção e probabilidade de prenhez após a sincronização estral em função do tipo de sêmen utilizado para búfalos.

Tipo de sêmen	Concepção	Probabilidade de	P	Z
	%(n/N)	concepção (P<0,05)		
Sêmen refrigerado	57,8 <sup>a</sup>	72,2	-	-
Sêmen congelado	31,1 <sup>b</sup>	44,6	-	-
Variância entre sêmen	26,6	46,4	0,01	2,5

Médias com letras diferentes na coluna diferem entre si ( $p<0,05$ ); % = Percentagem de concepção; n = número de fêmeas gestantes e N = número fêmeas inseminadas.

## 4. DISCUSSÃO

As criações de búfalos na atualidade frente a situação econômica mundial, requerem práticas de gestão eficientes, para aumentar a rentabilidade dos criadores e mantê-los competitivos no mercado de lácteos. Neste contexto, a eficiência reprodutiva tem sido

melhorada com o uso de protocolos hormonais para a inseminação artificial, colaborando para a disseminação da IA, o que está acelerando o ganho genético e, conseqüentemente, o aumento na produção de leite e de carne nesta espécie.

Quanto à ciclicidade em búfalas, foi observada uma maior eficiência dos ovários direitos, tendo apresentado diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ), conforme Tabela 23. No entanto, estes resultados diferem daqueles encontrados por Danell (1987), no qual o autor reporta 48,8% de CLOD e 51,2% de CLOE. Face aos poucos dados de literatura disponíveis e ao pequeno número de animais avaliados neste estudo, não é possível afirmar que na espécie bubalina, as fêmeas possuem maior eficiência cíclica na gônada direita. Sendo assim, outros estudos deverão ser realizados para esclarecer o ponto divergente entre o presente trabalho e o estudo de Danell (1987).

No tocante à taxa de concepção em relação ao diâmetro folicular (Tabela 24), não foi detectada diferença estatística significativa ( $p > 0,05$ ) em fêmeas com folículos menores ou maiores, inseminadas para o mesmo tipo de sêmen (62,5 e 56,8% para o SR e 33,3 e 30,3% para o SC). Diferença no índice de prenhez em função de presença de folículos pequenos ou grandes também não foi observada quando juntou-se os grupos IA com sêmen refrigerado e congelado (45,0 e 44,2%, respectivamente).

Pode-se conjecturar que o sêmen refrigerado por ter uma vida útil mais prolongada no trato reprodutor da fêmea, têm possibilidade de fertilizar mais oócitos (pois esperaria pelos oócitos que demoraram mais a serem liberados ou mesmo aqueles que foram liberados mais precocemente), levando-se em conta os diferentes momentos de ovulação que ocorrem nas búfalas de acordo com os fármacos utilizados (GnRH, 26-30 hs; hCG, 24-26 hs; LH, 24-26 hs e BE, 40-45 hs) (Baruselli *et al.*, 2004). O que não ocorre com o sêmen congelado, que possui uma vida útil menor no sistema reprodutor da fêmea (Borchardth *et al.*, 2018).

Sabendo-se que os protocolos de sincronização para IATF não permitem um controle preciso do momento da ovulação (Baruselli *et al.*, 2004), o processo de refrigeração, que causa menos danos às células espermáticas, prolonga sua sobrevivência, aumenta a fertilização e, por conseguinte, a gestação, como encontrado neste estudo é uma boa alternativa para uso nos programas de IA e IATF.

O total de búfalas gestantes considerando-se os dois grupos (SR e SC) foi de 44,4% conforme Tabela 25, percentual similar aos 44,3%; 44,4% e 44,2% relatados para bubalinos por Baruselli *et al.* (2003), Neglia *et al.* (2003) e Campanile *et al.* (2011), respectivamente. No entanto, superior as taxas de prenhez de 23,9% obtidas para animais leiteiros criados em condições de pastagens e suplementação similares Rossi *et al.* (2014). Deve-se ressaltar que as pesquisas citadas trabalharam apenas com o sêmen congelado, diferente do que foi realizado neste estudo, onde se utilizou sêmen refrigerado e congelado. Nesta mesma tabela 25, é possível verificar uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o SR (57,8%) e SC (31,1%), evidenciando a vantagem do uso do SR em programas de IATF sobre o SC.

As taxas de concepção não apresentaram diferenças estatísticas significativas ( $p > 0,05$ ) para os diferentes intervalos de dias pós-parto (Tabela 26). Entretanto, foi detectada uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os diferentes tipos de sêmen utilizados. Os resultados encontrados neste estudo, corroboram com Baruselli *et al.* (2000), no qual os autores dizem não haver diferença nas taxas de prenhez para os intervalos inferiores a 60 dias; entre 90 e 99 e maiores que 100 dias pós-parto. Os resultados obtidos nesses trabalhos permitem conjecturar que é possível obter satisfatório desempenho reprodutivo utilizando protocolos de IATF entre 30 e 60 dias pós-parto, conferindo às búfalas inseminadas intervalos entre partos próximo a 12 meses.

Segundo Beber *et al.* (2002) em búfalos, a eficiência da sincronização da ovulação está relacionada à condição corporal dos animais no início do tratamento. Neste estudo a taxa de concepção total obtida em relação ao ECC foi de 44,4%, sendo 42,1% para o ECC 3 e 45,1% para o ECC 4 (Tabela 27). Valores similares com maior valor para o ECC 4 (51,7%) foram reportados por Baruselli *et al.* (2000), tendo o autor encontrado correlação entre as taxas de concepção e o ECC dos animais tratados com o protocolo Ovsynch, sendo obtidas taxas de concepção de 31,4% e 57,1% para os ECC 3 e 4, respectivamente. Face aos percentuais encontrados neste estudo, somados aos relatos de literatura, fica evidente que a sincronização da ovulação apresenta bons resultados quando se trabalha com animais com ECC entre 3 e 4 numa escala de 1-5 (Tabela 27). Na Tabela 28 é possível verificar que o sêmen refrigerado se manteve superior ao sêmen congelado para a taxa de prenhez, quando avaliado o ECC.

Na Tabela 29 verifica-se uma diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) entre as taxas de concepção para as diferentes gônadas, e para os diferentes tipos de sêmen utilizados. Há necessidade de realizar outros estudos, para verificar se este resultado se repete.

Em referência à presença de muco genital, observou-se que 78,9% das búfalas sincronizadas apresentaram muco no momento da IA. Um fato importante a ser observado é que do número total de fêmeas que possuíam muco, apenas 44,3% ficaram gestantes, contra 45,0% daquelas que não o possuíam (Tabela 30). Diante dos resultados obtidos, observa-se que os hormônios utilizados produziram o efeito esperado (desenvolvimento do folículo e ovulação), mesmo na ausência de muco visível. No entanto, o resultado para os diferentes tipos de sêmen (SR e SC) divergiram significativamente ( $p < 0,05$ ) a favor do SR (Tabela 30), tanto para o grupo de animais que apresentaram muco (56,8%) como para o grupo com ausência deste (62,5%).

Embora não tenha sido observado efeito de touro no experimento a campo (Tabela 31), o reprodutor que apresentou numericamente menor taxa de concepção, também apresentou inferior motilidade seminal no pós-descongelamento. Devido a concentração espermática utilizada no estudo ( $50 \times 10^6$  SPTZ/mL) para ambos os tipos de sêmen, pode ter havido uma melhora nos resultados face ao efeito compensatório da alta concentração espermática em relação a alguns tipos de patologias espermáticas. No entanto, não foi realizada uma avaliação para confirmar esta hipótese.

Estudos anteriores já demonstravam o efeito touro na espécie bubalina, sendo relatada a diferença na capacidade de produzir descendentes nos diferentes sistemas de criação “natural e artificial” (Saacke *et al.*, 1994). Ward *et al.* (2001) reportou que os espermatozoides de diferentes touros diferem em sua capacidade de fertilizar o oócito *in vitro*. Segundo o autor, a cinética da clivagem precoce poderia ser usada para diferenciar touros de alta e baixa fertilidade. Nos trabalhos de campo é de fundamental importância a realização de exames andrológicos antes de iniciar a estação de monta ou mesmo antes de iniciar um programa de reprodução com o uso da IATF. Isto porque, o simples exame andrológico, quando bem feito, já é suficiente para retirar os piores touros da reprodução.

Os dados “*Odds Ratio*” mostraram uma probabilidade maior de concepção para o sêmen refrigerado em búfalas leiteiras (Tabela 32). Esta informação está em acordo com a literatura (Almeida *et al.*, 2016b), os quais relataram que fêmeas bubalinas inseminadas com o sêmen refrigerado tem maior probabilidade de concepção pois este tipo de sêmen possui menos injúrias no seu processo de produção (Buche *et al.*, 2009 e Borges-Silva *et al.*, 2015). Neste contexto, devido a uma vida útil mais longa no trato reprodutor feminino comparado ao sêmen congelado (Curry, 2000; Bucher *et al.*, 2009 e Borchardth *et al.*, 2018). Portanto maior taxa de prenhez, ocasionando redução de custos.

A hipótese de que o uso de sêmen refrigerado poderia melhorar a fertilidade em búfalas sobre o uso de sêmen congelado foi suportada pelo aumento relativo de 26,6%, na taxa de concepção a favor do sêmen refrigerado (Tabela 33). Este resultado obtido através do teste de



comparação de proporções evidencia que, apesar do sêmen congelado ter vantagens em relação à seu período de armazenamento, ele tem a desvantagem de causar dano celular e perda de espermatozoides viáveis durante a criopreservação. Foi verificado através do teste de proporção, que o uso do sêmen refrigerado, em búfalas sincronizadas pelo Ovsynch possui 2,5 mais chances de se tornarem gestantes comparado ao sêmen congelado.

Em suma, se pode dizer que a taxa de concepção depende, portanto, da probabilidade de os espermatozoides ejaculados passarem por completa modificação morfológica, bioquímica e biofísica, capacitando-se e permitindo a reação acrossômica quando em contato com a zona pelúcida do ovócito (Lenz *et al.*, 1983 e Yanagimachi, 1989). Assim, independente do tipo de sêmen utilizado, este deve ter boa qualidade e posteriormente usar fêmeas com bom ECC, ausência de problemas sanitários, suficiente alimentação nos primeiros meses de gestação e presença mínima de estresse durante esse período.

Na literatura pesquisada, não foram encontrados outros trabalhos que permitissem fazer as comparações entre as taxas de concepção para o uso de sêmen refrigerado e congelado de búfalas na IATF usando o protocolo Ovsynch.

Neste trabalho não foi realizado um levantamento de custo e benefício para verificar os valores reais entre a utilização do SR e SC. No entanto, o SR de búfalos além das vantagens já mencionadas, permite utilizar material genético de reprodutores que possuem qualidade superior após as avaliações morfo-fisiológicas de acordo com o CBRA (2013), mas que não resistem ao processo de criopreservação. Apesar de possuir um menor tempo de armazenamento comparado ao sêmen congelado, na espécie bubalina é possível reduzir o tempo gasto com as IAs. Isto se explica particularmente porque as búfalas aceitam a contenção em tronco coletivo (lado a lado) otimizando o serviço de IATF, diferentemente dos bovinos que tem de ser contidos individualmente no troco para a realização das IAs. Característica interessante, uma vez que o sêmen refrigerado mantém uma motilidade superior ao sêmen congelado num período de 24 horas (Singh *et al.*, 2012 e Almeida *et al.*, 2016a), tornando possível conjecturar até mesmo a redução na concentração espermática por dose inseminante o que otimizaria o uso de um único ejaculado (Bucher *et al.*, 2009 e Vishwanath e Shannon, 2000).

No presente estudo foi usada uma dose de  $50 \times 10^6$  SPTZ/mL, sendo realizada uma avaliação da motilidade pré IA, para corrigir as concentrações e evitar que houvesse diferença entre os tipos de sêmen utilizados (refrigerado e congelado) o que poderia beneficiar o sêmen refrigerado que sofreu menos injúrias do processo de congelamento. No entanto, Andrabi *et al.* (2006) reportaram em estudo reduzindo a concentração da dose inseminante para búfalos de 30 para  $15 \times 10^6$  SPTZ/mL, não haver redução na fertilidade para o sêmen congelado de búfalos. No caso do sêmen refrigerado de búfalo, que possui uma motilidade superior ao sêmen congelado, quando utilizado até 48 horas (Dhami *et al.*, 1994; Singh *et al.*, 2012 e Almeida *et al.*, 2016a), pode-se especular até a utilização de  $1 \times 10^6$  SPTZ/mL que a fertilidade se manteria (Shannon, 1968).

Nesse caso, a preservação da viabilidade dos espermatozoides durante pelo menos 24 horas seria suficiente para o transporte e uso dos espermatozoides em fazendas distantes de onde os touros são mantidos. Isto porque o sêmen refrigerado possui uma vida útil de até 72 horas (Dhami e Sahni, 1994; Vishwanath e Shannon, 2000 e Severo, 2009), tempo suficiente para que o sêmen seja coletado e mantido refrigerado por 5°C para ser transportado a longas distâncias sem perdas significativas na motilidade, desde que mantidas as condições de armazenamento e transportes adequadas.

Pesquisas têm apontado que o uso do sêmen refrigerado proporciona maiores taxas de prenhez em relação ao sêmen congelado (Resende e Almeida, 2013; Borges-Silva *et al.*, 2015; Almeida *et al.*, 2016b e Borchardth *et al.*, 2018). Somado a impossibilidade de congelar todo o sêmen produzido (devido a baixa resistência ao processo de congelamento) e o aumento

considerado dos custos com o congelamento e o armazenamento de sêmen a baixas temperaturas (Shannon, 1968), torna-se inegável, que o uso do sêmen refrigerado em um momento onde a eficiência nos resultados de fertilidade é fator limitante para que uma propriedade se torne altamente competitiva e economicamente lucrativa é uma solução a se considerar.

Finalmente, o sêmen líquido (fresco e refrigerado) é utilizado em 95% das inseminações realizadas na Nova Zelândia (Crespilho *et al.*, 2012) e, em menor escala, na África, França, Austrália, Alemanha e Europa Oriental (Vishwanath, 2003), havendo sido relatadas boas taxas de prenhez. No entanto, apenas 5% das IAs realizadas no mundo usam o sêmen refrigerado (Thibier e Wagner, 2000). Quando analisamos os dados do Brasil em relação ao percentual de IA realizado, verifica-se que o País insemina apenas 12% de seu rebanho bovino com sêmen congelado e, que atualmente a IATF responde por 77% (13,7 milhões) das inseminações realizadas, ganhando cada vez mais espaço no mercado de reprodução (Baruselli *et al.*, 2016). No entanto, apenas 1% das fêmeas bubalinas em idade reprodutiva são inseminadas com sêmen congelado (IBGE, 2013). Frente a estes dados, e aos superiores resultados obtidos com o uso do sêmen refrigerado em relação ao sêmen congelado, vislumbra-se um enorme mercado a ser explorado e com grande potencial para melhorar os índices reprodutivos tendo em vista o crescimento dos rebanhos bubalinos no Brasil e em outros Países.

## 5. CONCLUSÃO

O sêmen refrigerado por 24 horas aumenta as taxas de concepção comparado ao sêmen congelado e descongelado, em búfalas múltiparas no pós-parto submetidas a IATF no período reprodutivo favorável com o uso do protocolo Ovsynch.

## AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT da pecuária) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por cederem parte dos recursos para compra de material do experimento e pela concessão da bolsa, fator indispensável para o andamento e finalização do curso.

Ao senhor Marcelo Vargas Leão e João Vargas Leão, proprietários da Fazenda Pedreiras e Laticínio Bom Destino, por cederem os animais, parte do material para os experimentos e instalações para a execução dos trabalhos de campo.

## REFERÊNCIAS

ADEEL, M.; IJAZ, A.; ALEEM, M. et al. Improvement of liquid and frozen-thawed semen quality of Nili-Ravi buffalo bulls (*Bubalus bubalis*) through supplementation of fat. *Theriogenology*, v.71, p.1220-1225, 2009.

ALMEIDA, J.; BECERRA, V.A.B.; NEVES, B.P. et al. Refrigeração de sêmen bubalino (*Bubalus bubalis*) frente a diferentes extensores e avaliação da motilidade espermática no CASA. *Proceedings...* In: 30<sup>th</sup> ANNUAL OF THE BRAZILIAN EMBRYO TECHNOLOGY SOCIETY (SBTE), Foz do Iguaçu, PR, Brazil. August 25<sup>th</sup> to 27<sup>th</sup>, 2016, and 32<sup>th</sup> Meeting of the European Embryo Transfer Association (AETE), Barcelona, Spain, September 9<sup>th</sup> and 10<sup>th</sup>, 2016. Abstracts. *Anim. Reprod.*, Jul./Sept. v.13, n.3, p.557, 2016a.

ALMEIDA, J.; NEVES, B.P.; BRITO, M.F. et al. Pregnancy rates of buffaloes (*Bubalus bubalis*) using cooled or frozen semen at fixed time artificial insemination (FTAI) - Preliminary results. In: XI CONGRESSO MUNDIAL DE BÚFALOS - Cartagena - Colômbia, *Med. Vet. y Zootec*, Sec.ptiembre/Diciembre, 2016b.

AL NAIB, A.; WARD, F.; KELLY, A.K. et al. Effect of duration of storage at ambient temperature on fertilizing ability and mucus penetration ability of fresh bovine sperm. *Theriogenology*, v.76, p.1070-1075, 2011.

ANDRABI, S.M.H.; SIDDIQUE, M.; ULLAH, N. et al. Effect of reducing sperm numbers per insemination dose on fertility of cryopreserved buffalo bull semen. *Pak. Vet. J.*, v.26, n.1, p.17-19, 2006.

BARUSELLI, P.S. IATF supera dez milhões de procedimentos e amplia o mercado de trabalho. *Rev. CFMV*, Brasília DF Ano XXII, Abr./Jun, v.69, p.57-60, 2016.

BARUSELLI, P.S. Inseminação ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO COM SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO EM BUBALINOS. IN: SIMPÓSIO Paulista de Bubalinocultura, 1, Jaboticabal. *Anais...* Jaboticabal: Funep, p.126-142, 1999.

BARUSELLI, P.S. Basic requirements for artificial insemination and embryo transfer in buffaloes. *Buffalo J.*, v.2, p.53-60, 1994.

BARUSELLI, P.S.; CARVALHO, N.A.T.; HENRIQUEZ, C.E.P. et al. Pre-synchronization with GnRH 7 days before ovsynch protocol for timed insemination in buffalo. In: SYMPSIUM OF AMERICAS, 1, Belém. *Proceedings...* Belém: Associação Paraense de Criadores de Búfalos, p.414-417, 2003.

BARUSELLI, P.S.; MADUREIRA, E.H.; BARNABE, V.H. Timed insemination using synchronization of ovulation in buffalo. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 14, Suécia. *Anais...* [s.l.: s.n.], p.39, 2000.

BARUSELLI, P.S.; REIS, E.L.; CARVALHO, N.A.T. et al. eCG increase ovulation rate and plasmatic progesterone concentration in Nelore (*Bos indicus*) heifers treated with progesterone releasing device. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION-ICAR. Porto Seguro, *Proceedings...*, 2004.

BERBER, R.C.A.; SILVA, M.A.; CARDOSO, M.J.L. Sincronização da ovulação utilizando protocolos Ovsynch em bovinos e bubalinos. Revisão. *Biosc. J.*, v.18, n.1, p.103-120, June, 2002.

BORCHARDTH, S.; SCHULLER, L.; WOLF, L. et al. Comparison of pregnancy outcomes using either an Ovsynch or a Cosynch protocol for the first timed AI with liquid or frozen semen in lactating dairy cows. *Theriogenology*, v.107, p.21-26, 2018.

BORGES-SILVA, J.C.; SILVA, M.R.; MARINHO, D.B. et al. Cooled semen for fixed-time artificial insemination in beef cattle. *Reprod. Fertil. Dev.*, v.28, p.1004-1008, 2015.

BUCHER, A.; KASIMANICKAM, R.; HALL, J.B. et al. Fixed-time AI pregnancy rate following insemination with frozen-thawed or fresh-extended semen in progesterone supplemented CO-Synch protocol in beef cows. *Theriogenology*, v.71, p.1180-1185, 2009.

CBRA. Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal. 3ª ed. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, Belo Horizonte. 104p, 2013.

CAMPANILE, G.; GASPARRINI, B.; VECCHIO, D. et al. Pregnancy rates following AI with sexed semen in Mediterranean Italian buffalo heifers (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*, v.76, n.3, 500-506, 2011.

CAMPANILE, G.; NEGLIA, G.; GASPARRINI, B. et al. Embryonic mortality in buffaloes synchronized and mated by AI during the seasonal decline in reproductive function. *Theriogenology*, v.63, p.2334-2340, 2005.

CAMPANILE, G.; VECCHIO, D.; NEGLIA, G. et al. Effect of season, late embryonic mortality and progesterone production on pregnancy rates in pluriparous buffaloes (*Bubalus bubalis*) after artificial insemination with sexed semen. *Theriogenology*, v.79, n.4, p.653-599, 2013.

CHAIKHUN, T.; THARASANIT, T.; RATTANATEP, J. et al. Fertility of swamp buffalo following the synchronization of ovulation by the sequential administration of GnRH and PGF2alpha combined with fixed-timed artificial insemination. *Theriogenology*, v.74, n.8, p.1371-1376, 2010.

CRISPILHO, A.M.; PAPA, F.O.; SANTOS, M.P. et al. Use of cooled bull weeks strategy to increase the pregnancy rate in fixed time artificial insemination programs-case report. *Am. J. Anim. Vet. Sci.*, v.4, n.7, p.175-179, 2012.

CRUDELI, G.A.; MALDONADO VARGAS, P.; FLORES BARBARÁN, M.S. Comportamiento reproductivo del búfalo en el nordeste argentino. Actas, In: XV CONGRESO PANAMERICANO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS (Campo Grande, Brasil), p.388, 1996.

CRUDELI, G.A.; PELLERANO, G.S.; OLAZARRI, M.J. et al. Efecto de diferentes variables sobre la preñez em búfalas sometidas a sincronización del celo e inseminación artificial a tempo fijo. *Rev. Vet.*, v.19, n.1, p.14-17, 2008.

CURRY, M.R. Cryopreservation of domestic livestock. *Rev. Reprod.*, n.5, p.46-52, 2000.

DANELL, B. Oestrous behaviour, ovarian morphology and cyclical variation in follicular system and endocrine pattern in water buffalo heifers. 1987. 124f. Thesis (Doctorat) - Faculty of Veterinary Medicine, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden.

DHAMI, A.J.; JANI, V.R.; MOHAN, G. et al. Effect of extenders and additives on freezability, post-thaw thermoresistance and fertility of frozen Murrah buffalo semen under tropical climate, *Buffalo J.*, v.1, p.35-45, 1994.

DHAMI, A.J. SAHNI, K.L. Effects of various cooling from 30°C to 5°C, equilibration and diluent treatments on freezability, post-thaw thermoresistance, enzyme leakage and fertility of bubaline spermatozoa. *Buffalo J.*, v.2, p.147-59, 1994.

DOHOO, I.R.; MARTIN, W.; STRYHN, H. Veterinary Epidemiologic Research. 2ª Ed. Charlottetown, Canadá: University of Prince Edward Island, p.865, 2010.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2016. <http://faostat3.fao.org/download/Q/QA/>

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2013. <http://www.ibge.gov.br/home>.

LENZ, R.W.; BALL, G.D.; LOHSE, J.K. et al. Chondroitin sulfate facilitates an acrosome reaction in bovine spermatozoa as evidence by light microscopy, electron microscopy and *in vitro* fertilization. *Biol. Reprod.* v.28, p.683-690, 1983.

NEGLIA, G.; GASPARRINI, B.; DI PALO, R. et al. Comparison of pregnancy rates with two estrus synchronization protocols in Italian Mediterranean Buffalo cows. *Theriogenology* v.60, p.125-133, 2003.

OBA, E.; FUCK, E.J.; BICUDO, S.D. et al. Estudo preliminar de diferentes meios para congelamento de sêmen de búfalo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, Belo Horizonte. *Anais...*Belo Horizonte: CBRA, p.337, 1993.

OHASHI, O.M.; SANTOS, S.S.D.; MIRANDA, M.S. Morfologia do sistema genital, distúrbio reprodutivo e manejo do macho bubalino (*Bubalus bubalis*). *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.35, p.88-94, 2011.

PAPA, P.M.; MAZIERO, R.D.; GUASTI, P.N. et al. Effect of glycerol on the viability and fertility of cooled bovine semen. *Theriogenology*, v.83, n.8, p.107-113, 2015.

PORTO FILHO, R.M.; CARVALHO, N.A.T.; VIEL JÚNIOR, J.O. et al. eCG dosage reduction in a protocol for synchronization of ovulation for timed artificial insemination during the off breeding season in buffalo. *Proceedings...2<sup>nd</sup> BUFFALO SYMPOSIUM OF AMERICAS*, Corrientes, CD-roo, 2004.

RASUL, Z.; ANZAR, M.; JALALI, S. et al. Effect of buffering systems on post-thaw motion characteristics, plasma membrane integrity, and acrosome morphology of buffalo spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.*, v.59, p.31-41, 2000.

RESENDE, O.A, ALMEIDA, J. Efeito do método de conservação do sêmen (congelado vs. refrigerado) nas taxas de concepção de vacas Brahman inseminadas em tempo fixo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 20, Uberlândia, MG. *Anais...* Belo Horizonte: CBRA, 2013.

ROSSI, P.; VECCHIO, D.; NEGLIA, G. et al. Seasonal fluctuations in the response of Italian Mediterranean buffaloes to synchronization of ovulation and timed artificial insemination. *Theriogenology*, v.82, p.132-137, 2014.

SAACKE, R.G.; NADIR, S.; DALTON, J.C. et al. Accessory sperm evaluation and bull fertility: an update. *Proceedings...In: 15<sup>th</sup> TECH CONF ARTIF INSEM AND REPROD NAT'L. Assoc. Anim. Breeders*, Columbia, MO, p.57-67, 1994.

SAMPAIO, I.B.M. Estatística Aplicada à Experimentação Animal. 3<sup>a</sup> ed., Ed. Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte, MG, 264p, 2007.

SAHA, R.; ASHRAF, A.; RAHMAN, Z. Comparative Study on Conception Rate of Cow in Using Frozen and Liquid Semen. *J. Anim. Sci. Adv.*, v.4, n.3, p.749-77, 2014.

SANSONE, G.; NASTRI, M.J.F.; FABBROCINI, A. Storage of buffalo (*Bubalis bubalis*) semen. *Anim. Reprod. Sci.*, v.62, p.55-76, 2000.

SEVERO, N. C. Influência da qualidade do sêmen bovino congelado sobre a fertilidade. *H. Vet.*, ano 28, Jan-Fev, n.167, p.36-39, 2009.

SHANNON, P. *Proceeding...* In: N. Z. SOCIETY OF ANIMAL PRODUCTION, v.28, p.23, 1968.

SINGH, A.K.; SINGH, V.K.; NARWADE, B.M. et al. Comparative quality assessment of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen chilled (5°C) in egg yolk and soya milk-based extenders. *Reprod. Dom. Anim.*, v.47, p.596-600, 2012.

- TARDIF, A.L.; FARREL, P.B.; TROUERN-TREND, V. et al. Computer-assisted sperm analysis for assessing initial semen quality and changes during storage at 5°C. *J. Dairy. Sci.*, v.80, n.8, p.1606-1612, 1997.
- THIBIER, M., WAGNER, H.G. World statistics for artificial insemination in cattle. In: 14<sup>th</sup> INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, p.76, 2000.
- VALE, W.G. Avances biotecnológicos em reprodução de búfalos. *Tecnología em Marcha, Rev. Esp.*, v.24, n.5, p.89-90, 2011.
- VISHWANATH, R. Artificial insemination: the state of the art. *Theriogenology*, v.59, p.571-584, 2003.
- VISHWANATH, R., SHANNON, P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Anim. Reprod. Sci.*, n.62, p.23-53, 2000.
- WARD, F.; RIZOS, D.; CORRIDAN, D. et al. Paternal influence on the time of first embryonic cleavage post insemination and the implications for subsequent bovine embryo development in vitro and fertility *in vivo*. *Mol. Reprod. Dev.*, v.60, p.47-55, 2001.
- WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci.*, v.60-61, p.481-492, 2000.
- XU, Z.Z. Application of liquid semen technology improves conception rate of sex-sorted semen in lactating dairy cows. *J. Dairy. Sci.*, v.97, p.7298-7304, 2014.
- YANAGIMACHI, R. Sperm capacitation and gamete interaction. *J. Reprod. Fertil.*, v.38, p.27-33, suppl., 1989.
- YOSHIDA, M. Conservation of sperms: current status and new trends. *Anim. Reprod. Sci.*, v.60-61, p.349-355, 2000.

## Capítulo 5 - EFICÁCIA DA ASSOCIAÇÃO TES-TRIS E TRIS COM LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE SOBRE A LONGEVIDADE *IN VITRO* DE SÊMEN REFRIGERADO DE BÚFALOS

\*J. Almeida<sup>1</sup>, M. F. Brito<sup>1</sup>, V. A. B. Becerra<sup>1</sup>, B. P. Neves<sup>1</sup>, P. A. Auler<sup>1</sup>, J. P. Hadad<sup>2</sup>, M. Henry<sup>3</sup> e-mail: [jacialmeida01@yahoo.com.br](mailto:jacialmeida01@yahoo.com.br)

<sup>1</sup> Escola de Veterinária - Universidade Federal de Minas Gerais - Belo Horizonte, MG

<sup>2</sup> Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária - Universidade Federal de Minas Gerais- Belo Horizonte, MG

<sup>3</sup> Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias - Escola de Veterinária - Universidade Federal de Minas Gerais- Belo Horizonte, MG.

\*Corresponding author. Tel.: +55 31 97174-3066

E-mail addresses: [jacialmeida01@yahoo.com.br](mailto:jacialmeida01@yahoo.com.br)

### RESUMO

Este estudo investigou *in vitro* a eficácia de quatro diferentes extensores (TES-TRIS e TRIS com lipoproteína de baixa densidade - LDL, nas concentrações de 10 e 5%) sobre a longevidade espermática de búfalos no processo de refrigeração a 5°C. A motilidade espermática foi avaliada a cada 24 horas até as 72 horas de incubação por sistema computadorizado “CASA” e a integridade de membrana espermática foi examinada pelo teste hiposmótico (HOST) em T1, T24, T48 e T72 horas. Foram utilizados 11 búfalos (1 ejaculado por búfalo), da raça Murrah, com idade variando de 4 a 6 anos. Imediatamente pós-coleta cada ejaculado foi fracionado em 4 alíquotas, e cada alíquota foi diluída em um dos quatro diluidores para a obtenção de 50x10<sup>6</sup> SPTZ/mL. As amostras foram envasadas em palhetas de 0,5 mL e refrigeradas (-0,25°C/minuto) até 5°C e mantidas nesta temperatura até a avaliação. Previamente à avaliação as amostras foram aquecidas a 37°C por 30 segundos. O pacote estatístico utilizado para as análises foi o STATA 12.0 “Statistical Analysis Software” e as médias comparadas, pelo teste de Friedman (p<0,05). Os resultados para a motilidade progressiva e HOST até o tempo de 48 horas foram superiores para o diluidor TRIS com 10% LDL, permitindo concluir que o diluidor TRIS com 10% LDL para o sêmen bubalino refrigerado, é uma alternativa viável ao sêmen convencional congelado para programas de inseminação artificial e inseminação artificial em tempo fixo.

**Palavras chave:** Motilidade espermática, lipoproteína de baixa densidade, teste hiposmótico

### 1. INTRODUÇÃO

No Brasil várias biotécnicas da reprodução vêm sendo utilizadas em búfalos com o intuito de melhorar os índices reprodutivos, visando oferecer uma genética superior através do uso da inseminação artificial (IA), inseminação artificial em tempo fixo (IATF), transferência de embriões (TE) e a produção *in vitro* de embriões (PIVE), objetivando a redução do intervalo entre gerações. No entanto, apenas 1% das fêmeas bubalinas são inseminadas artificialmente (IBGE, 2013). Essa baixa utilização da IA na espécie é atribuída à dificuldade de detecção do estro, períodos curtos de aceitação de monta, dificuldade de se encontrar sêmen comercial, falta de mão-de-obra qualificada e propriedades com escassez de estrutura adequada para manejo dos animais.

A IA em búfalas é baseada no uso de sêmen congelado. No entanto, o processo de congelamento/descongelamento provoca vários danos as células espermáticas (Holt, 2000). Esses efeitos, entre outros, caracterizam-se pela desestabilização da membrana plasmática e consequentemente elevação da concentração de cálcio intracelular, semelhante ao que ocorre durante a capacitação espermática e, assim, pode causar danos irreparáveis (Watson, 1995). Considerando que o espermatozoide capacitado e/ou com acrossomo reagido possui limitado

tempo de vida, isso pode resultar em diminuição da fertilidade se estas mudanças ocorrerem em momento inadequado (Yanagimachi, 1994). Mesmo com as técnicas mais aprimoradas de conservação, somente cerca da metade da população espermática sobrevive à congelação e descongelação (Watson, 1995). Visando amenizar esse problema, pesquisas têm sido realizadas avaliando a preservação do sêmen na forma refrigerada em bovinos (Borges-Silva *et al.*, 2015) e bubalinos (Almeida *et al.*, 2015; Almeida *et al.*, 2016 e Almeida *et al.*, 2017).

A principal vantagem no uso do sêmen refrigerado é a redução das crioinjúrias provocadas nos espermatozoides na fase inicial de sua preservação quando comparado ao que acontece quando a célula é congelada. Esta característica favorece a maior viabilidade/longevidade espermática no aparelho reprodutor feminino (Bucker *et al.*, 2009). Ainda segundo esses autores possibilita a redução da dose inseminante, permitindo a otimização de reprodutores de alto mérito genético em programas de IA, particularmente, os que possuem células espermáticas com baixa resistência ao congelamento. Adicionalmente o uso de sêmen refrigerado minimiza os custos relacionados à estocagem e simplifica a manipulação/utilização do sêmen em IA, quando comparado ao sêmen congelado (Vishwanath, 2003).

Assim a hipótese desse trabalho é que o uso do sêmen refrigerado pode melhorar a capacidade de preservar a longevidade e integridade dos espermatozoides bubalinos com o decorrer do tempo de refrigeração a 5°C em função do meio extensor utilizado. Objetivou-se, portanto, verificar os efeitos da refrigeração passiva sobre as células espermáticas de búfalos, utilizando os extensores TES-TRIS e TRIS com 10 ou 5% LDL.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado após aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (EV/UFMG), com a aprovação do nº 368/2015, segundo os princípios éticos de experimentação animal.

O experimento foi conduzido no Centro de Biotecnologia em Bubalinocultura, sediado na Fazenda Modelo da UFMG, em Pedro Leopoldo, Minas Gerais.

Foram utilizados onze búfalos da raça Murrah, com idade entre 4 e 6 anos, mantidos a pasto durante todo o experimento, com fornecimento de sal e água *ad libitum*. Estes animais já estavam previamente condicionados a coleta de sêmen com vagina artificial e foram mantidos em regime de coleta semanal durante todo período do experimento.

As coletas de sêmen (1 ejaculado por búfalo) foram feitas com o auxílio de vagina artificial com temperatura de 42-45°C, sendo realizada uma falsa monta (intuito de aumentar a concentração espermática) previamente a coleta de sêmen (segunda monta). Imediatamente pós-coleta cada ejaculado foi submetido às análises das características físicas e morfológicas, segundo Manual do CBRA, (2013). Somente ejaculados com  $\geq 70\%$  de motilidade, vigor  $\geq 3$ , anormalidades espermáticas  $\leq 30\%$  e com no mínimo  $700 \times 10^6$  SPTZ/mL foram utilizados. Cada ejaculado foi fracionado em 4 alíquotas, sendo cada amostra diluída em um dos extensores para a obtenção de  $50 \times 10^6$  SPTZ/mL. O envase foi realizado em palhetas de 0,5 mL, acondicionadas em saco plástico, e então, submersos em recipiente com água (1,4 L) a 27°C. O frasco foi colocado em ambiente a 5°C (balcão frigorífico 40 a 60 minutos pós-coleta) obtendo-se curva de resfriamento de 0,25°C/minuto (de 27 a 5°C/média do período avaliado). As palhetas foram mantidas refrigeradas a 5°C, pós-diluição por até 72 horas.

Foram utilizados dois meios diluidores TRIS e TES-TRIS, cada um com 5 ou 10% de lipoproteína da baixa densidade (LDL). Para a obtenção das LDLs foram utilizados ovos frescos produzidos em granja comercial. Os ovos foram devidamente higienizados e submetidos à técnica descrita por Neves *et al.* (2008). A composição dos diluidores foi: a) TRIS: TRIS



(2,42g), ácido cítrico (1,36g), Frutose (1,0g), Amicacina (83,4µg/mL), Equex 0,4%, LDL (10 mL) e H<sub>2</sub>O Milli-Q<sup>®</sup> autoclavada (completar 100 mL) e b) TES-TRIS: *Solução I* = TES (4,9g), TRIS (1,06g), Frutose (0,216g), Amicacina (83,4µg/mL), Equex 0,4%, LDL (5 e 10 mL) e H<sub>2</sub>O Milli-Q<sup>®</sup> autoclavada (completar 100 mL). *Solução II* = leite em pó desnatado (11g - Glória<sup>®</sup>) e H<sub>2</sub>O Milli-Q<sup>®</sup> autoclavada (completar 100 mL). *Solução final* = Solução I (36,5 mL) + Solução II (36,5 mL) + 5 e/ou 10 mL de LDL, sendo todos os reagentes utilizados da Sigma-Aldrich<sup>®</sup>.

As avaliações da motilidade foram realizadas pelo sistema computadorizado CASA (modelo Sperm Class Analyzer - SCA<sup>®</sup> v.4.0) nas horas 1 (T1, pré-resfriamento), 24 (T24), 48 (T48) e 72 (T72) pós-diluição final. Seguindo metodologia proposta por Farell *et al.* (1998) foram utilizados, para as ponderações sobre a eficácia dos diluidores empregados quanto aos parâmetros cinéticos do CASA, aquele conjunto de parâmetros que, no estudo citado, apresentaram maior correlação com a fertilidade. Esses parâmetros foram: Motilidade total (MT), Motilidade progressiva (MP), Velocidade Curvilínea (VCL), Velocidade de Trajeto (VAP), Velocidade Progressiva (VSL), Linearidade (LIN), Retilinearidade (STR), Índice de Oscilação (WOB), Amplitude do deslocamento Lateral de Cabeça (ALH) e Frequência de Batimentos de Cauda (BCF).

Em cada avaliação uma palheta foi reaquecida a 37°C/30 segundos e seu conteúdo foi depositado em tubo Eppendorf<sup>®</sup> de 1,5 mL e incubado em “banho-seco” a 37°C/5 minutos antes de serem submetido à análise. O setup utilizado para análise dos espermatozoides de búfalos foi: área da partícula (20 a 70 microns<sup>2</sup>), VCL (10 > lentos < 25; >25 médios < 50, e rápidos > 50 microns/segundo), Progressividade (> 70% STR), Circular (< 50% LIN), Pontos para o VAP (5) e Conectividade (12). Para a análise pelo CASA, gotas de 5 µL de cada amostra foram colocadas entre lâmina e lamínula, previamente aquecidas e mantidas a 37°C durante a avaliação. Foram capturados nove imagens e selecionados os cinco campos mais homogêneos, com um mínimo de 200 células espermáticas/campo foram analisados para cada amostra.

A integridade funcional da membrana plasmática dos espermatozoides foi avaliada pelo teste hiposmótico (HOST) para os tempos 1h (T1), 24hs (T24), 48hs (T48) e 72hs (T72). Para o teste, uma alíquota de 50 µL de sêmen foi adicionada a 500 µL de uma solução hiposmótica, contendo frutose-citrato de sódio a 121 mOsm/L (2,702g de frutose + 1,324g de citrato de sódio). Esta solução foi incubada por 30 minutos em banho-seco a 37°C e fixada em 200 µL de formol salina tamponada, para posterior análise em microscópio de contraste de fase (x1000), sendo contadas 200 células.

O desenho amostral foi desenvolvido utilizando 4 extensores, 4 avaliações realizadas em diferentes momentos e 11 reprodutores, configurando um esquema de blocagem, caracterizando três fontes de variação (extensor, tempo de refrigeração e touro). Por se tratar de um desenho em blocos ao acaso com medidas repetidas em cada tratamento e animal, o teste de Friedman foi o mais adequado, sendo este realizado comparando par a par (comparação via “*pairwise*”). O pacote estatístico utilizado foi o STATA 12.0 Statistical Analysis Software (Statacorp, 2012).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As características físicas dos ejaculados *in natura* utilizados para o experimento estão apresentados na Tabela 34.

Já na primeira tentativa, os parâmetros espermáticos encontrados ultrapassaram os valores mínimos de turbilhão ( $\geq 3$ ), motilidade ( $\geq 70\%$ ), vigor ( $\geq 3$ ), concentração ( $\geq 300 \times 10^6$  SPTZ/mL) e SPTZ normais ( $\geq 70\%$ ) estipulados para serem mantidos e submetidos ao resfriamento CBRA (2013). Este achado demonstra a normalidade da função reprodutiva dos doadores e expressam o resultado do regime de coleta semanal ininterrupta por pelo menos dois

anos consecutivos. A regularidade da coleta seminal evitou o envelhecimento das reservas espermáticas extragonadais dos doadores minimizando o risco de queda na qualidade espermática. Os bons valores de concentração e número total de espermatozoides por ejaculado podem ser atribuídos, pelo menos em parte, à falsa monta (primeira monta com desvio de pênis e sem coleta), que deve ter contribuído para uma maior excitação e boa concentração do ejaculado ao intervalo de uma semana entre coletas.

Tabela 34 - Características físicas e morfológicas dos ejaculados de búfalos da raça Murrah (n=11) avaliados imediatamente pós-coleta.

Animais	Volume (mL)	Turbilhão (0-5)	Motilidade Subjetiva (%)	Vigor (0-5)	Concentração (x10 <sup>6</sup> /mL)	DM (%)	Normais (%)
1	1,4	4	90	3	910	7,5	85,3
2	2,0	3	85	3	1095	6,0	88,1
3	1,5	3	80	3	1060	5,0	87,2
4	3,0	3	85	3	1200	5,0	80,4
5	1,2	3	80	3	1520	6,7	91,4
6	2,5	3	90	4	1305	4,8	92,5
7	2,1	4	95	4	1565	8,1	80,1
8	1,7	4	85	3	1610	6,2	86,8
9	3,0	4	90	4	745	7,1	84,6
10	3,1	3	90	4	800	9,1	81,0
11	2,2	4	95	4	3250	6,7	93,5
<b>Média±DV</b>	<b>2,2 ± 0,7</b>	<b>3,5 ± 0,5</b>	<b>87,7 ± 5,2</b>	<b>3,5 ± 0,5</b>	<b>1369,1 ± 659,5</b>	<b>6,7 ± 1,3</b>	<b>86,5 ± 4,5</b>

DM = Defeitos maiores; DV = Desvio padrão.

Os valores de motilidade e dos parâmetros de cinética espermática avaliados pelo sistema computadorizado (CASA) estão apresentados na Tabela 35, por horário de avaliação. O T1 foi a avaliação feita após a diluição do sêmen dos búfalos, nos quatro extensores preconizados e antes da refrigeração. Nesta primeira avaliação foram observadas em todos os extensores, uma motilidade espermática total (MT) e motilidade progressiva (MP) com valores maiores que 90 e 79%, respectivamente, valores próximos aos encontrados na avaliação feita de maneira subjetiva (Tabela 34), logo após a coleta. Na primeira avaliação pelo CASA (T1) não foi observada qualquer diferença no potencial de preservação das motilidades pelos quatro extensores. Isto foi indicativo que neste tempo e temperatura de incubação, todos os meios não apresentavam qualquer componente ou concentração que fosse deletério a manutenção das motilidades. De fato, todos os componentes presentes nos quatro meios têm sido utilizados em diluidores na espécie bubalina (Akhter *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2012 e Almeida *et al.*, 2017) e outra espécies (Neves, 2008 e Borges-Silva *et al.*, 2015).

Pode-se observar que até 72 horas de incubação os valores de motilidade total mantiveram-se acima dos 70% e a motilidade progressiva próximas de 50%. A manutenção da motilidade nestes valores por este tempo mostra o bom potencial, desta forma de preservação espermática, para uso em inseminação convencional e IATF. Em outros trabalhos com sêmen de búfalos refrigerado a 5°C com o diluidor TRIS com 10% LDL por 48 horas, Becerra (2017) reportou ter encontrado uma MT de 90 e 60% e MP 40 e < 30% nas 24 e 48 horas de incubação, respectivamente. Enquanto Almeida *et al.* (2016) usando o mesmo meio diluidor encontraram para a MT 81,3 e 70,4% e MP 51,2 e 41,8%, para as 24 e 48 horas de incubação, respectivamente.

O potencial do frio causar injúrias nas células espermáticas é menor com a refrigeração (pelo menos na fase inicial de incubação) do que o congelamento (Bucker *et al.*, 2009; Borges-Silva *et al.*, 2015; Almeida *et al.*, 2015; Almeida *et al.*, 2016 e Almeida *et al.*, 2017). Isto se reflete na sobrevida *in vitro* do sêmen descongelado que é bem mais curta do que o sêmen refrigerado. Devido às crioinjúrias no sêmen congelado, ele é considerado, depois do

descongelamento como pré-capacitado (Watson, 1995), o que explica a sua menor longevidade. Portanto, a maior sobrevida/longevidade do sêmen refrigerado potencializa o seu poder de fecundação, quando depositado no útero.

Tabela 35 - Efeitos de diferentes diluidores, utilizados para sêmen de búfalos (n=11, 1 ejaculado/doador), pós-diluição (T1 hora - temperatura ambiente) e refrigeração à 5°C (T24, T48 e T72 horas), nos parâmetros de cinética espermática pela análise computadorizada (CASA).

Parâmetros espermáticos	Tempo (horas)	Diluidores			
		TES-TRIS 10% LDL	TES-TRIS 5% LDL	TRIS 10% LDL	TRIS 5% LDL
MT (%)	1	96,5 <sup>a</sup>	93,8 <sup>a</sup>	96,3 <sup>a</sup>	96,1 <sup>a</sup>
	24	93,9 <sup>a</sup>	93,8 <sup>a</sup>	90,9 <sup>a</sup>	89,2 <sup>a</sup>
	48	89,9 <sup>a</sup>	92,4 <sup>a</sup>	88,0 <sup>a</sup>	87,5 <sup>a</sup>
	72	80,0 <sup>a</sup>	80,2 <sup>a</sup>	78,4 <sup>ab</sup>	75,7 <sup>b</sup>
MP (%)	1	81,9 <sup>a</sup>	81,9 <sup>a</sup>	81,4 <sup>a</sup>	79,4 <sup>a</sup>
	24	76,5 <sup>a</sup>	74,9 <sup>ab</sup>	72,8 <sup>ab</sup>	64,8 <sup>b</sup>
	48	66,9 <sup>ab</sup>	71,3 <sup>a</sup>	64,0 <sup>ab</sup>	62,4 <sup>b</sup>
	72	55,8 <sup>a</sup>	55,2 <sup>ab</sup>	50,4 <sup>bc</sup>	48,5 <sup>c</sup>
VCL (µm/s)	1	103,3 <sup>a</sup>	88,5 <sup>b</sup>	98,0 <sup>ab</sup>	89,0 <sup>b</sup>
	24	87,6 <sup>a</sup>	82,4 <sup>b</sup>	89,9 <sup>a</sup>	81,8 <sup>b</sup>
	48	63,8 <sup>b</sup>	82,4 <sup>a</sup>	89,9 <sup>a</sup>	81,8 <sup>a</sup>
	72	67,7 <sup>c</sup>	79,8 <sup>b</sup>	85,0 <sup>a</sup>	69,8 <sup>c</sup>
VAP (µm/s)	1	70,5 <sup>a</sup>	62,5 <sup>b</sup>	76,2 <sup>a</sup>	57,2 <sup>b</sup>
	24	54,8 <sup>b</sup>	60,6 <sup>ab</sup>	70,9 <sup>a</sup>	56,2 <sup>b</sup>
	48	42,6 <sup>c</sup>	52,7 <sup>b</sup>	62,5 <sup>a</sup>	55,3 <sup>b</sup>
	72	36,2 <sup>c</sup>	47,8 <sup>b</sup>	44,5 <sup>b</sup>	56,3 <sup>a</sup>
VSL (µm/s)	1	43,3 <sup>ab</sup>	42,8 <sup>ab</sup>	48,4 <sup>a</sup>	32,0 <sup>b</sup>
	24	41,4 <sup>b</sup>	41,6 <sup>b</sup>	53,2 <sup>a</sup>	32,6 <sup>c</sup>
	48	27,5 <sup>c</sup>	37,4 <sup>b</sup>	44,2 <sup>a</sup>	27,9 <sup>c</sup>
	72	22,9 <sup>c</sup>	31,7 <sup>b</sup>	39,8 <sup>a</sup>	21,7 <sup>c</sup>
LIN (%)	1	44,3 <sup>b</sup>	46,0 <sup>b</sup>	51,1 <sup>a</sup>	36,5 <sup>c</sup>
	24	46,7 <sup>b</sup>	46,6 <sup>b</sup>	56,2 <sup>a</sup>	36,9 <sup>c</sup>
	48	41,1 <sup>c</sup>	47,8 <sup>b</sup>	57,4 <sup>a</sup>	33,2 <sup>d</sup>
	72	33,7 <sup>b</sup>	45,3 <sup>a</sup>	48,8 <sup>a</sup>	31,3 <sup>b</sup>
STR (%)	1	65,9 <sup>a</sup>	65,8 <sup>a</sup>	68,8 <sup>a</sup>	59,5 <sup>b</sup>
	24	70,6 <sup>b</sup>	69,7 <sup>b</sup>	74,4 <sup>a</sup>	58,3 <sup>c</sup>
	48	63,7 <sup>b</sup>	73,2 <sup>a</sup>	75,1 <sup>a</sup>	45,1 <sup>c</sup>
	72	62,2 <sup>b</sup>	67,5 <sup>a</sup>	65,7 <sup>a</sup>	49,4 <sup>c</sup>
WOB (%)	1	67,9 <sup>b</sup>	67,6 <sup>b</sup>	73,7 <sup>a</sup>	62,3 <sup>b</sup>
	24	64,2 <sup>b</sup>	65,3 <sup>b</sup>	73,8 <sup>a</sup>	65,4 <sup>b</sup>
	48	60,3 <sup>c</sup>	68,3 <sup>b</sup>	77,8 <sup>a</sup>	67,4 <sup>b</sup>
	72	55,3 <sup>c</sup>	67,1 <sup>b</sup>	74,0 <sup>a</sup>	62,4 <sup>b</sup>
ALH (µm)	1	4,0 <sup>b</sup>	3,7 <sup>b</sup>	3,0 <sup>a</sup>	3,4 <sup>b</sup>
	24	4,0 <sup>b</sup>	3,9 <sup>b</sup>	3,2 <sup>a</sup>	3,3 <sup>a</sup>
	48	3,3 <sup>bc</sup>	3,7 <sup>c</sup>	2,6 <sup>a</sup>	2,9 <sup>ab</sup>
	72	3,5 <sup>b</sup>	3,7 <sup>b</sup>	2,7 <sup>a</sup>	3,0 <sup>a</sup>
BCF (Hz)	1	8,4 <sup>b</sup>	8,5 <sup>b</sup>	10,0 <sup>a</sup>	8,9 <sup>b</sup>
	24	10,2 <sup>ab</sup>	9,4 <sup>b</sup>	10,9 <sup>a</sup>	10,3 <sup>a</sup>
	48	10,1 <sup>a</sup>	10,5 <sup>a</sup>	11,1 <sup>a</sup>	10,2 <sup>a</sup>
	72	9,6 <sup>c</sup>	10,2 <sup>b</sup>	10,7 <sup>a</sup>	10,3 <sup>b</sup>

Letras diferentes em cada característica espermática (linha), diferem estatisticamente entre si (p<0,05). VCL: Velocidade Curvilínea; VAP: Velocidade de Trajeto; VSL: Velocidade Progressiva; LIN: Linearidade; STR: Retilinearidade; WOB: Índice de Oscilação; ALH: Amplitude do Deslocamento Lateral de Cabeça e BCF: Frequência de Batimentos de Cauda.

Verstegen *et al.* (2002) reportaram que os parâmetros de movimentação espermática por meio do CASA, estão relacionados com a taxa de fecundação, onde valores de VCL, VSL e VAP são significativamente maiores em amostras que produzem mais de 50% de oócitos fecundados *in vitro*. Ainda segundo o autor os parâmetros BCF e LIN têm correlação positiva com a taxa de prenhez, podendo fornecer informações úteis para o uso do sêmen nas fêmeas (Farrell *et al.*, 1998; Verstegen *et al.*, 2002 e Ahmed *et al.*, 2016). A linearidade e a retilinearidade e WOB, que refletem os valores de VSL, VCL, VAP caracterizam a qualidade/eficiência do movimento espermático. Segundo Verstegen *et al.* (2002), um maior ALH é caracterizado por movimentos espermáticos, que resultam na elevação do gasto de energia dos espermatozoides durante o deslocamento e pior qualidade do movimento espermático (Arruda *et al.*, 2002). O BCF é considerado o correspondente ao vigor das células espermáticas (Contri *et al.*, 2010) e, mostra a eficiência do batimento flagelar.

As características de VCL, VAP, VSL, LIN, STR, WOB, ALH, e BCF dos espermatozoides nos quatro diluidores estão apresentados na Tabela 35. Em todos os horários de avaliação, do início ao final do período de incubação, foram detectadas diferenças significativas entre tratamentos.

Avaliando-se todos os parâmetros em conjunto podem-se identificar duas tendências mais evidentes. A primeira, nos diversos horários, com maior frequência na maioria das características de movimento observa-se os piores valores com o meio TRIS 5% de LDL. A segunda, mostra que o meio TRIS 10% de LDL apresentou, na grande maioria dos horários avaliados, melhores valores para todos os parâmetros de cinética, exceto para o VAP às 72 horas de incubação, que apresentou valor intermediário. Os parâmetros dos espermatozoides diluídos nos meios TES-TRIS 5 e 10% de LDL apresentaram valores intermediários e até inferiores, dependendo do horário, aos encontrados para o meio TRIS 10% de LDL. Existe na composição do meio TES-TRIS leite desnatado, que tem efeito crioprotetor (Hafez e Hafez, 2004) e pode ter em sinergia com a LDL, contribuindo na melhor preservação de alguns parâmetros espermáticos em certos horários de incubação, em relação ao meio TRIS 5% de LDL. Por outro lado, poder-se-ia esperar o mesmo efeito benéfico para o meio TES-TRIS com 10% LDL, comparando-o como TRIS 10%, o que não se confirmou. Para vários parâmetros espermáticos e em vários horários de incubação, o meio TES-TRIS 10% de LDL preservou de forma menos eficiente a qualidade do movimento espermático comparado ao meio TRIS 10% LDL. Isto se comprova ao verificar que o valor de ALH foi maior para os diluidores TES-TRIS nas diferentes concentrações comparado ao TRIS 10% LDL, o que neste caso, indica que houve uma maior interferência na progressividade espermática.

Çoian *et al.* (2010) relataram que um dos principais fatores associados ao declínio na motilidade e fertilidade do sêmen estocado sob refrigeração é a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), que ocorre como consequência normal do metabolismo espermático, resultando na queda irreversível na qualidade do sêmen refrigerado. Segundo Nichi *et al.* (2006), os espermatozoides têm uma limitada capacidade de resistência ao estresse oxidativo. Em estudo realizado com sêmen de búfalo refrigerado, Kardivel *et al.* (2009), demonstraram que há geração de espécies reativas de oxigênio e ocorrência de peroxidação dos lipídeos dos espermatozoides que sofrem um aumento significativo e linear entre os momentos 0 e 72 horas de refrigeração. Foi demonstrado por estes autores que ambos os eventos apresentaram correlação negativa com motilidade espermática, potencial de membrana mitocondrial e integridade de cromatina espermática. A queda na qualidade do movimento espermático, durante o período de incubação, observada nos quatro meios utilizados deve estar associada, entre outras prováveis causas, à produção de espécies reativas de oxigênio. Por não ter sido avaliada a produção de EROs neste trabalho, não se pode esclarecer se a diferença encontrada entre os meios utilizados foi em função deste mecanismo ou por outra razão ligada a composição dos meios diluidores.

Os resultados de avaliação da integridade funcional da membrana plasmática (HOST) estão apresentados na Tabela 36. Os percentuais de espermatozoides reativos ao HOST para o sêmen foram elevados para todos os tratamentos avaliados no T1, evidenciando que os diluidores foram eficientes em proteger a integridade da membrana espermática neste primeiro momento. Entretanto, no tempo 1 o TRIS com 10% LDL, foi significativamente superior ( $p<0,05$ ) aos demais meios, apresentando mais de 83% de espermatozoides reagentes. Os espermatozoides mantidos no meio TES-TRIS, quer seja com 10 ou 5% de LDL, apresentaram menor proporção de espermatozoides reativos do que a encontrada no meio TRIS 10% exceto no tempo de incubação 24 hs. Por outro lado, a incidência de espermatozoides reativos ao teste foi muito similar entre os meios TRIS 10% e 5%. Valores similares foram relatados por Becerra (2017), ao avaliar o sêmen de búfalos refrigerado a 5°C por 48 horas, quando submetidos ao HOST, sendo encontrado 74,7% de espermatozoides reagentes para o mesmo diluidor TRIS com 10% LDL.

Em pesquisa anterior ao presente experimento Akhter *et al.* (2011), verificaram que a concentração de 10% de LDL foi a que proporcionou melhor integridade de membrana comparada as concentrações de 2,5, 5 e 15% de LDL e 20% de gema de ovo, em meio TRIS.

Tabela 36 - Efeitos de diferentes diluidores, utilizados para sêmen de búfalos (n=11, 1 ejaculado/doador), pós-diluição (T1 hora) e refrigeração à 5°C (T24, T48 e T72 horas), na integridade de membrana espermática pelo Teste Hiposmótico (HOST).

Parâmetro	Tempo (horas)	Diluidores			
		TES-TRIS 10% LDL	TES-TRIS 5% LDL	TRIS 10% LDL	TRIS 5% LDL
HOST (%)	1	78,1 <sup>b</sup>	77,1 <sup>b</sup>	83,8 <sup>a</sup>	78,8 <sup>b</sup>
	24	75,5 <sup>a</sup>	69,6 <sup>b</sup>	73,6 <sup>ab</sup>	69,6 <sup>b</sup>
	48	64,7 <sup>b</sup>	64,8 <sup>b</sup>	68,6 <sup>a</sup>	66,6 <sup>ab</sup>
	72	59,8 <sup>b</sup>	60,0 <sup>b</sup>	63,5 <sup>a</sup>	61,6 <sup>ab</sup>

Letras diferentes na linha, diferem estatisticamente entre si ( $p<0,05$ ).

Cada constituinte dos diferentes diluidores, possuem efeitos benéficos para o processo de proteção dos espermatozoides contra o choque térmico, provocado pela refrigeração. Manjunath *et al.* (2002) reportaram que a gema do ovo por exemplo possui lipoproteínas de baixa densidade (LDL), que se ligam a proteínas presentes no plasma seminal (BSPs), as quais são prejudiciais aos espermatozoides. Segundo os autores a ligação das BSPs com as LDLs é rápida, específica e saturável, sendo os complexos formados (LDL-BSP) estáveis. O efluxo de colesterol provocado pelas BSPs resulta na desestabilização da membrana plasmática, diminuindo a resistência espermática ao choque pelo frio e a criopreservação. Quando o sêmen é diluído em extensores contendo gema de ovo, dentro de minutos após a coleta, as lipoproteínas (LDLs) sequestram grande parte das proteínas BSPs, presentes no plasma seminal, prevenindo ou minimizando a ocorrência de modificações da membrana plasmática dos espermatozoides. Assim, as lipoproteínas da gema de ovo (LDLs) podem oferecer proteção aos espermatozoides, pela redução do efeito deletério das proteínas BSP sobre a membrana plasmática, resultando em melhor qualidade do sêmen refrigerado ou criopreservado.

O leite é um meio biológico de composição complexa composto de proteínas, sais, glicídios, lipídios, vitaminas, etc. Tem sido utilizado na sua forma integral, desnatado ou reconstituído, onde seu pH em torno de 7,0 e a pressão osmótica em torno de 300 mM são próximos aos valores fisiológicos do sêmen (Hafez e Hafez, 2004).

Bergeron *et al.* (2007) relataram que a eficácia do leite como meio de diluição e conservação do sêmen tem sido atribuída a sua fração proteica, principalmente a caseína que parece ter efeito protetor sobre os espermatozoides, reduzindo a ligação das proteínas BSP (Bull

Seminal Plasma) com os espermatozoides e a perda de lipídios, preservando a motilidade espermática e a viabilidade durante a estocagem.

Já o TRIS não apenas apresenta atividade tamponante, mas também atua na redução do metabolismo da frutose pela célula espermática, contribuindo para a preservação de sua energia (Mcphail e Goodman, 1984).

Na avaliação da integridade espermática por até 72 horas de refrigeração o meio diluidor TRIS com 10% LDL foi superior ou similar aos demais para todos os tempos analisados.

A escolha do sêmen refrigerado por até 72 horas se deve a dois motivos, o primeiro ao fato de após este tempo a motilidade espermática cair acentuadamente, corroborando com Dhami *et al.* (1994) e Singh *et al.* (2012). E o segundo, porque apesar de as características espermáticas permitirem o uso deste sêmen por até 72 horas, a recomendação para utilização do sêmen refrigerado de búfalos é de até 48 horas (Almeida *et al.*, 2016) para uso na IA ou IATF.

Segundo Ahmed *et al.* (2016), as percentagens altas de espermatozoides viáveis são bons índices para prever a fertilidade *in vitro* e também está altamente correlacionado com o sucesso da taxa de clivagem quando usada a fertilização *in vitro* (Boccia *et al.*, 2010). Adicionalmente, Verstegen *et al.* (2002) e Ahmed *et al.* (2016) reportaram que os espermatozoides com movimento progressivo podem abranger uma distância mais longa em um curto período de tempo, resultando em maior taxa de concepção.

A hipótese de que o uso de sêmen refrigerado poderia melhorar a capacidade de preservar a longevidade e integridade dos espermatozoides bubalinos, com o decorrer do tempo de refrigeração a 5°C em função do meio extensor utilizado, foi suportada pelo melhor resultado obtido pelo diluidor TRIS com 10% de LDL para a maioria dos parâmetros cinéticos e pela integridade espermática obtida durante os tempos avaliados.

A exploração de búfalos possui alguns gargalos pertinentes à espécie, tais como a sazonalidade e dificuldade de detecção de estros. Com a utilização de protocolos hormonais estes problemas estão sendo ultrapassados, porém, a dificuldade de condicionamento dos touros nas centrais, a necessidade de coleta de sêmen constante, e falta de sêmen congelado de búfalos no mercado nacional têm dificultado a obtenção de melhores índices reprodutivos para a bubalinocultura similares aos encontrados para outras espécies como os bovinos. Neste contexto, foi verificado que a utilização do sêmen refrigerado para uso em protocolos de sincronização poderia ser uma opção viável para solucionar alguns destes problemas.

Considerando que a assincronia entre o momento da inseminação e a ocorrência da ovulação é um dos problemas da baixa de eficiência da inseminação, particularmente em búfalos, o uso de sêmen refrigerado poderia ser uma alternativa para melhoria dos índices reprodutivos obtidos com o uso da IATF.

#### 4. CONCLUSÕES

Baseado nos valores observados para os parâmetros cinéticos fornecidos pelo sistema CASA até o tempo de 72 horas de refrigeração à 5°C, todos os diluidores foram capazes de preservar a qualidade do movimento espermático, permitindo seu uso em programas de inseminação artificial.

O meio extensor TRIS com LDL, na concentração de 10%, manteve superioridade para a maioria dos parâmetros analisados e na maioria dos tempos de incubação, além de melhor

manter a integridade de membrana, colocando-o como melhor candidato dos quatro meios para preservação de sêmen bubalino refrigerado.

## AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT da Pecuária) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por cederem parte dos recursos para compra de material do experimento e pela concessão da bolsa, fator indispensável para o andamento e finalização do curso.

## REFERÊNCIAS

AHMED, H.; ANDRABI, S.M.H.; ANWAR, M. et al. Use of post-thaw semen quality parameters to predict fertility of water buffalo (*Bubalus bubalis*) bull during peak breeding season. *Andrologia*, v.20, p.1-6, 2016.

AKHTER, S.; ANSARI, M.S.; RAKHA, B.A. et al. Effect of low density lipoproteins in extender on freezability and fertility of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull semen. *Theriogenology*, v.76, p.759-764, 2011.

ALMEIDA, J.; BRITO, M.F.; BECERRA, V.A.B. et al. Evaluation of the pregnancy rates in primiparous buffaloes submitted to FTAI with refrigerated semen vs. frozen during the unfavorable breeding station. *Proceedings In: 31<sup>ST</sup> ANNUAL MEETING OF THE BRAZILIAN EMBRYO TECHNOLOGY SOCIETY (SBTE)*; Cabo de Santo Agostinho, PE, Brazil, August 17<sup>th</sup> to 19<sup>th</sup>, 2017. Abstracts. A022, *Anim. Repro.* Jul./Sept. v.14, n.3, p.666, 2017.

ALMEIDA, J.; BRITO, M.F.; AULER, P.A. et al. Avaliação das taxas de prenhez em búfalas com o uso de sêmen refrigerado vs. congelado em programas de IATF durante a estação reprodutiva desfavorável. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 21, p.99, 2015, Belo Horizonte, MG. *Anais...Belo Horizonte: CBRA*, 2015.

ALMEIDA, J.; NEVES, B.P.; BRITO, M.F. et al. Pregnancy rates of buffaloes (*Bubalus bubalis*) using cooled or frozen semen at fixed time artificial insemination (FTAI) - Preliminary results. In: XI CONGRESSO MUNDIAL DE BÚFALOS - Cartagena - Colômbia, Medicina Veterinária y Zootecnia, Septiembre/Diciembre, 2016.

ARRUDA, R.P.; BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G. et al. Effects of extenders and cryoprotectants on stallion sperm head morphometry. *Theriogenology*, v.58, n.2, p.253-256, 2002.

BECERRA, V.A.B. Efeito da adição de Aniba canelilla, blueberry e polifenol de chá verde sobre a viabilidade in vitro de espermatozoides de búfalo (*Bubalus bubalis*) resfriados a 5°C. 2017. 69f. Dissertação (Mestrado) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte.

BERGERON, A.; BRINDLE, Y.; BLONDIN, P. et al. Milk caseins decrease the binding of the major bovine seminal plasma proteins to sperm and prevent lipid loss from the sperm membrane during sperm storage. *Biol. Reprod.*, v.77, p.120-126, 2007.

BOCCIA, L.; DI PALO, R.; DE ROSA, A. et al. Evaluation of buffalo semen by Trypan blue/Giemsa staining and related fertility in vitro. *Ital. J. Anim. Sci.*, v.6, (Suppl. 2), p.739-742, 2007.

- BORGES-SILVA, J.C.; SILVA, M.R.; MARINHO, D.B. et al. Cooled semen for fixed-time artificial insemination in beef cattle. *Reprod. Fertil. Dev.*, v.28, p.1004-1008, 2015.
- BUCHER, A.; KASIMANICKAM, R.; HALL, J.B. et al. Fixed-time AI pregnancy rate following insemination with frozen-thawed or fresh-extended semen in progesterone supplemented CO-Synch protocol in beef cows. *Theriogenology*, v.71, p.1180-1185, 2009.
- CBRA-COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal. 3 ed, Belo Horizonte: CBRA, 104p., 2013.
- ÇOIAN, K.; BASPINAR, N.; BUCAK, M.N. et al. Influence of methionine and dithioerythritol on sperm motility, lipid peroxidation and antioxidante capacities duraing liquid storage of ram semen. *Rev. Vet. Sci.*, v.89, p.426-431, 2010.
- CONTRI, A.; VALORZ, C.; FAUSTINI, M. et al. Effect of semen preparation on casa motility results in cryopreserved bull spermatozoa. *Theriogenology*, Philadelphia, v.74, n.3, p.424-435, 2010.
- DHAMI, A.J.; JANI, V.R.; MOHAN, G. et al. Effect of extenders and additives on freezability, post-thaw thermoresistance and fertility of frozen Murrah buffalo semen under tropical climate. *Buffalo J.*, v.1, p.35-45, 1994.
- FARRELL, P.B.; PRESICCE, G.A.; BROCKETT, C.C. et al. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. *Theriogenology*, v.49, p.871-879, 1998.
- HAFEZ, E.S.E., HAFEZ, B. Espermatóides e plasma seminal: Reprodução Animal. 7 ed., São Paulo, Manole, p. 97-110, 2004.
- HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim. Reprod. Sci.*, v.62, p.3-22, 2000.
- IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/home>, 2013.
- 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.
- MCPHAIL, D.B., GOODMAN, B.A. Tris buffer - a case for caution in its use for cooper containing systems. *Biochem. J.*, v.221, p.559-560, 1984.
- MANJUNATH, P.; NAUC, V.; BERGERON, A. et al. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. *Biol. Reprod.*, v.67, p.1250-1258, 2002.
- NEVES, M.M. Extração das lipoproteínas de baixa densidade da gema do ovo de *Gallus domesticus* e sua aplicação na criopreservação do sêmen canino. 2008. 116f. Tese (Doutorado) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG.
- NICHI, M.; BOLS, P.E.J.; ZOGE, R.M. et al. Seasonal variation in semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* bulls raised under tropical conditions. *Theriogenology*, v.66, p.822-828, 2006.



SINGH, A.K.; SINGH, V.K.; NARWADE, B.M. et al. Comparative quality assessment of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen chilled (5°C) in egg yolk- and soya milk-based extenders. *Reprod. Dom. Anim.*, v.47, p.596-600, 2012.

STATACORP. Stata: Release 12. Statistical Software. *College Station, TX*: StataCorp LP, 2012.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; OCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, v.57, n.1, p.149-179, 2002.

VISHWANATH, R. Artificial insemination: the state of the art. *Theriogenology*, v.59, p.571-584, 2003.

WATSON, P.F. Recent development and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.*, v.7, p.871-891, 1995.

YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: Knobil, E.; Neill, J. (Ed.). *The physiology of reproduction*. 2. ed. New York: Raven Press, p.189-317, 1994.

## Capítulo 6 - AVALIAÇÃO DA LONGEVIDADE ESPERMÁTICA EM SÊMEN REFRIGERADO DE BÚFALOS (*BUBALUS BUBALIS*) À 5°C, NO EXTENSOR TRIS COM 10% LDL, EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE LECITINA DE SOJA

Jaci Almeida<sup>1</sup>, Beatriz P. Neves<sup>1</sup>, Mayara F. Brito<sup>1</sup>, Verônica A. B. Becerra<sup>1</sup>, Patrícia A. Auler<sup>1</sup>, João P. Hadad<sup>2</sup>, Marc Henry<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, MG  
[jacialmeida01@yahoo.com.br](mailto:jacialmeida01@yahoo.com.br)

<sup>2</sup> Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, MG

<sup>3</sup> Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

\*Corresponding author. Tel.: +55 31 97174-3066

E-mail addresses: [jacialmeida01@yahoo.com.br](mailto:jacialmeida01@yahoo.com.br) (J. Almeida).

### RESUMO

Os ejaculados de 11 touros búfalos, da raça Murrah, com idade variando de 4 a 6 anos foram coletados por vagina artificial e submetidos às análises das características físicas e morfológicas do sêmen. O experimento objetivou testar *in vitro* a eficácia de quatro diferentes extensores: Controle (TRIS com 10% LDL) e o mesmo extensor nas concentrações de 0,5, 1 e 2% de lecitina de soja sobre a longevidade espermática de búfalos, no processo de refrigeração a 5°C por 1, 24, 48, 72, 96 e 120 horas. Após a coleta cada ejaculado foi fracionado em 4 alíquotas, para a obtenção de 50x10<sup>6</sup> SPTZ/mL, envasado em palhetas de 0,5 mL, refrigerado durante 4 horas obtendo-se uma curva de resfriamento de 0,25°C/minuto. As palhetas foram mantidas refrigeradas a 5°C e sequencialmente avaliadas, reaquecendo-se o conteúdo a 37°C/30 segundos antes da avaliação da motilidade espermática (total e progressiva), utilizando o sistema computadorizado (CASA). Foram retiradas amostras para avaliação pelo teste hiposmótico (HOST) nos tempos 1, 24, 48 e 72 horas. Para a análise estatística utilizou-se o pacote STATA 12.0, sendo os valores obtidos submetidos ao Teste de Friedman (p<0,05). Os espermatozoides progressivos e a integridade da membrana plasmática foram superiores (p<0,05) no extensor de TRIS com 10% LDL acrescido de 0,5% Lecitina de soja (67,2 e 67,9%) no processo de refrigeração por 48 horas. Em conclusão, avaliação comparativa dos parâmetros espermáticos obtidos revelou que o extensor TRIS com 10% LDL acrescido de 0,5% de lecitina de soja, pode ser efetivamente usado para a preservação do sêmen de búfalo refrigerado em IA e IATF, por até 48 horas.

**Termos de Indexação:** Sêmen refrigerado, Lipoproteína de baixa densidade, Lecitina de soja.

### 1. INTRODUÇÃO

A moderna reprodução animal tem como base a utilização do sêmen congelado para a fertilização das diversas espécies de animais de produção, entretanto o processo de criopreservação causa um decréscimo significativo na motilidade espermática. Uma das principais causas se devem as alterações na bioquímica estrutural dos espermatozoides, promovendo a morte dessas células por afetar diferentes compartimentos citológicos (Yoshida, 2000). As lesões parciais que ocorrem nos espermatozoides durante o equilíbrio da refrigeração tornam-se mais evidentes na congelação e descongelação (Tardif *et al.*, 1997).

Na espécie bubalina Rasul *et al.* (2001) relataram após analisar espermatozoides por meio do método de análise computadorizada do sêmen (CASA), que o processo de criopreservação causa lesões no axonema diminuindo a capacidade de movimentação dos espermatozoides. A reorganização estrutural da membrana plasmática do espermatozoide após a

criopreservação parece dificultar a capacidade do espermatozoide de interagir normalmente com as células do trato genital feminino, tornando o espermatozoide menos susceptível para chegar ao local da fecundação *in vivo* ou penetrar nas membranas do oócito (Bailey *et al.*, 2000).

Neste contexto, o sêmen refrigerado surge como uma alternativa para minimizar os danos causados aos espermatozoides no processo de congelamento, apresentando como principais vantagens à prevenção das injúrias relacionadas ao processo de congelamento, garantindo uma maior viabilidade espermática, que por sua vez permite a redução da dose inseminante (Bucker *et al.*, 2009), otimização de reprodutores de alto mérito genético, que possuem baixa resistência ao congelamento do sêmen em programas de inseminação artificial (IA), ausência de custos relacionados à estocagem e simplicidade na manipulação/utilização para IA quando comparado ao sêmen congelado (Vishwanath, 2003). Assim como ser utilizado em cios naturais, induzidos ou não como em programas de inseminação artificial em tempo fixo (IATF), permitindo inseminar um grande número de vacas em dia e hora pré-determinada, sem a necessidade de observação de cio (Baruselli *et al.*, 2004).

O sêmen refrigerado tem chamado atenção como fonte de estudos na bubalinocultura nos últimos anos (Singh *et al.*, 2012; Almeida *et al.*, 2015; Almeida *et al.*, 2016a e Almeida *et al.*, 2017), também as LDLs têm sido alvo de pesquisas para o sêmen refrigerado (Almeida *et al.*, 2016b) e congelado de búfalos (Akhter *et al.*, 2011a e Brito 2014). E finalmente a lecitina de soja (LS) vem sendo fonte de vários estudos para substituição a gema de ovo nos meios extensores (Akhter *et al.*, 2011b; Akhter *et al.*, 2012 e Rastegarnia *et al.*, 2014), na perspectiva de encontrar um extensor que reduza os riscos de contaminação seminal e proporcione ganhos na longevidade e viabilidade no processo de refrigeração do sêmen bubalino.

Assim, a busca por um extensor que não seja de origem animal, bem definido e livre de contaminação é desejável para o sêmen das espécies de animais domésticos (Ansari *et al.*, 2013). No entanto, não foram encontrados trabalhos sobre o tema associando a LDL e a LS para a refrigeração do sêmen de búfalos. A hipótese é que a associação de LDL a 10% com a LS no meio extensor pode incrementar a longevidade e integridade espermática durante a refrigeração a 5°C. Portanto, objetivou-se primeiramente avaliar os efeitos na refrigeração do meio TRIS com 10% de LDL, como substituto da gema de ovo, acrescido de diferentes concentrações de LS em extensores para o sêmen de búfalos Murrah, em variáveis de qualidade do sêmen, após diferentes estágios de refrigeração (isto é, após diluição, equilíbrio a 5°C e armazenamento por um período de até 120 horas).

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Ética

O estudo foi realizado após aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (EV/UFMG), com a aprovação do nº 368/2015, segundo os princípios éticos de experimentação animal.

### 2.2. Local da execução do experimento

O experimento foi conduzido no Centro de Biotecnologia em Bubalinocultura, sediado na Fazenda Experimental de Produção Sustentável da UFMG, em Pedro Leopoldo, Minas Gerais, com altitude média de 710 metros, latitude 19°37'05" S e longitude 44°02'35" W.

### 2.3. Animais

Foram utilizados 11 búfalos (1 ejaculado/búfalo), da raça Murrah, com idade 4 e 6 anos, condicionados a coleta de sêmen com vagina artificial, mantidos a pasto durante todo o experimento, com fornecimento de sal e água *ad libitum*.

### 2.4. Coleta e processamento do sêmen

As coletas de sêmen foram feitas com o auxílio de vagina artificial, com temperatura de 42-45°C, sendo realizada uma falsa monta (intuito de aumentar a concentração espermática), e o ejaculado da segunda monta era utilizado para as diluições. Após as coletas, todos os ejaculados foram submetidos às análises das características físicas e morfológicas do sêmen, onde todos os parâmetros analisados estavam acima dos padrões mínimos preconizado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013) e avaliados sob refrigeração por até 120 horas, pós diluição. Também foram retiradas amostras para avaliação da integridade de membrana espermática pelo teste hiposmótico (HOST) por até 72 horas.

### 2.5. Reagentes

Para a obtenção das LDLs, foi empregada técnica descrita por Moussa *et al.* (2002), com algumas modificações sugeridas por Neves *et al.* (2008), utilizando ovos frescos produzidos em granja comercial. O extensor básico para os grupos de tratamento utilizados neste estudo foi composto por: TRIS (2,42g), ácido cítrico (1,36g), Frutose (1,0g), Amicacina (83,4µg/mL), Pasta Equex STM 0,4% (Nova Chemical Sales, Scituate, MA, EUA), LDL (10 mL) e H<sub>2</sub>O Milli-Q<sup>®</sup> autoclavada (completar 100 mL) adaptado de Brito (2014), sendo todos os reagentes utilizados da Sigma-Aldrich<sup>®</sup>.

A Lecitina de soja (LS) em pó Solec FP-40<sup>®</sup> (Solae), foi utilizada nas concentrações 0, 0,5, 1 e 2%, sendo que o processo de homogeneização para a produção do extensor foi realizado separadamente. Primeiramente homogeneizou-se a LDL 10% por 24 horas em frasco erlenmeyer de 250 mL com um ímã acondicionado em balcão-frigorífico a 5°C. Em outro recipiente similar foi homogeneizada a LS para cada uma das três concentrações (0,5, 1 e 2%) também por 24 horas. E por fim produziu-se a solução TRIS juntando-se a LDL 10% e as concentrações de LS em diferentes recipientes.

Imediatamente pós preparo, os extensores TRIS 10% LDL e o mesmo extensor com diferentes concentrações de LS (0,5, 1 e 2%), foram mantidos refrigerados a 5°C ou congelados até o momento da utilização, com o sêmen na concentração final de 50x10<sup>6</sup> SPTZ/mL.

### 2.6. Envase do sêmen

Cada tratamento foi envasado em 6 palhetas de 0,5 mL (cada uma utilizada para um dos 6 tempos de avaliação 1, 24, 48, 72, 96 e 120 horas), sendo que a palheta do tempo um era avaliada sem passar pelo processo de refrigeração.

### 2.7. Refrigeração

As palhetas foram acondicionadas em sacos plásticos submersos em recipiente com água (1,4 L) a 27°C. O frasco foi colocado em ambiente a 5°C (balcão frigorífico) obtendo-se uma curva de resfriamento de 0,25°C/minuto. As palhetas foram mantidas refrigeradas a 5°C por até 120 horas pós-diluição.

## 2.8. Avaliação da motilidade

Para a avaliação cinética no CASA, cada palheta era cortada e seu conteúdo era inicialmente depositado em tubo Eppendorf® de 1,5 mL e incubada em “banho-seco” a 37°C/5 minutos, até que fossem submetidas à análise da motilidade pelo sistema computadorizado (CASA) através do aparelho modelo Sperm Class Analyzer (SCA® v.4.0). O Setup utilizado para análise do sêmen de búfalos foi: área da partícula (20 a 70 microns<sup>2</sup>), VCL (10 < Slow < 25; > 25 e Medium < 50), Progressividade (> 70% STR), Circular (< 50% LIN), Pontos para o VAP (5) e Conectividade (12). Para a análise CASA, gotas de 5 µL de cada amostra foram colocadas entre lâmina e lamínula, previamente mantidas a 37°C, sendo utilizados para a análise de cada amostra 5 campos capturados aleatoriamente, homogêneos, com um mínimo de 200 células espermáticas em cada um deles.

Seguindo metodologia proposta por Farrell *et al.* (1998) foram utilizados, para as ponderações sobre a eficácia dos diluidores empregados quanto aos parâmetros cinéticos do CASA, aquele conjunto de parâmetros que, no estudo citado, apresentaram maior correlação com a fertilidade. Esses parâmetros foram: Motilidade total (MT), Motilidade progressiva (MP), Velocidade Curvilínea (VCL), Velocidade de Trajeto (VAP), Velocidade Progressiva (VSL), Linearidade (LIN), Retilinearidade (STR), Índice de Oscilação (WOB), Amplitude do deslocamento Lateral de Cabeça (ALH) e Frequência de Batimentos de Cauda (BCF).

## 2.9. Avaliação da integridade de membrana plasmática

Para o teste hiposmótico (HOST), uma alíquota de 50 µL de sêmen foi adicionada a 500 µL de uma solução HOST contendo frutose-citrato de sódio a 121 mOsm/L (2,702g de frutose + 1,324g de citrato de sódio). Esta solução foi incubada por 30 minutos em banho-seco a 37°C e fixada em 200 µL de formol salina tamponada, para posterior análise em microscópio de contraste de fase (x1000), contou-se 200 células de acordo com a presença ou não de cauda enrolada (Melo *et al.*, 2005). As análises foram realizadas nos tempos 1, 24, 48 e 72 horas.

## 2.10. Análise estatística

O desenho amostral foi desenvolvido utilizando 4 extensores: (TRIS 10% LDL, TRIS 10% LDL + LS 0,5%, TRIS 10% LDL + LS 1% e TRIS 10% LDL + LS 2%), avaliados nos diferentes momentos de conservação (T1 hora - temperatura ambiente, T24, T48, T72, T96 e T120 horas, refrigerado à 5°C), oriundos de 11 reprodutores. Cada alíquota de sêmen foi submetida a diferentes extensores e tempos provenientes do mesmo animal, configurando um esquema de blocagem, logo se caracterizou três fontes de variação (extensor, tempo e touro de origem). A análise estatística foi realizada utilizando-se o pacote STATA 12.0 statistical analysis software (Statacorp, 2012), e o teste de Friedman na comparação de cada extensor par a par (comparação via “*pairwise*”) foi o método mais adequado.

# 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As características físicas dos ejaculados *in natura* utilizados para o experimento estão apresentados na Tabela 37.

Tabela 37 - Características físicas e morfológicas dos ejaculados de búfalos da raça Murrah (n=11) avaliados imediatamente pós-coleta.

Animais	Volume (mL)	Turbilhão (0-5)	Motilidade Subjetiva (%)	Vigor (0-5)	Concentração (x106/mL)	DM (%)	Normais (%)
1	1,5	3	80	3	580	7	76
2	2,5	4	90	4	1450	8	81
3	4	3	80	3	1195	5	72
4	1,2	3	80	3	415	6	78
5	3,3	3	90	4	645	10	86
6	1	4	95	4	1675	4	81
7	1	3	80	3	1160	7	71
8	1	3	85	3	1090	9	75
9	2	3	75	3	895	6	79
10	2,4	3	90	4	2165	9	83
11	2,5	3	85	3	1170	3	70
<b>Média±DV</b>	<b>2,0±1,0</b>	<b>3,2±0,4</b>	<b>84,6±6,1</b>	<b>3,4±0,5</b>	<b>1130,9±484,5</b>	<b>6,7±2,0</b>	<b>77,5±4,9</b>

DM = Defeitos maiores; DV = Desvio padrão.

Logo na primeira avaliação, os parâmetros espermáticos encontrados ultrapassaram os valores mínimos estipulados para serem mantidos e submetidos ao resfriamento. Adicionalmente apresentaram-se dentro do preconizado como valores normais para a espécie bubalina no manual do CBRA (2013). Este achado demonstra a normalidade da função reprodutiva dos doadores e expressa o resultado do regime de coleta semanal ininterrupta por pelo menos dois anos consecutivos. A regularidade da coleta seminal evitou o envelhecimento das reservas espermáticas extragonadais dos doadores minimizando o risco de queda na qualidade espermática. Os bons valores de concentração e número total de espermatozoides por ejaculado podem ser atribuídos, à falsa monta (primeira monta com desvio de pênis e sem coleta), que deve ter contribuído para uma maior excitação e ejaculado de melhor qualidade na segunda tentativa realizada sequencialmente.

Após a diluição do sêmen dos búfalos nos quatro tratamentos preconizados e antes do resfriamento T1 horas, foi realizada a avaliação dos parâmetros espermáticos no sistema computadorizado (CASA). Foi observada MT e MP com valores maiores que 94 e 79%, respectivamente. Este achado indica que houve diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) para a MT entre os tratamentos no pós-diluição, mas evidencia também que os diluidores não prejudicaram os espermatozoides, conforme Tabela 38.

Chaudhari *et al.* (2015) comparando os extensores de leite de soja comercialmente disponíveis (Bioxcell® e Optixcell®) com diluente padrão de Tris-citrato-frutose-ovo-glicerol para a criopreservação do sêmen de búfalos, verificaram porcentagens médias de espermatozoides em extensores TRIS, Bioxcell® e Optixcell® em termos de MP de 69,5, 68,0 e 70,9%, respectivamente pós-diluição.

Em estudo avaliando o sêmen de búfalos nas concentrações de 0,5, 1 e 2% de LS, El-Sherbieny (2014) obteve uma maior MP para o extensor com 0,5% de LS, em relação as concentrações de 1 e 2%.

Singh *et al.* (2012), ao comparar o sêmen de búfalos refrigerado à 5°C, em extensores de LS, nas concentrações de 10, 15, 20, 25, 30% e o controle com gema de ovo não observaram diferenças estatísticas significativas ( $p > 0,05$ ) para a motilidade espermática nos tratamentos pós-diluição. Os valores obtidos para a MP, neste estudo, são maiores que os encontrados pelos autores citados anteriormente, isto possivelmente se explique pelo fato dos búfalos utilizados nesse experimento serem animais já condicionados a coleta de sêmen por mais de 24 meses.

Tabela 38 - Efeitos do extensor TRIS com 10% LDL com diferentes concentrações de lecitina de soja (LS), utilizados para o sêmen de 11 búfalos (1 ejaculado/doador), pós-diluição (T1 horas - temperatura ambiente), e refrigerado à 5°C (T24, T48, T72, 96 e 120 horas) nos parâmetros de cinética espermática.

Parâmetros espermáticos	Tempo (horas)	Extensores			
		TRIS 10% LDL	TRIS 10% LDL + 0,5% LS	TRIS 10% LDL + 1% LS	TRIS 10% LDL + 2% LS
MT (%)	1	98,1 <sup>a</sup>	97,5 <sup>ab</sup>	96,7 <sup>ab</sup>	94,4 <sup>b</sup>
	24	85,2 <sup>a</sup>	91,2 <sup>a</sup>	92,4 <sup>a</sup>	90,2 <sup>a</sup>
	48	71,1 <sup>b</sup>	81,8 <sup>a</sup>	79,2 <sup>ab</sup>	79,3 <sup>ab</sup>
	72	61,7 <sup>b</sup>	67,8 <sup>ab</sup>	68,6 <sup>a</sup>	63,4 <sup>b</sup>
	96	50,5 <sup>a</sup>	50,6 <sup>a</sup>	54,3 <sup>a</sup>	43,4 <sup>a</sup>
	120	42,8 <sup>a</sup>	33,0 <sup>b</sup>	36,8 <sup>ab</sup>	33,1 <sup>b</sup>
MP (%)	1	80,5 <sup>a</sup>	79,0 <sup>a</sup>	83,5 <sup>a</sup>	80,0 <sup>a</sup>
	24	61,4 <sup>b</sup>	78,3 <sup>a</sup>	72,7 <sup>ab</sup>	69,1 <sup>ab</sup>
	48	49,7 <sup>c</sup>	67,2 <sup>a</sup>	57,5 <sup>bc</sup>	54,0 <sup>bc</sup>
	72	39,1 <sup>a</sup>	44,0 <sup>a</sup>	46,4 <sup>a</sup>	40,3 <sup>a</sup>
	96	29,2 <sup>b</sup>	32,8 <sup>ab</sup>	35,6 <sup>a</sup>	23,3 <sup>c</sup>
	120	19,9 <sup>a</sup>	21,7 <sup>a</sup>	20,4 <sup>a</sup>	17,5 <sup>a</sup>
VCL (µm/s)	1	111,2 <sup>a</sup>	96,5 <sup>ab</sup>	86,9 <sup>ab</sup>	84,5 <sup>b</sup>
	24	85,3 <sup>a</sup>	84,6 <sup>a</sup>	87,1 <sup>a</sup>	89,0 <sup>a</sup>
	48	84,7 <sup>a</sup>	76,1 <sup>ab</sup>	74,8 <sup>ab</sup>	62,3 <sup>b</sup>
	72	66,6 <sup>a</sup>	59,0 <sup>ab</sup>	57,0 <sup>b</sup>	63,6 <sup>a</sup>
	96	56,9 <sup>a</sup>	58,7 <sup>a</sup>	56,6 <sup>a</sup>	48,5 <sup>b</sup>
	120	57,8 <sup>a</sup>	61,6 <sup>a</sup>	56,3 <sup>ab</sup>	51,2 <sup>b</sup>
VAP (µm/s)	1	68,3 <sup>a</sup>	61,3 <sup>a</sup>	58,2 <sup>ab</sup>	48,8 <sup>b</sup>
	24	53,8 <sup>a</sup>	49,5 <sup>ab</sup>	45,3 <sup>b</sup>	39,0 <sup>b</sup>
	48	51,4 <sup>a</sup>	44,4 <sup>a</sup>	44,9 <sup>a</sup>	34,0 <sup>b</sup>
	72	51,0 <sup>a</sup>	42,0 <sup>b</sup>	33,5 <sup>c</sup>	32,0 <sup>c</sup>
	96	45,3 <sup>a</sup>	39,8 <sup>a</sup>	34,7 <sup>b</sup>	26,9 <sup>c</sup>
	120	33,1 <sup>ab</sup>	36,0 <sup>a</sup>	31,8 <sup>bc</sup>	27,6 <sup>c</sup>
VSL (µm/s)	1	46,4 <sup>a</sup>	44,1 <sup>ab</sup>	44,6 <sup>ab</sup>	32,5 <sup>b</sup>
	24	39,9 <sup>a</sup>	34,0 <sup>a</sup>	35,8 <sup>a</sup>	33,7 <sup>a</sup>
	48	37,1 <sup>a</sup>	30,6 <sup>ab</sup>	35,4 <sup>ab</sup>	21,7 <sup>b</sup>
	72	39,8 <sup>a</sup>	35,0 <sup>a</sup>	25,4 <sup>b</sup>	22,2 <sup>b</sup>
	96	36,6 <sup>a</sup>	28,1 <sup>a</sup>	26,7 <sup>a</sup>	19,5 <sup>b</sup>
	120	27,9 <sup>a</sup>	28,2 <sup>a</sup>	24,7 <sup>ab</sup>	18,1 <sup>b</sup>
LIN (%)	1	36,5 <sup>b</sup>	40,8 <sup>ab</sup>	39,2 <sup>ab</sup>	45,9 <sup>a</sup>
	24	45,3 <sup>ab</sup>	61,2 <sup>a</sup>	43,2 <sup>ab</sup>	40,4 <sup>b</sup>
	48	33,1 <sup>b</sup>	46,3 <sup>a</sup>	47,6 <sup>a</sup>	33,5 <sup>b</sup>
	72	37,1 <sup>b</sup>	44,2 <sup>a</sup>	40,8 <sup>ab</sup>	38,1 <sup>ab</sup>
	96	56,9 <sup>a</sup>	53,3 <sup>a</sup>	38,8 <sup>b</sup>	37,5 <sup>b</sup>
	120	40,9 <sup>a</sup>	43,5 <sup>a</sup>	42,2 <sup>a</sup>	45,9 <sup>a</sup>
STR (%)	1	64,6 <sup>b</sup>	75,0 <sup>a</sup>	73,6 <sup>ab</sup>	72,3 <sup>ab</sup>
	24	72,9 <sup>b</sup>	85,6 <sup>a</sup>	76,2 <sup>b</sup>	75,4 <sup>b</sup>
	48	63,6 <sup>b</sup>	75,4 <sup>a</sup>	79,8 <sup>a</sup>	66,2 <sup>b</sup>
	72	71,3 <sup>b</sup>	83,4 <sup>a</sup>	73,8 <sup>ab</sup>	72,3 <sup>b</sup>
	96	83,5 <sup>a</sup>	77,3 <sup>ab</sup>	76,3 <sup>b</sup>	74,6 <sup>b</sup>
	120	73,4 <sup>b</sup>	75,3 <sup>ab</sup>	78,4 <sup>a</sup>	78,2 <sup>a</sup>
WOB (%)	1	60,0 <sup>ab</sup>	65,4 <sup>a</sup>	59,1 <sup>b</sup>	58,9 <sup>b</sup>
	24	63,1 <sup>b</sup>	76,3 <sup>a</sup>	56,6 <sup>c</sup>	54,3 <sup>c</sup>
	48	59,1 <sup>a</sup>	60,5 <sup>a</sup>	59,9 <sup>a</sup>	52,8 <sup>a</sup>
	72	59,4 <sup>ab</sup>	75,2 <sup>a</sup>	52,5 <sup>b</sup>	52,7 <sup>b</sup>
	96	70,9 <sup>a</sup>	63,7 <sup>a</sup>	53,6 <sup>b</sup>	54,8 <sup>b</sup>
	120	56,6 <sup>a</sup>	57,7 <sup>a</sup>	56,2 <sup>a</sup>	58,7 <sup>a</sup>
ALH (µm)	1	5,0 <sup>a</sup>	3,9 <sup>a</sup>	4,4 <sup>a</sup>	3,4 <sup>a</sup>
	24	3,9 <sup>b</sup>	2,1 <sup>a</sup>	4,0 <sup>b</sup>	4,4 <sup>b</sup>
	48	4,1 <sup>c</sup>	2,8 <sup>a</sup>	3,5 <sup>b</sup>	3,7 <sup>b</sup>
	72	4,1 <sup>b</sup>	2,7 <sup>a</sup>	3,2 <sup>b</sup>	3,5 <sup>b</sup>
	96	2,6 <sup>a</sup>	3,5 <sup>b</sup>	3,7 <sup>b</sup>	3,7 <sup>b</sup>
	120	3,5 <sup>a</sup>	3,0 <sup>a</sup>	3,2 <sup>a</sup>	3,6 <sup>a</sup>
BCF (Hz)	1	9,0 <sup>b</sup>	10,0 <sup>a</sup>	9,5 <sup>ab</sup>	9,4 <sup>ab</sup>
	24	9,2 <sup>b</sup>	11,0 <sup>a</sup>	9,5 <sup>b</sup>	9,3 <sup>b</sup>
	48	9,6 <sup>ab</sup>	10,8 <sup>a</sup>	10,6 <sup>a</sup>	9,2 <sup>b</sup>
	72	8,9 <sup>a</sup>	8,9 <sup>a</sup>	9,6 <sup>a</sup>	9,7 <sup>a</sup>
	96	10,1 <sup>a</sup>	9,7 <sup>a</sup>	9,7 <sup>a</sup>	9,9 <sup>a</sup>
	120	9,5 <sup>a</sup>	9,0 <sup>a</sup>	8,0 <sup>b</sup>	9,6 <sup>a</sup>

Letras diferentes em cada característica espermática (linha), diferem estatisticamente entre si (p<0,05). MT: Motilidade total; MP: Motilidade Progressiva; VCL: Velocidade Curvilínea; VAP: Velocidade de Trajeto; VSL: Velocidade Progressiva; LIN: Linearidade; STR: Retilinearidade; WOB: Índice de Oscilação; ALH: Amplitude do Deslocamento Lateral de Cabeça; BCF e Frequência de Batimentos de Cauda.

Quanto aos demais parâmetros cinéticos, o TRIS 10% de LDL com 2% de LS apresentou os menores valores para o VCL, VAP e VSL e comparado ao controle (sem LS), sendo que o VCL e VSL foram iguais, para os tratamentos com 0,5 e 1% de lecitina (p>0,05), o

que não aconteceu com o VAP, encontrando-se valor significativamente menor ( $p < 0,05$ ) ao extensor controle e tratamento com 0,5% de LS ( $p < 0,05$ ). Já para o parâmetro WOB, o meio com 0,5% de LS foi significativamente maior aos demais tratamentos com diferentes concentrações de LS ( $p < 0,05$ ). No entanto, para o ALH e BCF todos os tratamentos contendo LS tiveram valores similares ( $p > 0,05$ ).

Para o tempo de 24 horas de refrigeração (Tabela 38) foi possível observar que a MT não apresentou diferença estatística significativa ( $p > 0,05$ ), o mesmo não ocorrendo com a MP, que apresentou diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) entre o controle e o tratamento contendo 0,5% de LS, favorável ao extensor com 0,5% de LS, evidenciando um ganho de movimento espermático quando associado a LS no meio extensor contendo LDL. Mesmo não havendo diferença estatística significativa ( $p > 0,05$ ) é possível observar que os extensores com LS apresentaram maiores valores numéricos que o extensor controle.

Resultados similares foram encontrados por El-Sherbieny (2014), que trabalhando com a LS, obteve 71,0, 64,5 e 61,0% de MP para as concentrações de 0,5, 1 e 2%, respectivamente. Neste caso, o maior valor encontrado para o tratamento com 0,5% de LS, evidencia um efeito positivo da LS incrementando a motilidade espermática. O autor observou ainda efeito similar para a MT, embora não tenha havido diferença estatística significativa ( $p > 0,05$ ).

Para os parâmetros cinéticos LIN, STR, WOB, ALH e BCF, os valores médios encontrados para o extensor com 0,5% de LS foram estatisticamente superiores ( $p < 0,05$ ) aos demais tratamentos (Tabela 38), demonstrando mais uma vez que a LS a 0,5% no meio Tris 10% LDL possui características que protegem os espermatozoides durante o processo de refrigeração.

Já o ALH apresentou o valor mais baixo para o extensor TRIS com 10% LDL e 0,5% LS, indicando que o deslocamento lateral da cabeça do espermatozoide para esse meio tendeu a interferir menos na progressão da célula. Arruda (2003) reportou que o maior valor numérico de ALH se traduz em pior qualidade espermática. Porém, este valor foi determinado matematicamente e ainda não foram estabelecidos limites máximos e mínimos para dizer o quanto de deslocamento da cabeça poderia interferir na motilidade progressiva ou mesmo no processo de fertilização do oócito (Celeghini, 2005 e Celeghini *et al.*, 2008).

Diante dos valores encontrados o extensor TRIS com 10% LDL e 0,5% de LS foi o que apresentou maiores valores para a maioria dos parâmetros cinéticos analisados após 24 horas de refrigeração a 5°C, sendo assim, recomenda-se seu uso para programas de IA em bubalinos.

Para o tempo de 48 horas de refrigeração observa-se que tanto a MT, quanto a MP foram estatisticamente inferiores para o extensor controle ( $p < 0,05$ ), comparados ao extensor com 0,5% de LS, sendo que os extensores contendo LS não diferiram estatisticamente entre si para a MT ( $p > 0,05$ ), mas diferiram para MP ( $p < 0,05$ ), sendo favorável a concentração de LS a 0,5%. No entanto, a MP ainda se manteve acima de 50% para todos os extensores contendo LS, indicando que estes meios poderiam ser utilizados para a IA e IATF à campo. Porém, havendo a possibilidade de coletar os touros e utilizar o sêmen com 24 horas de refrigeração, não se justifica trabalhar com um sêmen de 48 horas que possui menor motilidade que o sêmen de 24 horas. Para os demais parâmetros cinéticos o extensor com concentração de LS a 0,5% foi superior as concentrações de 1 e 2%.

Os resultados obtidos, permitem verificar que a MP no extensor contendo 0,5% de LS foi superior ao extensor sem a LS após 48 horas de diluição, corroborando com Singh *et al.* (2012). Estes mesmos autores, ao avaliarem o extensor com LS nas diferentes porcentagens (10%, 15%, 20%, 25% e 30%), obtiveram uma motilidade 41,7% para o extensor com LS a 25%, sendo este similar ao encontrado para o extensor controle (TRIS gema de ovo). Conforme



observado no Tabela 33, é possível obter uma alta MP com o sêmen refrigerado à 5°C por 48 horas contendo LS 0,5% (> 67,2%), mesmo utilizando uma concentração de LS bem inferior à utilizada por Sing *et al.* (2012).

Quanto aos parâmetros cinéticos, o VCL e VSL foram significativamente similares ( $p>0,05$ ) para os extensores controle e para os meios com LS nas concentrações de 0,5 e 1%, sendo os menores valores encontrados para o extensor contendo 2% de LS. Os valores médios de LIN e de STR foram significativamente inferiores ( $p<0,05$ ) para o meio controle e 2% de LS e similar para os extensores com 0,5 e 1% de LS. A variável ALH foi melhor para o meio com 0,5% de LS em relação aos demais extensores, indicando que este extensor promoveu um deslocamento espermático mais eficiente.

Face aos resultados obtidos após 48 horas de refrigeração, o extensor TRIS com 10% LDL e 0,5% de LS manteve-se superior aos demais tratamentos, indicando que esse extensor seria o eleito para uso em programas reprodutivos (IA e IATF) para bubalinos.

Após 72 horas de refrigeração verificou-se que o sêmen bubalino apresentou MT acima de 60%, havendo diferença estatística significativa entre os tratamentos ( $p<0,05$ ), sendo possível observar que os extensores com as concentrações 0,5 e 1% de LS apresentaram melhores resultados. Para a MP não houve diferença estatística entre os extensores com LS e o extensor controle ( $p>0,05$ ). Quanto aos parâmetros cinéticos, houve diferença estatística significativa ( $p<0,05$ ) para VSL, VAP, WOB e ALH para os extensores contendo LS, sendo os maiores valores observados para o extensor com 0,5% de LS. Já o BCF não apresentou diferença estatística entre os extensores ( $p>0,05$ ).

Becerra (2017) relatou ter obtido uma MT (48,1%) para o extensor TRIS com 10% LDL na refrigeração do sêmen de búfalos por 72 horas, valor este inferior ao encontrado neste trabalho para o mesmo extensor e para os extensores com diferentes concentrações de LS, conforme Tabela 33.

El-Sherbieny (2014), trabalhando com LS nas concentrações de 0,5, 1 e 2% para o sêmen de búfalos criopreservados, verificou que os extensores com LS apresentaram motilidade superior no pós-descongelamento em comparação ao extensor controle com gema de ovo. Sendo encontrado para os extensores controle (15% gema de ovo), 0,5% LS, 1% LS e 2% LS os valores de (47,0, 60,5, 50,5 e 45,0%, respectivamente). Neste mesmo estudo, foi reportado que a taxa de concepção foi maior para as búfalas inseminadas com extensor contendo 0,5% de LS (66,7%), controle com 15% de gema de ovo e 1% de LS (53,3%) e 2% de LS (46,7%). O autor observou ainda que a LS na concentração de 0,5%, foi a que apresentou uma menor contagem bacteriana (cfu/mL) no sêmen diluído, pós-equilíbrio e pós-descongelado.

Em pesquisa com esta espécie, Singh *et al.* (2012) reportaram que, ao refrigerar o sêmen de búfalos por 72 horas, encontraram para os extensores TRIS gema de ovo e diferentes concentrações de LS (10%, 15%, 20%, 25% e 30%) as motilidades de 31,7; 13,3; 15,0; 20,0; 30,0 e 21,7%, respectivamente. Novamente é possível observar que com uma concentração de LS mais baixa é possível manter uma MT e MP alta, conforme Tabela 38. No presente estudo, o valor de MP encontrado para a LS 0,5% foi superior a motilidade encontrada para a menor concentração de LS obtida para o mesmo tempo pelo grupo de Singh *et al.* (2012).

A soja contém grande proporção de LDL chamada de LS semelhante à lecitina de gema de ovo indicando seu potencial de proteção de membrana. Isso foi evidente após o armazenamento de sêmen de búfalos a 5°C por 72 horas, o que demonstrou que a substituição da gema de ovo com extensor baseado em LS não mostrou qualquer declínio significativo nos parâmetros seminais avaliados, corroborando com Singh *et al.* (2012). Estes autores reportaram ainda que, o produto fino da LS é autoclavável, portanto, possui baixo risco de contaminação.

Após 72 horas de refrigeração, o meio com LS à 2%, começou a apresentar dificuldade de leitura no sistema CASA. Isto se deve possivelmente à presença de maior concentração de LS no extensor, sendo responsável pela baixa visibilidade dos espermatozoides, pois mais glóbulos lipídicos foram observados neste extensor, corroborando com Forouzanfar *et al.* (2010). Foi possível observar que houve uma redução da velocidade dos espermatozoides para o extensor com 2% de LS, provavelmente devido ao aumento da densidade e à alta viscosidade, corroborando com Hirai *et al.* (1997). No entanto, ao comparar extensores com e sem LS Zhang *et al.* (2009), reportaram que houve melhora dos parâmetros do sêmen em meios contendo a LS, principalmente devido a menor quantidade de detritos. Também Moussa *et al.* (2002) relataram que os componentes da gema de ovo, como as moléculas de LS, fosfolípidos e lipoproteínas, podem formar glóbulos de gordura que interferem na observação microscópica e prejudicam o movimento do espermatozoide. Essas observações também são suportadas por Thun *et al.* (2002) e Gil *et al.* (2003), onde o sêmen de touro que foi diluído e preservado em extensores comerciais baseados em LS evidenciaram melhora do movimento do espermatozoide e visibilidade para o exame microscópico.

Segundo Graham e Foote (1987) e Trimeche *et al.* (1997) os fosfolípidos da LS podem substituir os fosfolípidos da membrana do espermatozoide e com isso a estrutura e função dos espermatozoides são mantidas. Além disso, o fosfolípido da soja com os fosfolípidos da membrana do espermatozoide formariam uma película protetora contra os elementos prejudiciais da refrigeração (Zhang *et al.*, 2009).

Outra possível explicação para os melhores resultados encontrados no extensor contendo 0,5% de LS para a manutenção da qualidade do sêmen avaliado no CASA, é devido ao aquecimento da LS à 60°C durante o processo de produção do extensor, o que além de facilitar a dissolução da LS, proporciona um melhor clareamento destes extensores melhorando a visualização no sistema CASA. Adicionalmente essa temperatura inativa diversas enzimas como a lipoxigenase e tripsina inibidoras (Nelson *et al.*, 1976), preservando e mantendo as características espermáticas. Ainda segundo os autores, o processo de aquecimento e clareamento também induz a estabilidade coloidal da LS, produzindo uniformidade na proteína e na molécula. Isso causa maior visualização e velocidade do espermatozoide observada nos extensores contendo LS, quando em comparação com o extensor contendo somente gema de ovo.

As normas internacionais postulam que um mínimo de 50% dos espermatozoides devem ser móveis após o descongelamento (Zhang *et al.*, 1999). Já no manual do CBRA (2013) há recomendação para que se utilize o sêmen de búfalo pós-descongelamento, que tenha um mínimo de 30% de motilidade. Conforme pode ser observado no Tabela 38 o sêmen refrigerado por até 72 horas atende estas premissas, podendo ser utilizado, uma vez que possui MT >50% e MP >30%. Entretanto, face a facilidade de coleta do touro (condicionado a vagina artificial), quando presente na fazenda onde os trabalhos de inseminação serão realizados, permitindo fazer uso do sêmen fresco pós-diluição e mesmo refrigerado por 24 a 48 horas, não se justifica utilizar um sêmen com período de refrigeração superior.

Para o sêmen refrigerado por 96 horas, observou-se que não houve diferença estatística para a MT entre os tratamentos ( $p > 0,05$ ), o que não aconteceu para a MP ( $p < 0,05$ ), sendo que os extensores com 0,5 e 1% apresentaram melhores motilidades. No entanto, a queda acentuada na MP, somada a dificuldade de leitura no CASA (aglutinação e maior viscosidade dificultando a visualização dos espermatozoides), não permitem que se recomende o uso do sêmen refrigerado a partir de 72 horas para IA e IATF, pois chances de sucesso para a taxa de prenhez, provavelmente será menor.

Valores inferiores (<30%) para a MT foram encontrados por Becerra (2017), quando avaliou o sêmen refrigerado de búfalos à 5°C por 96 horas utilizando o extensor TRIS com 10% LDL.

A cinética espermática para os parâmetros VCL, VAP, VSL, LIN e WOB foram menores para o extensor com 2% LS ( $p < 0,05$ ), sendo similar entre os extensores com LS para o STR e ALH ( $p > 0,05$ ). Já o BCF não apresentou diferença significativa entre os tratamentos ( $p > 0,05$ ).

Já para o tempo de 120 horas de refrigeração houve diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) para a MT entre os extensores controle e com diferentes concentrações de LS, sendo esta desfavorável para os meios contendo 0,5 e 2% de LS, o que não ocorreu para a MP ( $p > 0,05$ ). Para os demais parâmetros cinéticos, observou-se diferenças estatísticas significativas ( $p < 0,05$ ) para o VCL, VAP e VSL, sendo estas diferenças desfavoráveis ao extensor com 2% LS. Os parâmetros LIN, STR, WOB e ALH não apresentaram diferença estatística significativa entre os extensores contendo LS ( $p > 0,05$ ). No entanto o BCF teve o menor valor para o extensor com 1% LS ( $p < 0,05$ ).

Os percentuais de espermatozoides reativos no HOST para o sêmen foram elevados para todos os tratamentos avaliados, evidenciando que os diluidores foram eficientes em proteger a integridade da membrana espermática Tabela 39.

Tabela 39 - Efeitos do extensor TRIS com 10% LDL com diferentes concentrações de lecitina de soja (LS), utilizados para o sêmen de 11 búfalos (1 ejaculado/doador), pós-diluição (T0 horas - temperatura ambiente), e refrigerado à 5°C (T0, T24, T48 e T72 horas) para a integridade de membrana espermática (HOST).

Parâmetro	Tempo (horas)	Extensores			
		TRIS 10% LDL	TRIS 10% LDL + 0,5% LS	TRIS 10% LDL + 1% LS	TRIS 10% LDL + 2% LS
HOST (%)	0	80,3 <sup>ab</sup>	81,5 <sup>a</sup>	76,9 <sup>ab</sup>	74,4 <sup>b</sup>
	24	73,7 <sup>ab</sup>	74,9 <sup>a</sup>	68,1 <sup>bc</sup>	60,7 <sup>c</sup>
	48	66,6 <sup>a</sup>	67,9 <sup>a</sup>	59,4 <sup>ab</sup>	52,1 <sup>b</sup>
	72	59,4 <sup>ab</sup>	60,9 <sup>a</sup>	50,7 <sup>ab</sup>	43,5 <sup>b</sup>

Letras diferentes em cada característica espermática (linha), diferem estatisticamente entre si ( $p < 0,05$ ). HOST: Teste Hiposmótico.

A capacidade de preservação da funcionalidade da membrana plasmática dos espermatozoides pós-diluição, medida pelo HOST, apresentou diferença estatística significativa entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ), sendo o menor valor encontrado para o extensor com 2% de LS ( $p < 0,05$ ), conforme Tabela 39. Estes resultados com elevados valores para o HOST demonstram que todos os extensores contendo LDL, estando ou não associados à LS em diferentes concentrações, foram capazes de proteger os espermatozoides na pós-diluição.

Em trabalho similar Becerra (2017) verificaram 91,0% de espermatozoides reativos no teste HOST para o sêmen em temperatura ambiente quando avaliaram o TRIS 10% de LDL, valor este maior que o obtido no presente estudo (80,3%) para o mesmo extensor.

Anteriormente Chaudhari *et al.* (2015), em estudo comparando os extensores baseados em LS comercialmente disponíveis (Bioxcell<sup>®</sup> e Optixcell<sup>®</sup>), com diluente padrão de TRIS, encontraram um percentual de espermatozoides reagentes ao HOST de 79,35% para o sêmen em temperatura ambiente.

Brito (2014), trabalhando com reprodutores bubalinos da raça Murrah, encontrou uma similar taxa média (77,0%) de espermatozoides reativos no teste HOST para o sêmen recém diluído.

No presente estudo, em relação ao HOST, verificou-se uma diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ), entre os extensores para o tempo de 24 horas de refrigeração a 5°C, sendo obtidos os menores valores do HOST, para os extensores contendo as maiores concentrações de LS 1 e 2%.

Ao comparar os extensores baseados em LS (Bioxcell® e Optixcell®) com diluente padrão de Tris, Chaudhari *et al.* (2015) observaram diferenças estatísticas significativas para o HOST ( $p < 0,05$ ), entre os extensores após o período de equilíbrio, sendo esta favorável ao extensor Optixcell® contendo LS.

Singh *et al.* (2012) não observaram diferença estatística significativa ( $P > 0,05$ ), ao comparar a qualidade do sêmen refrigerado de búfalos (5°C) entre extensores contendo gema de ovo (controle) e diferentes concentrações de LS (10, 15, 20, 25 e 30%), para o tempo de 24 horas de refrigeração para o HOST. No entanto, os valores encontrados (48,6; 33,6; 31,6; 37,3; 48,3 e 40,0%) pelos autores para os extensores contendo gema de ovo (controle) e diferentes concentrações de LS (10, 15, 20, 25 e 30%) foram bem inferiores aos obtidos neste estudo, conforme Tabela 39.

A avaliação pelo HOST encontrada para o tempo de 48 horas de refrigeração, evidenciou que o extensor com 2% LS promoveu a menor proteção a integridade de membrana espermática entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ), sendo os demais tratamentos similares entre si, demonstrando que foram eficazes na proteção dos espermatozoides.

Becerra (2017), trabalhando com sêmen refrigerado de búfalos, que utilizando o TRIS com 10% LDL, encontrou às 48 horas de refrigeração, 74,7% de integridade de membrana espermática.

Para o teste de integridade de membrana espermática (HOST) foi verificado uma diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) entre os extensores com 0,5 e 2% de LS, sendo os valores obtidos favoráveis ao extensor com 0,5% de LS. Mesmo assim, observa-se que a concentração de 2% LS também foi eficiente em proteger a integridade da membrana plasmática, mantendo-se acima de 43% de espermatozoides reagentes.

Em trabalho com sêmen de búfalos, Becerra (2017), reportou ter obtido 67,1% de espermatozoides reagentes ao HOST, às 72 horas de refrigeração à 5°C. Já Singh *et al.* (2012), relataram que, após 72 horas de refrigeração o percentual de espermatozoides reagentes ao HOST reduziu bastante, sendo que para este tempo o meio controle (TRIS) foi o que teve maior capacidade de proteção 25,3% comparado aos extensores contendo 10, 15, 20, 25 e 30% de LS, observando-se um percentual de espermatozoides reagentes de 7,7; 7,7; 13,3; 21,3 e 14,3%, respectivamente ( $p < 0,05$ ). Os resultados do presente estudo demonstram que uma concentração menor de LS em extensor TRIS com 10% de LDL foi mais eficiente para a proteção da integridade da membrana espermática comparada as maiores concentrações de LS (Tabela 39).

A acentuada queda das motilidades espermáticas após 72 horas de refrigeração, e a dificuldade para visualizar os espermatozoides no extensor contendo 2% LS, devido ao aumento da viscosidade e aglutinação pela presença de partículas de gordura, não foi realizado o HOST para os demais tempos de avaliação, pois o percentual de espermatozoides reagentes encontrados não seria confiável, corroborando com Van Wagendonk-De Leeuw *et al.* (2000) e Singh *et al.* (2012).

Tarig *et al.* (2017) reportaram que, ao avaliar diferentes concentrações de LS associado ao óleo de coco virgem em extensor TRIS para o sêmen de touros bovinos refrigerado e congelado, foi observado melhores resultados após 24, 72 e 144 horas para o extensor com 1,5% de LS comparado ao extensor com 20% de gema de ovo.

Verstegen *et al.* (2002) relataram que para uso prático, os parâmetros de movimentação espermática avaliados por meio da análise computadorizada (CASA), estão relacionados com a taxa de fecundação, onde valores de VCL, VAP e VSL são significativamente maiores em amostras que produzem mais de 50% de óocitos fecundados *in vitro*. Já Hoflack *et al.* (2007) reportaram que valores elevados para BCF e STR, resultam em movimentos espermáticos

progressivos mais rápidos, devido a maior força propulsora do gameta masculino. Verstegen *et al.* (2002) encontraram para os parâmetros BCF e LIN correlação positiva com a taxa de prenhez, podendo fornecer informações úteis para o uso do sêmen nas fêmeas.

A refrigeração causa redução da taxa metabólica de espermatozoides, ampliando assim a viabilidade celular (Vishwanath e Shannon, 2000). Segundo os autores a vantagem mais óbvia do sêmen armazenado refrigerado sobre o sêmen criopreservado é o número de espermatozoides. Enquanto para a criopreservação são utilizados 15-20 milhões de espermatozoides por palheta, a preservação refrigerada necessita apenas de um milhão de espermatozoides por dose inseminante. Quando o sêmen de búfalo é utilizado depois da diluição à fresco ou refrigerado até 24 horas de refrigeração as vantagens econômicas são bastante significativas, principalmente devido ao aumento na taxa de prenhez (Almeida *et al.*, 2015 e 2016a).

A LS perde sua propriedade de emulsificação e de permuta quando o extensor é submetido ao congelamento (Almeida *et al.*, 2017 - comunicação pessoal). Isto se deve porque a LS é insolúvel em soluções de água e cria emulsões. Segundo De Paz *et al.* (2010) esta propriedade da LS é um obstáculo comprovado no uso de tais extensores após dias de armazenamento a 5°C, o que é essencial no campo quando o sêmen refrigerado é usado na inseminação artificial. Uma solução para este problema é o aquecimento do meio contendo LS à 60°C durante o processo de preparo do extensor, mantendo este sob homogeneização constante (mixer ou vórtex) por algumas horas e em caso de congelamento do extensor, este deve ser novamente homogeneizado no pós-descongelamento, mas conforme observações feitas neste estudo o ideal é preparar o extensor com a LS e utilizá-lo sem congelar.

De Paz *et al.* (2010) reportaram ainda, que em condições da temperatura, procedimentos de preparação e tempo de armazenamento podem afetar a formação de emulsões e disponibilidade de fosfolípidos no extensor. Além disso, os autores observaram diminuição de fosfolípidos, sempre que os extensores eram armazenados em temperaturas entre 15°C e 5°C após alguns horas. Isto é esclarecido pelo aumento da viscosidade do extensor que se pensava ser induzido pela baixa temperatura (Badens *et al.*, 2001).

Papa *et al.* (2010) e Crespilho *et al.* (2012) relataram que a eficiência protetora da LS durante o processo de congelamento do sêmen bovino é limitado, o que resultou em redução da sobrevivência e fertilidade do espermatozoide no pós-descongelamento do sêmen, quando comparado com extensores baseados em gema de ovo. Em nosso estudo com sêmen refrigerado de búfalos, isso não se comprovou.

Os resultados indicaram que o sêmen refrigerado diluído com TRIS 10% LDL + 0,5% LS preservou as características espermáticas do sêmen refrigerado após 48 horas, mantendo uma motilidade significativamente alta ( $P < 0,05$ ), podendo ser uma opção técnica viável no intuito de aumentar a capacidade de fertilização do sêmen de búfalo a ser utilizado em programas de IA e IATF.

#### 4. CONCLUSÕES

A concentração ideal de LS para o extensor TRIS contendo 10% de LDL é a de 0,5% para o sêmen de búfalo, refrigerado e armazenado por até 72 horas à 5°C.

O uso do sêmen refrigerado a 5°C, mantido por até 24 horas é recomendado em programas de IA e IATF.

O intervalo de até 48 horas para a utilização do sêmen refrigerado permitirá que sejam realizadas entre 2 a 3 coletas de sêmen por semana, possibilitando inseminar um grande número

de búfalas sincronizadas por IATF, com sêmen de melhores características físicas e morfológicas.

## AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT da Pecuária) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por cederem parte dos recursos para compra de material do experimento e pela concessão da bolsa, fator indispensável para o andamento e finalização do curso.

## REFERÊNCIAS

AKHTER, S.; ANSARI, M.; ANDRABI, S. et al. Soya-lecithin in extender improves the freezability and fertility of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Reprod. Domest. Anim.* v.47, n.58, p.15-819, 2012.

AKHTER, S.; ANSARI, M.S.; RAKHA, B.A. et al. Effect of low density lipoproteins in extender on freezability and fertility of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull semen. *Theriogenology.* v.76, p.759-764, 2011a.

AKHTER, S.; ANSARI, M.S.; RAKHA, B.A. et al. *In vitro* evaluation of liquid-stored buffalo semen at 5°C diluted in soya-lecithin based extender (Bioxcell®), Tris-citric egg yolk, skim milk and egg yolk-citrate extenders. *Reprod. Domest. Anim.* v.46, 45-49, 2011b.

ALMEIDA, J.; BRITO, M.F.; NEVES, B.P. et al. Evaluation of the pregnancy rates in primiparous buffaloes submitted to FTAI with refrigerated semen vs. frozen during the unfavorable breeding station. *Proceedings...* In: 31<sup>st</sup> ANNUAL MEETING OF THE BRAZILIAN EMBRYO TECHNOLOGY SOCIETY (SBTE); Cabo de Santo Agostinho, PE, Brazil, August 17<sup>th</sup> to 19<sup>th</sup>, 2017. Abstracts. 666, *Anim. Reprod.* Jul./Sept. v.14, n.3,6 p.666, 2017.

ALMEIDA, J.; NEVES, B.P.; BRITO, M.F. et al. Pregnancy rates of buffaloes (*Bubalus bubalis*) using cooled or frozen semen at fixed time artificial insemination (FTAI) - Preliminary results. XI Congresso Mundial de Búfalos - Cartagena - Colômbia, *Med. Vet. y Zootec.* Septiembre/Diciembr, 2016a.

ALMEIDA, J.; BECERRA, V.A.B.; NEVES, B.P. et al. Refrigeração de sêmen bubalino (*Bubalus bubalis*) frente a diferentes extensores e avaliação da motilidade espermática no CASA. *Proceedings...* In: 30<sup>th</sup> ANNUAL OF THE BRAZILIAN EMBRYO TECHNOLOGY SOCIETY (SBTE), Foz do Iguaçu, PR, Brazil. August 25<sup>th</sup> to 27<sup>th</sup>, 2016, and 32<sup>th</sup> Meeting of the European Embryo Transfer Association (AETE), Barcelona, Spain, Septiembre 9<sup>th</sup> and 10<sup>th</sup>, 2016. Abstracts. *Anim. Reprod.*, Jul./Sept. 13(3)557, 2016b.

ALMEIDA, J.; BRITO, M.F.; AULER, P.A. et al. Avaliação das taxas de prenhez em búfalas com o uso de sêmen refrigerado vs. congelado em programas de IATF durante a estação reprodutiva desfavorável. Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, Belo Horizonte, MG. Anais...Belo Horizonte: CBRA. v.21, p.99, 2015.

ANSARI, M.S.; RAKHA, B.A.; ULLAH, N. Glutathione addition in Tris-citric egg yolk extender improves the quality of cooled buffalo (*Bubalus bubalis*) bull semen. *Pak. J. Zool.* v.43, p.49-55, 2013.

- ARRUDA, R.P.; BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G. et al. Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para espermatozoides de garanhões utilizando análises computadorizadas da motilidade (CASA) e citometria de fluxo. *Acta Sci. Vet.*, (Suplemento), Porto Alegre: UFRGS, v.312p.28-229, 2003.
- BADENS, E.; MAGNAN, C.; CHARBIT, G. Microparticles of soy lecithin formed by supercritical processes. *Biotechnol. Bioengineering*. v.72, n.2, p.194-204, 2001.
- BAILEY, J.L.; BILODEAU, J.F.; CORMIER, N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *J. Androl.* v.21, p.1-7, 2000.
- BARUSELLI, P.S.; REIS, E.L.; CARVALHO, N.A.T. et al. eCG increase ovulation rate and plasmatic progesterone concentration in Nelore (*Bos indicus*) heifers treated with progesterone releasing device. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION-ICAR. Porto Seguro. *Proceedings...*, 2004.
- BUCHER, A.; KASIMANICKAM, R.; HALL, J.B.; DEJARNETTE, J.M. et al. Fixed-time AI pregnancy rate following insemination with frozen-thawed or fresh-extended semen in progesterone supplemented CO-Synch protocol in beef cows. *Theriogenology*. v.71, p.1180-1185, 2009.
- BRITO, M.F. Uso de lipoproteínas de baixa densidade, extraídas da gema de ovo, para a criopreservação do sêmen de búfalos. 2014. 96f. Dissertação (Mestrado, Área de Concentração: Reprodução Animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- CBRA. Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal. 3ª ed. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, Belo Horizonte. 104p, 2013.
- CELEGHINI, E.C.C. Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre a membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes. 2005. 186f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C. et al. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin, *Anim. Reprod. Sci.*, v.104, n.2-4, p.119-131, 2008.
- CHAUDHARI, D.V.; DHAMI, A.J.; HADIYA, K.K. et al. Relative efficacy of egg yolk and soya milk-based extenders for cryopreservation (-196°C) of buffalo semen. *Vet. World*. n.8, February, 2015.
- CRISPILHO, A.M.; SÁ-FILHO, M.S.; DELL'AQUA JR, J.A. et al. Comparison of *in vitro* and *in vivo* fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or new lecithin based extenders. *Livest. Sci.* n.149, p.1-6, 2012.
- DE PAZ, P.; ESTESO, M.C.; ALVAREZ, M. et al. Development of extender based on soybean lecithin for its application in liquid ram semen. *Theriogenology*, v.74, n.4, p.663-671, 2010.
- EL-SHERBIENY, M.A. Impact of replacing egg yolk with lecithin on sperm characteristics, bacterial count and fertilizing ability of cryopreserved buffalo semen. *J. Anim. Poultry Prod.*, Mansoura University, v.5, n.6, p.353-364, 2014.
- FARRELL, P.B.; PRESICCE, G.A.; BROCKETT, C.C. et al. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. *Theriogenology*, v.49, p.871-879, 1998.

FOROUZANFAR, M.; SHARAFI, M.; HOSSEINI, S.M. et al. *In vitro* comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology*, v.73, n.4, p.480-487, 2010.

GIL, J.; LUNDEHEIM, N.; SODERQUIST, L. et al. Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. *Theriogenology*, v.59, p.1241-1255, 2003.

GRAHAM, J.K., FOOTE, R.H. Effect of several lipids, fatty acyl chain length, and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. *Cryobiology*, v.24, n.1, 42-52, 1987.

HIRAI, M.; CERBITO, W.A.; WIJAYAGUNAWARDANE, M.P.B. et al. The effect of viscosity of semen diluents on motility of bull spermatozoa. *Theriogenology*, v.47, p.1463-1478, 1997.

HOFACK, G.; OPSOMER, G.; RIJSSELAERE, T. et al. Comparison of computer assisted sperm motility analysis parameters of Belgian Blue and Holstein Friesian bulls. *Reprod. Dom. Anim.* v.42, p.153-161, 2007.

MELO, M.I.V.; HENRY, M.; BEKER, A.R.C.L. Teste hiposmótico para avaliação da viabilidade do sêmen equino resfriado com diferentes diluidores. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.57, n.6, p.757-763, 2005.

MOUSSA, M.; MARTINET, V.; TRIMECHE, A. et al. Low density lipoproteins: extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *THERIOGENOLOGY*, v.57, p.1695-1706, 2002.

NELSON, A.I.; STEINBERG, M.P.; WEI, L.S. Illinois process for preparation of soymilk. *J. Food Sci.* Chicago, v.41, n.1, p.57-61, 1976.

NEVES, M.M. Extração das lipoproteínas de baixa densidade da gema do ovo de *Gallus domesticus* e sua aplicação na criopreservação do sêmen canino. 2008. 116f. Tese (Doutorado) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte.

PAPA, F.O.; FELÍCIO, G.B.; MELO, C.M. et al. Effect of substituting soybean lecithin for egg yolk in an extender used for the cryopreservation of stallion semen. *Anim. Reprod. Sci.* v.121, p.71-72, 2010.

RASTEGARNIA, A.; SHAHVERDI, A.; REZAEI TOPRAGGALEAH, T. et al. *In vitro* comparison of soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of buffalo (*Bubalus bubalis*) sêmen. *Comp. Clin. Path.* v.23, p.893-900, 2014.

RASUL, Z.; AHMAD, N.; ANZAR, M. Changes in motion characteristics, plasma membrane integrity, and acrosome, morphology during cryopreservation of buffalo spermatozoa. *J. Androl.* v.22, n.2, p.278-283, 2001.

SINGH, A.K.; SINGH, V.K.; NARWADE, B.M. et al. Comparative quality assessment of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen chilled (5°C) in egg yolk- and soya milk-based extenders. *Reprod. Dom. Anim.*, v.47, p.596-600, 2012.

STATA CORP. Stata: Release 12. Statistical Software. College Station, TX: StataCorp LP, 2012.



- TARDIF, A.L.; FARREL, P.B.; TROUERN-TREND, V. et al. Computer-assisted sperm analysis for assessing initial semen quality and changes during storage at 5°C. *J. Dairy Sci.* v.80, n.8, p.1606-1612, 1997.
- TARIG, A.A.; WAHID, H.; ROSNINA, Y. et al. Effect of different concentrations of soybean lecithin and virgin coconut oil in Tris-based extender on the quality of chilled and frozen-thawed bull semen. *Vet. World.* n.10, june, 2017.
- THUN, R.; HURTADO, M.; JANETT, F. Comparison of biociphos-plus and tris egg yolk extender for cryopreservation of bull semen. *Theriogenology*, v.57, p.1087-1094, 2002.
- TRIMECHE, A.; ANTON, M.; RENARD, P. et al. Quail egg yolk: A novel cryoprotectant for the freeze preservation of Poitou Jackass sperm. *Cryobiology*. v.34, p.385-393, 1997.
- VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, A.M.; HARING, R.M.; KAALLANSBERGEN, L.M.T.E. et al. Fertility results using bovine semen cryopreserved with extenders based on egg yolk and soy bean extract. *Theriogenology*, New York, v.54, p.57-67, 2000.
- VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; OCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, v.57, n.1, p.149-179, 2002.
- VISHWANATH, R. Artificial insemination: the state of the art. *Theriogenology*, v.59, p.571-584., 2003.
- VISHWANATH, R., SHANNON, P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 62, p.23-53, 2000.
- YOSHIDA, M. Conservation of sperms: current status and new trends. *Anim. Reprod. Sci.*, v.60-61, p.349-355, 2000.
- ZHANG, S.S.; HU, J.H.; LI, Q.W. et al. The cryoprotective effects of soybean lecithin on boar spermatozoa quality. *Afr. J. Biotechnol.* v.8, n.22, p.6476-6480, 2009.
- ZHANG, B.R.; LARSSON, B.; LUNDEHEIM, N. et al. Prediction of bull fertility by combined in vitro assessments of frozen-thawed semen from young dairy bulls entering an AI-Programme. *Int. J. Androl.*, v.22, p.253-260, 1999.

## Capítulo 7 - MEIO DILUIDOR A BASE DE LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE A 10%, LECITINA DE SOJA A 0,5% E ACETILCISTEÍNA A 10 mM COMO UMA OPÇÃO PARA FERTILIZAÇÃO DE BÚFALAS

Jaci Almeida<sup>1</sup>, Beatriz P. Neves<sup>1</sup>, Mayara F. Brito<sup>1</sup>, Robson F. Freitas<sup>2</sup>, Lílian G. Lacerda<sup>2</sup>, Lira S. Grapiuna<sup>2</sup>, João P. Hadad<sup>3</sup>, Marc Henry<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Campus Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 31270-901.

<sup>2</sup> Laboratório BH Embriões, Rua Oliveira Pena, 87, São José - Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 31275-130.

<sup>3</sup> Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Campus Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 31270-901.

<sup>4</sup> Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Campus Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 31270-901.

Corresponding author. Tel.: +55 31 97174-3066

E-mail addresses: [jacialmeida01@yahoo.com.br](mailto:jacialmeida01@yahoo.com.br) (J. Almeida).

### RESUMO

Objetivou-se avaliar a fertilidade do sêmen bubalino na PIVE comparando a eficácia do sêmen refrigerado e congelado. Os ejaculados de três touros foram divididos em duas partes iguais, submetidas a refrigeração a 5°C/24 horas e ao congelamento. Foi utilizado o extensor TRIS 10% LDL + 0,5% lecitina de soja + 10 mM de Acetilcisteína em ambos os tipos de sêmen. O sêmen teve sua motilidade e cinética espermática avaliada pelo CASA e, a integridade de membrana espermática pelo teste hiposmótico, sendo as avaliações realizadas nos tempos 0 hs (pós-diluição à 37°C), 4 hs (equilíbrio até 5°C), 4 à 24 hs (refrigeração à 5°C) e congelamento (-196°C). Posteriormente utilizou-se os dois tipos de sêmen na fecundação *in vitro* para oócitos provenientes de OPU, sendo observadas taxas de clivagem e desenvolvimento embrionário. Os resultados obtidos evidenciaram, que o número de embriões produzidos, foram superiores para o sêmen refrigerado. Concluiu-se que o extensor TRIS 10% LDL + 0,5% lecitina de soja + 10 mM de Acetilcisteína foi eficiente em manter a motilidade e integridade de membrana espermática para os diferentes tipos de sêmen e, que o sêmen refrigerado é uma alternativa a ser utilizada para melhorar as taxas de fertilização na PIVE de búfalas.

**Palavras-chave:** Doadoras de oócito, OPU, fecundação *in vitro*.

### 1. INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma biotecnologia que permite maximizar a eficiência do uso de material genético superior em curto espaço de tempo nos animais domésticos (Wilmot *et al.*, 2000). Em búfalos, apesar das várias dificuldades, principalmente em função das taxas de embriões produzidos por doadora, ainda serem baixas refletindo diretamente no custo da prenhez, que é cerca de 3 a 4 vezes mais alto que em zebuínos (Ohashi *et al.*, 2017), esta tecnologia tem sido usada comercialmente (In *vitro*, 2016).

Desde a primeira gestação em búfalas com embrião produzido *in vitro* (Madan *et al.*, 1992), chegando ao primeiro nascimento quatorze anos depois (Ohashi *et al.*, 2006), grandes avanços foram alcançados com as biotécnicas reprodutivas na espécie bubalina até o atual momento, passando pela injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), transgenia, clonagem e finalmente a aspiração folicular ovariana guiada por ultrassom (OPU-Ovum pick-up) em fêmeas bubalinas de 2 meses de idade (Bernardes, 2017).

Somente entre os anos de 1991 e 2008, foram publicados mais de 100 trabalhos, apresentando altas taxas de maturação (80%), moderadas taxas de clivagem (50%) e taxas moderadas de formação de blastocistos (20%) na espécie bubalina (Suresh *et al.*, 2009). No entanto, apesar de haverem diversos grupos de pesquisa tentando encontrar soluções para melhorar os índices obtidos com a PIVE mencionados para a espécie bubalina, nenhum trabalho foi encontrado sobre a utilização do sêmen refrigerado para a PIVE. Isto talvez se deva ao fato de o sêmen precisar ser capacitado para ser utilizado nesta biotecnia. O sêmen congelado/descongelado é considerado pré-capacitado no seu processo de descongelamento pois já sofre essa capacitação o que é interessante para a sua utilização na PIVE, porém, não foram encontradas informações favoráveis ou contrárias a utilização do sêmen refrigerado na PIVE em nenhuma espécie de produção animal.

Não há dúvida de que a técnica de OPU-PIVE na espécie bubalina é de grande importância na multiplicação de material genético da fêmea, isto porque é possível recuperar oócitos de animais vivos de diferentes *status* reprodutivos (pré-púberes, acíclicas, cíclicas e gestantes). No entanto, algumas particularidades anatômico-fisiológicas da espécie bubalina afetam diretamente a eficiência dos programas de OPU-PIVE. Os ovários apresentam tamanho e peso menor que fêmeas bovinas (Vitoria *et al.*, 1997); população folicular bastante reduzida (Danell, 1987) se comparada as vacas bovinas (Erikson, 1966); qualidade dos oócitos recuperados, que em búfalas apresentam alto grau de atresia na população folicular (Le Van Ty *et al.*, 1989); além disso os oócitos obtidos por OPU apresentam reduzido número de camadas de células do *cumulus* e baixo grau de compactação, sendo que somente 38,4% do total de oócitos são considerados aptos ao cultivo (Ohashi *et al.*, 2003).

Portanto, fica evidente que o sucesso da OPU-PIVE em búfalas depende de estratégias que propiciem um incremento nas taxas de embriões produzidos. Neste contexto, este estudo teve o objetivo de verificar se há incremento na taxa de fertilidade na PIVE com o uso de sêmen refrigerado utilizando o meio diluidor TRIS com 10% Lipoproteína de baixa densidade (LDL), 0,5% de Lecitina de soja (LS) e com 10 mM do antioxidante Acetilcisteína (NAC) comparativamente ao sêmen congelado em bubalinos.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Ética

O presente estudo foi realizado após aprovação de todos os procedimentos pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (EV/UFMG), segundo o protocolo nº 368/2015.

### 2.2. Local do experimento

O experimento foi conduzido no Centro de Biotecnologia em Bubalinocultura, sediado em Pedro Leopoldo, Minas Gerais, com altitude média de 710 metros, latitude 19°37'05" Sul e longitude 44°02'35" Oeste.

### 2.3. Animais utilizados

Foram utilizados 3 touros Mestiços de Murrah x Mediterrâneo (*Bubalus bubalis*), como doadores de sêmen, com média de 5 anos de idade; ECC = 4 (1-5) e peso médio = 920 kg. Os reprodutores apresentavam históricos de fertilidade conhecida, eram mantidos separados das fêmeas, sendo selecionados a partir de exames andrológicos e coleta de ejaculados que atendessem as características físicas e morfológicas segundo recomendação do Manual de Andrologia (CBRA, 2013).

Utilizou-se 25 búfalas mestiças (Murrah x Mediterrâneo), com idade variando de 3 a 11 anos de idade; ECC = 3-4 (1-5) e peso médio = 625 kg como doadoras de oócitos. Desses animais, 2/3(16) apresentavam-se em período de lactação e o restante secas e, sem nenhuma alteração no exame ginecológico realizado previamente ao experimento. As búfalas foram mantidas em piquetes com alimentação à pasto e água *ad libitum* durante todo o estudo. As sessões de aspiração ocorreram nos meses de setembro a novembro de 2017, havendo um intervalo de 30 dias entre elas.

#### 2.4. Coleta do sêmen

As coletas foram realizadas com vagina artificial, com temperatura interna entre 42-45°C (Sansone *et al.*, 2000; Ohashi *et al.*, 2011 e Vale, 2011). Acoplados a vagina foram utilizados copos coletores (tubos plásticos 15 mL), graduados e estéreis, previamente aquecidos e protegidos com uma camisa isotérmica para evitar contato com os raios ultravioleta (UV) e as mudanças bruscas de temperatura que pudessem afetar o sêmen. Antes da coleta foi induzida uma falsa monta na primeira tentativa de salto (sem coleta de sêmen, com intuito de aumentar a concentração espermática do ejaculado), sendo o ejaculado da segunda monta coletado e imediatamente direcionado para o laboratório, colocado em banho-maria a 37°C, para as análises subjetivas de motilidade e vigor espermático, usando microscopia de luz.

#### 2.5. Produção do extensor

Para a obtenção das lipoproteínas de baixa densidade (LDLs) constituintes do meio extensor utilizado, foi empregada a técnica descrita por Moussa *et al.* (2002), com algumas modificações sugeridas por Neves *et al.* (2008), utilizando ovos frescos produzidos em granja comercial. O extensor básico para os grupos de tratamento utilizados neste estudo foi composto por: TRIS (2,42g), ácido cítrico (1,36g), Frutose (1,0g), Amicacina (83,4µg/mL), Equex 0,4%, LDL (10 mL) e H<sub>2</sub>O Milli-Q<sup>®</sup> autoclavada (completar 100 mL), sendo todos os reagentes utilizados da Sigma-Aldrich<sup>®</sup>.

A Lecitina de soja (LS) em pó Solec FP-40<sup>®</sup> (Solae), foi utilizada na concentração de 0,5% (0,5 g/100 mL), sendo que o processo de homogeneização para a produção do extensor foi realizado separadamente. Primeiramente homogeneizou-se a LDL 10% por 24 horas em balcão-frigorífico a 5°C. Em outro recipiente similar foi dissolvida e homogeneizada a LS 0,5% também por 24 horas. E por fim juntou-se a solução TRIS com 10% de LDL, 0,5% de LS e o antioxidante (Acetilcisteína 10 mM, antioxidante escolhido entre vários testados em experimento realizado em paralelo a este) em um mesmo recipiente. Esta solução foi alíquotada em 2 partes sendo a primeira submetida a refrigeração e a segunda com adição de 7% de glicerol para o posterior congelamento de sêmen. Imediatamente pós preparo do extensor, este foi mantido refrigerado a 5°C/24 horas ou congelado até o momento da utilização.

#### 2.6. Concentração espermática

Utilizou-se a contagem de células espermáticas na câmara hematocitométrica de Neubauer numa diluição de 1:200 em solução formol-salina-tamponada (Hancock, 1957), sob microscopia óptica convencional em aumento de 400 vezes (CBRA, 2013).

#### 2.7. Morfologia espermática

Para a avaliação da morfologia espermática usou-se uma alíquota de 50 µL de sêmen adicionada a 1000 µL de uma solução formol-salina-tamponada (Hancock, 1957), sendo a análise realizada em câmara úmida, com microscópio de contraste de fase em aumento de 1000 vezes. As patologias foram classificadas em defeitos maiores (DM) e totais (DT), segundo o preconizado pelo (CBRA, 2013).

## 2.8. Processamento do sêmen

Cada amostra de sêmen foi dividida em duas alíquotas: uma diluída em extensor TRIS com 10% LDL, 0,5% de LS e Acetilcisteína 10 mM para a refrigeração e outra diluída no mesmo extensor acrescido de 7% de glicerol, e usado para congelamento para atingir a concentração de  $50 \times 10^6$  spz/mL. Após o envase em palhetas de 0,5 mL (IMV® Technologies, L'Aigle Cedex, França), as amostras foram submetidas ao resfriamento acondicionando as palhetas em sacos plásticos submersos em recipiente com água (1,4 L) a 27°C. O frasco foi colocado em ambiente a 5°C (balcão frigorífico) obtendo-se uma curva de resfriamento de 0,25°C/minuto. As palhetas foram mantidas refrigeradas a 5°C até o momento da utilização (mais ou menos 24 horas), e as destinadas ao congelamento após 4 horas de equilíbrio a 5°C foram colocadas a 5 cm da superfície do nitrogênio (N<sub>2</sub>), por 20 minutos em uma caixa de poliestireno com as dimensões internas: 39,0 cm de comprimento x 19 cm de largura e 30,0 cm de altura e posteriormente submersas em N<sub>2</sub>. Todas as amostras de sêmen foram avaliadas antes da utilização para a PIVE; as normas mínimas de qualidade para inclusão na experiência foram: sêmen refrigerado (motilidade total > 50% e total de defeitos de espermatozoides ≤ 20%) e sêmen congelado (motilidade total > 30% e total de defeitos de espermatozoides ≤ 20%).

## 2.9. Avaliação espermática computadorizada (CASA)

A avaliação da motilidade espermática pelo CASA (Sperm Class Analyzer - SCA®) foi realizada imediatamente pós-diluição final 0 hs (37°C), pós equilíbrio 4 hs (5°C), refrigeração por 24 hs (5°C) e pós-congelamento (-196°C). Para a avaliação as amostras de sêmen foram previamente incubadas em “banho-seco” a 37°C/5 minutos. O Setup utilizado para análise do sêmen de búfalos foi: área da partícula (20 a 70 microns<sup>2</sup>), VCL (10 < Slow < 25; > 25 e Medium < 50), Progressividade (> 70% STR), Circular (< 50% LIN), Pontos para o VAP (5) e Conectividade (12). Gotas de 5 µL de cada amostra foram colocadas entre lâmina e lamínula, previamente mantidas a 37°C, sendo utilizados para a análise de cada amostra 5 campos capturados, homogêneos, com um mínimo de 200 células espermáticas em cada um deles.

Segundo metodologia proposta por Farrell *et al.* (1998) foram utilizados, para as ponderações sobre a eficácia do diluidor empregado quanto aos parâmetros cinéticos do CASA, aquele conjunto de parâmetros que, no estudo citado, apresentaram maior correlação com a fertilidade. Esses parâmetros foram: Motilidade total (MT), Motilidade progressiva (MP), Velocidade Curvilínea (VCL), Velocidade Média do Trajeto (VAP), Velocidade Linear Progressiva (VSL), Linearidade (LIN), Retilinearidade (STR), Índice de Oscilação (WOB), Amplitude do deslocamento Lateral de Cabeça (ALH) e Frequência de Batimentos de Cauda (BCF).

## 2.10. Avaliação da integridade de membrana plasmática

Para o teste hiposmótico (HOST), uma alíquota de 50 µL de sêmen foi adicionada a 500 µL de uma solução hiposmótica contendo frutose-citrato de sódio a 121 mOsm/L (2,702g de frutose + 1,324g de citrato de sódio). Esta solução foi incubada por 30 minutos em banho-seco a 37°C e fixada em 200 µL de formol salina tamponada, para posterior análise em microscópio de contraste de fase (x1000), sendo contadas 200 células de acordo com a presença ou não de cauda enrolada (Loaiza-Echeverri *et al.*, 2015).

## 2.11. Aspiração folicular guiada por ultrassom

Foram realizadas 3 sessões de OPU na qual foram aspirados entre 16 e 25 animais/sessão. As aspirações foram realizadas com intervalo médio de 30 dias, tempo suficiente para surgimento de nova onda de crescimento folicular. Para realização da OPU os animais foram contidos no brete e submetidos à anestesia epidural usando 2 mL de lidocaína 2%

(Lidovet<sup>®</sup>, Bravet). Na sequência, removeu-se manualmente todo excesso de fezes e realizou-se a higienização da região perineal e vulva.

A aspiração folicular foi realizada com aparelho de ultrassonografia (DP-2200, Mindray<sup>®</sup>) acoplado a um transdutor microconvexo multifrequencial, usado na frequência de 7,5 MHz. A esse transdutor foi acoplada uma guia de aspiração folicular (WTA - Watanabe Tecnologia Aplicada<sup>®</sup>) que sustentava uma linha de aspiração folicular de teflon de 1,8 mm x 1,0 mm de diâmetro e 1,2 m de comprimento e uma agulha (18G) (WTA - Watanabe Tecnologia Aplicada<sup>®</sup>).

A pressão da bomba de vácuo utilizada foi de aproximadamente 85 mmHg (12 a 15 mL água/minuto). O sistema de aspiração foi previamente lavado com solução DMPBS (Tampão Fosfato Salino modificado por Dulbelco, Biodux<sup>®</sup>), acrescido de 1 mL de heparina sódica suína (5.000 UI/mL; Hepamax-s<sup>®</sup>, laboratório BLAU Farmacêutica S.A.) por litro de solução DMPBS, previamente aquecida a 37°C. O conteúdo da aspiração foi mantido até a avaliação em tubos estéreis e aquecidos. Todos os folículos  $\geq 2,0$  mm, visíveis no ultrassom foram puncionados e recolhidos em tubo cônico de 50 mL.

### 2.12. Processamento dos oócitos

No laboratório em ambiente sob fluxo laminar o conteúdo do tubo foi passado para um filtro de colheita de embriões (WTA - Watanabe Tecnologia Aplicada<sup>®</sup>) e lavado com meio usado na OPU até a obtenção de um líquido translúcido. Em seguida, o conteúdo do filtro foi vertido em uma placa Petri 100 x 20 mm e avaliado com uma lupa estereoscópica. Os oócitos foram classificados em diferentes categorias de acordo com a morfologia, seguindo a classificação padrão adotada para bubalinos, proposta por Di Francesco *et al.* (2011).

Após a classificação, os oócitos foram lavados em gotas de aproximadamente 70  $\mu$ L de meio de lavagem (TCM 199 Hepes + 10% SFB + 22  $\mu$ g/mL piruvato + 83,4  $\mu$ g/mL de amicacina) e armazenados em criotubos de 2 mL nesta mesma solução. O transporte até o laboratório ocorreu à uma temperatura de 38°C em transportadora comercial (WTA - Watanabe Tecnologia Aplicada<sup>®</sup>) em um intervalo máximo de 5 horas. Devido a indisponibilidade de tempo e dificuldade econômica para adquirir os materiais necessários para a realização da PIVE, após a classificação, todos os oócitos considerados viáveis foram utilizados.

### 2.13. Maturação

A maturação foi realizada no meio Tissue Culture Medium (TCM<sup>®</sup>) em uma incubadora estabilizada em temperatura de 38,8°C com 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas.

### 2.14. Fertilização *in vitro*

Os oócitos considerados viáveis, foram divididos igualmente de acordo com a classificação por qualidade (Grau I, Grau II e Grau III) entre os grupos a serem fertilizados por sêmen refrigerado e congelado.

A diluição do meio e preparação das placas foram feitas no dia anterior a FIV. As gotas de meio para fecundação colocadas em placas de petri foram de 70  $\mu$ L e cobertas com óleo mineral, na presença de garrafa contendo água destilada foram incubadas a temperatura 38,8°C e 5% CO<sub>2</sub>. Os oócitos maturados foram lavados em meio de incubação (TCM 199 Hepes), e aleatoriamente distribuídos nas gotas para o processo de fecundação em meio Tyrode's-albumina-lactato-piruvato (TALP) suplementado com 83  $\mu$ g/mL de amicacina, 44  $\mu$ L/mL da solução PHE (penicilamina 68  $\mu$ g/mL, hipotaurina 25  $\mu$ g/mL, epinefrina 8,1  $\mu$ g/mL), 0,6% de albumina sérica bovina (BSA), 0,2 mM de piruvato de sódio e 10  $\mu$ g/mL de heparina.

### 2.15. Sêmen usado

As palhetas de sêmen (refrigeradas e congeladas) foram aquecidas a 36,5°C/30s e o conteúdo acondicionado em eppendorf de 1,5 mL contendo meio de Percoll (bicarbonato de sódio, cloreto de cálcio, cloreto de magnésio, lactato) e meio de incubação c. Esse meio foi diluído e aquecido 30 minutos antes.

A separação dos espermatozoides viáveis dos não viáveis, foi realizada por centrifugação em rotação de 5500 RPM por 2 minutos. Ao sobrenadante adicionou-se 1 mL de meio (Tyrode's-albumina-lactato-piruvato (TALP) suplementado com 83 µg/mL de amicacina, 44 µL/mL da solução PHE (penicilamina 68 µg/mL, hipotaurina 25 µg/mL, epinefrina 8,1 µg/mL), 0,6% de albumina sérica bovina (BSA), 0,2 mM de piruvato de sódio e 10 µg/mL de heparina) e retornando-se com os eppendorfs para a centrífuga em uma rotação de 5500 RPM por 1 minuto. Em cada gota de meio contendo os oócitos foi depositado 8 µL de sêmen ( $\pm 0,4 \times 10^6$  SPTZ) mantidos em cultivo por 21 horas.

### 2.16. Cultivo

Após o período de fecundação as estruturas foram lavadas pelo menos 4 vezes em meio TCM 199 Hepes e posteriormente colocadas em gotas de meio sintético de fluido de oviduto (SOF) meio produzido no dia anterior ao cultivo. Em placas de Petri foram feitas gotas de 100 µL (50 - 50 µL), oócitos a serem fertilizados pelo sêmen refrigerado e congelado, respectivamente), cobertas com óleo mineral (Irvine®) e colocadas em uma garrafa em seguida conduzidas para incubadora com temperatura de 38,8°C com 5% de CO<sub>2</sub>.

Para a continuidade do processo, os zigotos foram conduzidos para outra incubadora em ambiente com 90% de Nitrogênio, 5% de CO<sub>2</sub> e 5% de O<sub>2</sub> em uma temperatura de 38,8°C, por um período de 72 horas. O primeiro *feeding* foi realizado após 72 horas do cultivo, sendo feita uma avaliação da clivagem, remoção das células do *cumulus* que permaneceram aderidas e troca do meio SOF para renovar os nutrientes. Posteriormente, no 5º dia após a FIV, ocorreu o 2º *feeding* que consiste em retirar (50 µL) de meio SOF da placa e adicionar 50 µL meio “fresco” (SOF). Já no 6º dia após a FIV na parte da manhã foi feita a observação e contagem dos blastocistos.

### 2.17. Análise estatística

Para a análise dos dados seminais utilizou-se o pacote STATA 12.0 statistical analysis software (Statacorp, 2012) e Teste T (médias de duas amostras independentes). Já para as variáveis da FIV, foi realizada a análise descritiva e Teste Z.

## 3. RESULTADOS

As características físicas dos ejaculados *in natura* (fresco) utilizadas para o experimento estão apresentadas na Tabela 40.

Tabela 40 - Características físicas e morfológicas dos ejaculados de búfalos da raça Murrah (n=3) avaliados imediatamente pós-coleta.

Animais	Volume (mL)	Turbilhão (0-5)	Motilidade (%)	Vigor (0-5)	Concentração (x10 <sup>6</sup> /mL)	DM (%)	Normais (%)
1	1,5	3	80	4	1350	9	87
2	1,8	3	90	4	1580	10	83
3	2.1	3	80	3	930	8	88,5
<b>Média±DV</b>	<b>1,8±0,3</b>	<b>3,0±0,0</b>	<b>83,3±5,8</b>	<b>3,7±0,6</b>	<b>1286,7±329,6</b>	<b>9,0±1,0</b>	<b>86,1±2,8</b>

DM = Defeitos maiores; DV = Desvio padrão e Normais = Espermatozoides morfolologicamente normais.

Os dados da cinética espermática são apresentados na Tabela 41. Onde é possível verificar que os valores médios para o sêmen nos tempos avaliados são bastante elevados, mesmo para o sêmen congelado.

Tabela 41 - Médias e desvios padrão dos parâmetros de cinética espermática do sêmen de búfalos (n=3) nos tempos: 0hs (pós-diluição à 37°C), 4hs (equilíbrio até 5°C), 4 à 24hs (refrigeração à 5°C) e pós-congelamento (-196°C) para uso na PIVE.

Parâmetros Cinéticos	Tempo de conservação			
	0hs	4hs	24hs	C
MT (%)	97,0±1,0 <sup>a</sup>	95,0±1,0 <sup>a</sup>	90,3±2,1 <sup>b</sup>	60,3±3,2 <sup>c</sup>
MP (%)	85,3±9,5 <sup>a</sup>	77,3±6,1 <sup>b</sup>	64,3±6,0 <sup>c</sup>	41,3±4,0 <sup>d</sup>
VCL (µm/s)	104,8±15,9 <sup>a</sup>	94,3±0,5 <sup>b</sup>	88,4±7,6 <sup>b</sup>	53,9±0,7 <sup>c</sup>
VAP (µm/s)	72,8±7,3 <sup>a</sup>	66,0±5,4 <sup>b</sup>	63,8±5,1 <sup>b</sup>	42,1±0,8 <sup>c</sup>
VSL (µm/s)	49,2±5,6 <sup>a</sup>	46,2±10,3 <sup>a</sup>	44,4±9,7 <sup>b</sup>	32,3±1,2 <sup>c</sup>
LIN (%)	47,9±10,1 <sup>b</sup>	49,5±11,6 <sup>b</sup>	49,3±7,2 <sup>b</sup>	59,3±1,1 <sup>a</sup>
STR (%)	67,9±8,6 <sup>b</sup>	69,0±10,0 <sup>b</sup>	69,0±11,2 <sup>b</sup>	79,4±0,6 <sup>a</sup>
WOB (%)	70,0±6,7 <sup>b</sup>	70,1±6,1 <sup>b</sup>	71,8±5,1 <sup>b</sup>	77,3±1,5 <sup>a</sup>
ALH (µm)	3,7±0,6 <sup>b</sup>	3,3±0,2 <sup>b</sup>	3,2±0,2 <sup>b</sup>	2,2±0,1 <sup>a</sup>
BCF (Hz)	9,3±1,0 <sup>b</sup>	10,1±0,6 <sup>a</sup>	10,4±1,8 <sup>a</sup>	10,0±0,2 <sup>a</sup>

Letras diferentes em cada característica espermática (linha), diferem estatisticamente entre si (p<0,05). C: Congelado; MT: Motilidade Total; MP: Motilidade Progressiva; VCL: Velocidade Curvilínea; VAP: Velocidade Média da Trajetória; VSL: Velocidade Linear Progressiva; LIN: Linearidade; STR: Retilinearidade; WOB: Índice de Oscilação; ALH: Amplitude do Deslocamento Lateral de Cabeça; BCF e Frequência de Batimentos de Cauda; %: Porcentagem; µm/s: Micrômetro por segundo; µm: Micrômetro e Hz: Hertz.

Para a integridade de membrana plasmática através do teste hiposmótico (HOST), é possível verificar que os valores se mantiveram bastante elevados, mesmo para o sêmen congelado para a espécie bubalina, ficando evidente que o meio diluidor utilizado foi eficiente em preservar a e manter a integridade espermática, conforme Tabela 42.

Tabela 42 - Médias e desvios padrão dos espermatozoides com membrana plasmática íntegra ao teste hiposmótico, para os espermatozoides de touros búfalos (n=3) diluído em meio TRIS 10% LDL + 0,5% Lecitina de soja + 10 mM Acetilcisteína do processamento ao pós-descongelamento, durante os tempos pós-diluição (37°C), pós-equilíbrio (37 a 5°C), 24 hs de refrigerado (5°C) e pós-congelamento (-196°C).

Parâmetro	Tipo de sêmen	Tempo (horas)	Porcentagem (%)
HOST	Pós-diluição (37°C)	0-1	94,1±2,9 <sup>a</sup>
	Pós-equilíbrio (5°C)	4	92,2±3,2 <sup>a</sup>
	Pós-refrigeração (5°C)	24	89,9±1,5 <sup>a</sup>
	Pós-congelamento (-196°C)	C	58,6±2,5 <sup>b</sup>

Letras diferentes em cada característica espermática (coluna), diferem estatisticamente entre si (p<0,05). HOST: Teste Hiposmótico; LDL: Lipoproteína de baixa densidade; mM: Milimolar e C: congelado.

Os valores obtidos para as variáveis OPU-PIVE, relativas a três sessões de aspiração encontram-se sumarizadas na Tabela 43. Verifica-se que o número total de folículos aspirados, assim como o número de oócitos e a taxa de recuperação foram reduzindo com o avanço do tempo durante o período reprodutivo desfavorável (setembro a novembro).



Tabela 43 - Variáveis de OPU - PIVE realizadas em três sessões (intervalo de 30 dias - durante os meses de setembro a novembro, respectivamente) em búfalas (*Bubalus bubalis*) Belo Horizonte - MG, 2017.

Variáveis	Sessões de aspiração (OPU)		
	1ª Sessão	2ª Sessão	3ª Sessão
Nº de animais aspirados	20	25	16
Nº de folículos aspirados	161	140	139
Nº médio de folículos/fêmea	8,1	5,6	8,7
Nº de oócitos totais	130	105	94
Taxa de recuperação (%)	81	75	68
Nº de oócitos viáveis (Grau I, II e III)	102	80	57
Taxa de oócitos viáveis (%)	78,5	76,1	47,4
Nº médio de oócitos/fêmea	6,5	4,2	5,9

%; Porcentagem.

Na Tabela 44 são apresentadas as variáveis da aspiração folicular em búfalas, realizada a comparação entre o uso do sêmen refrigerado e congelado para a fertilização *in vitro*. É possível verificar que houve diferença entre os tipos de sêmen utilizados para quase todos os parâmetros avaliados.

Tabela 44 - Efeitos da aspiração folicular (intervalo de 30 dias entre as OPU - durante os meses de setembro a novembro, respectivamente) na recuperação e qualidade dos oócitos para a produção de embriões *in vitro* em búfalas (*Bubalus bubalis*), utilizando o sêmen refrigerado e congelado, Belo Horizonte - MG, 2017.

Variáveis	Sessões de aspiração (OPU)						Total	
	1ª Sessão		2ª Sessão		3ª Sessão			
	SR	SC	SR	SC	SR	SC	SR	SC
Nº de oócitos maturados	51	51	40	40	27	30	118	121
Nº de oócitos cultivados	41	30	34	32	27	30	102 <sup>a</sup>	92 <sup>b</sup>
Nº de oócitos clivados	16	13	11	6	8	4	35 <sup>a</sup>	23 <sup>b</sup>
Nº de embriões produzidos	16	12	7	5	7	0	30 <sup>a</sup>	17 <sup>b</sup>
T. de embriões/maturados (%)	31	24	18	13	18	0	25,4 <sup>a</sup>	14,0 <sup>b</sup>
T. de embriões/cultivados (%)	39	40	21	16	26	0	29,4 <sup>a</sup>	18,5 <sup>b</sup>
T. de embrião/clivado (%)	100	92	64	83	88	0	85,7	73,9

Letras diferentes em cada característica espermática (linha), diferem estatisticamente entre si ( $p < 0,05$ ); T.: Taxa; %: Porcentagem; SR: Sêmen refrigerado; SC: Sêmen congelado e Teste Z.

#### 4. DISCUSSÃO

Para o sêmen *in natura*, todos os 3 touros utilizados (Tabela 40) possuíam valores para os parâmetros espermáticos acima dos valores mínimos recomendados pelo CBRA (2013). A associação dos bons valores obtidos nos parâmetros seminais estudados, permitem fazer uma boa estimativa da capacidade fecundante de uma dada amostra (Severo, 2009).

Os bons resultados encontrados para o sêmen *in natura* dos animais estudados, em parte se deve ao fato destes estarem em regime de coleta seminal semanal a pelo menos 4 anos. E também a associação de uma falsa monta (desvio do pênis sem realizar a coleta do sêmen, a qual só era efetuada na segunda tentativa de cópula, isto para se obter um ejaculado com melhor concentração e volume, uma vez que o animal estava pré-estimulado).

Nos últimos anos têm-se tentado buscar metodologias que permitam prever a fertilidade do sêmen, sem que necessariamente haja a necessidade de realizar a fertilização *in vivo*. Isto porque, a fertilização *in vivo*, mesmo sendo a melhor maneira de comprovar a fertilidade, é uma técnica mais demorada e nem sempre possível de ser realizada devido a

dificuldade de conseguir número suficiente de animais, fazendas com estrutura adequada e próximas, custos com deslocamento e fármacos, o que em muitas situações tornam sua execução inviável. Face a essas dificuldades, o sistema de avaliação automática (CASA) tem mostrado ser uma ferramenta útil na avaliação das propriedades cinéticas do espermatozoide de forma individual do ejaculado, mostrando grande potencial para predizer a fertilidade do macho, por meio da correlação da velocidade de natação do espermatozoide com a fertilização de oócito *in vitro* e *in vivo* (Cox *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2016 e Ahmad *et al.*, 2017).

Segundo Verstegen *et al.* (2002), na tentativa de correlacionar os parâmetros do CASA com a taxa de fertilização, verificou-se que os valores de VAP, VSL e VCL são significativamente maiores em amostras que produzem mais de 50% de oócitos fertilizados do que naquelas onde a taxa de fertilização de oócito é menor que 50%. Mortimer (2000) e Verstegen *et al.* (2002), reportaram que amostras com elevados valores desses parâmetros de velocidade e de LIN e BCF apresentam melhor migração e penetração no muco cervical. Entretanto, entre os parâmetros cinéticos, fornecidos pelo CASA, a VCL e a ALH têm mostrado grande correlação com taxa de fertilização pela maioria dos estudos (Matos *et al.*, 2008).

Poucos estudos foram realizados com sêmen bubalino com o propósito de avaliar o comportamento da cinética espermática após o processo de refrigeração do sêmen a 5°C (Akhter *et al.*, 2011b; Singh *et al.*, 2012; Almeida *et al.*, 2016 e Becerra, 2017), congelado (Akhter *et al.*, 2011a; El-Sherbieny, 2014 e El-Badry *et al.*, 2015) e estudos diretamente relacionados em predizer a fertilidade (Singh *et al.*, 2016 e Ahmad *et al.*, 2017). No entanto, não foi encontrado na literatura estudos com o uso do sêmen refrigerado para a fertilização *in vitro*. Assim, existe um universo a ser explorado com o sêmen refrigerado e que pode vir a ser muito favorável a melhoria nos índices de fertilidade, como demonstrado neste estudo para a PIVE na espécie bubalina.

No presente experimento não se observou o efeito touro significativo, pois os três reprodutores testados apresentaram altas características de motilidade, integridade de membrana espermática e satisfatórias taxas de fertilização. Mas é sabido que touros diferem em sua capacidade de produzir descendentes, nos diferentes sistemas de criação natural e artificial (Saacke *et al.*, 1998). Sabe-se também, que os espermatozoides de diferentes búfalos diferem em sua capacidade de fertilizar o oócito *in vitro* (Totey *et al.*, 1992 e Zicarelli *et al.*, 2009). Acredita-se que as diferenças encontradas neste estudo estão mais relacionadas a quantidade e qualidade dos oócitos obtidos em cada sessão de aspiração (Tabela 43). Isto conforme já comentado anteriormente, provavelmente se deve a perda de escore corporal sofrida pelas búfalas durante a segunda sessão de aspiração, situação recuperada na sessão seguinte. Mas também ao avanço das aspirações no período reprodutivo desfavorável, lembrando-se que as aspirações ocorreram entre setembro e novembro e, que o último mês a seca já se apresentava mais crítica em relação ao mês de setembro. Informações estas que são respaldadas pelos achados de Pereira (2015), que ao comparar a produção de folículos e recuperação de oócitos durante os períodos reprodutivos favoráveis (março a junho), período reprodutivo de transição (julho a setembro) e no período reprodutivo desfavorável (outubro a fevereiro), verificou que a produção de folículos e oócitos bubalinos recuperados a partir da aspiração folicular de animais *in vivo*, vai reduzindo com o avanço no período reprodutivo desfavorável (outubro a fevereiro) para o estado de Minas Gerais.

No presente estudo verificou-se que o número de folículos aspirados decaiu na segunda sessão provavelmente porque a fazenda onde estavam os animais teve sua pastagem quase totalmente queimada e, isso fez com que os animais passassem por um período de escassez de alimento perdendo um pouco de seu escore corporal. Após realocação dos animais para uma pastagem de melhor qualidade, houve recuperação do número médio de folículos visualizados e aspirados por fêmea, conforme Tabela 43. No entanto, com o avanço no período reprodutivo desfavorável (mês de novembro) e, com o rigor da seca, houve uma queda no número de folículos aspirados, como também no número de oócitos viáveis (Tabela 43).

O número de folículos aspirados foi considerado como a população folicular uma vez que todos os folículos visíveis foram aspirados em cada sessão. Como era objetivo do estudo testar o sêmen refrigerado e, devido à dificuldade em conseguir realizar sessões de OPU (dificuldade financeira e de pessoal qualificado), optou-se por utilizar todos os oócitos viáveis. Desta forma, preocupou-se apenas em dividir igualmente os oócitos quanto a qualidade entre os grupos a serem fertilizados com o sêmen refrigerado e congelado.

O número médio de folículos aspirados por animal no presente estudo 8,1; 5,6 e 8,7 foram similares aos reportados por Sá Filho *et al.* (2009) ao aspirar búfalas comparando animais que receberam ou não bST, encontrando 9,1 e 6,8 folículos, respectivamente. Posteriormente Gasparrini *et al.* (2014) e Pereira (2015) reportaram ter encontrado 8,3 e 9,9 folículos por fêmea. No entanto, quando Pereira (2015) aspirou no período reprodutivo de transição (julho a setembro) e no período reprodutivo desfavorável (outubro a fevereiro), obteve 10,6 e 10,0 folículos por animal, respectivamente. Valores superiores também foram encontrados por Ferraz *et al.* (2015) ao pesquisar búfalas submetidas ao tratamento com e sem bST (15,6 e 12,8), respectivamente. Recentemente Ohashi *et al.* (2017) reportaram que ao selecionar búfalas com grande população folicular, aumenta-se o número de folículos (13,6) por fêmea.

Quanto ao número de oócitos por fêmea, no presente estudo obteve-se 6,5; 4,2 e 5,9 para as sessões I, II e III (setembro, outubro e novembro), respectivamente. Valor inferior (3,7 oócitos) foi encontrado por Pereira (2015) ao aspirar búfalas durante o período de outubro a fevereiro. Já Ohashi *et al.* (2017) encontrou 7,8 oócitos por doadora, trabalhando com búfalas selecionadas por maior população folicular.

A taxa de recuperação de oócitos variou entre a primeira e a terceira sessão de aspiração (81 e 68%), conforme Tabela 43. Provavelmente, isto ocorreu devido a perda de escorço corporal, em função da pastagem de qualidade inferior entre a primeira e terceira sessões de coletas, bem como pelo avanço da última coleta no período reprodutivo desfavorável (novembro). Uma taxa menor foi reportada por Sá Filho *et al.* (2009), que obtiveram 57,7% de oócitos recuperados. Em estudo de Pereira (2015), também foi reportada uma taxa menor de oócitos recuperados (35,0%) para o período reprodutivo desfavorável.

Na Tabela 44 é possível observar que houve uma diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) entre as taxas de embriões produzidos, sendo essas taxas superiores para o os embriões fertilizados com o sêmen refrigerado.

O número de oócitos clivados obtidos neste estudo 35 e 23% (sêmen refrigerado e congelado, respectivamente), evidenciam a eficiência do uso do sêmen refrigerado na PIVE de búfalas (Tabela 44). No entanto, novos estudos são necessários para verificar se esses resultados se repetem. Taxas de clivagem de 41,7%; 67,5%; 38,7% (outubro a fevereiro) e 63,4% (março a junho) e 33,4% foram reportadas por Sá Filho *et al.* (2009), Gasparrini *et al.* (2014), Pereira (2015) e Ferraz *et al.* (2015). Porém, esses resultados foram obtidos com o uso do sêmen congelado e com diferentes diluidores. Sendo assim, é difícil fazer comparações por se tratar de experimentos diferentes, em condições e locais diferentes.

Quando se compara o número de embriões produzidos, é possível verificar que o sêmen refrigerado apresentou melhores resultados que o sêmen congelado. Isso pode ter diversas explicações: 1) o sêmen refrigerado causa menos as injúrias aos espermatozoides que o processo de congelamento e descongelamento; 2) os elevados percentuais de motilidade (CASA) e integridade da membrana plasmática (teste hiposmótico) proporcionado pelo diluidor TRIS 10% LDL + 0,5% lecitina de soja + 10 mM acetilcisteína, tanto para o sêmen refrigerado como para o congelado contribuíram para que houvessem boas taxas de clivagem; 3) a concentração espermática utilizada por mL ( $50 \times 10^6$  SPTZ) pode ter colaborado para os bons resultados, uma vez que há a possibilidade de compensação de algumas patologias espermáticas e permite que mais espermatozoides viáveis estejam disponíveis para fertilizar os oócitos e 4) o uso da lecitina

de soja juntamente com o antioxidante acetilcisteína pode ter tido um efeito benéfico, mas mais estudos são necessários para comprovar esse efeito.

Os resultados encontrados permitem afirmar que o meio diluidor utilizado para a refrigeração como para o congelamento de sêmen bubalino, foi eficaz para a fertilização, de modo que foram produzidos embriões pelos dois tipos de sêmen utilizados. Neste contexto, o diluidor TRIS com 10% LDL + LS 0,5% + 10 mM de Acetilcisteína, demonstrou ser eficiente para a fertilização na PIVE de búfalos. Outro aspecto, é que o sêmen com 24 hs a 5°C foi eficiente na fertilização *in vitro* e superou o sêmen congelado na produção de embriões.

Na literatura pesquisada, não foi encontrado nenhum relato do uso de sêmen refrigerado para a PIVE de búfalos ou qualquer outra espécie de animais de produção. Neste contexto, o uso do sêmen refrigerado por 24 hs a 5°C se mostrou uma técnica inovadora e passível de uso para melhorar os índices de fertilidade com a PIVE, podendo inclusive reduzir os custos de produção de embriões, tornando a técnica cada vez mais acessível aos produtores. No entanto, novos estudos são necessários para verificar a repetibilidade dos resultados obtidos, não só para a espécie bubalina, como para as demais espécies de produção. Assim como, também devem ser realizados testes de fertilização *in vivo* para validar os resultados obtidos em laboratório.

Em um momento onde se tenta encontrar formas de aumentar a eficiência reprodutiva, redução de custos com produção e resultados que tornem uma propriedade competitiva comercialmente, o uso do sêmen refrigerado por 24 hs a 5°C pode ser uma alternativa que venha a incrementar e consolidar a técnica de PIVE na espécie bubalina. Esta é uma espécie que possui uma série de peculiaridades e, até o momento ainda não se consolidou para uso da PIVE, devido aos resultados inferiores obtidos quando comparado com outras espécies como a bovina.

## 5. CONCLUSÕES

O extensor TRIS 10% LDL + 0,5% lecitina de soja + 10 mM de Acetilcisteína foi eficiente para manter a motilidade, integridade da membrana espermática e fertilidade para o sêmen de diferentes touros bubalinos, tanto refrigerado quanto congelado na PIVE.

O uso de sêmen refrigerado por 24 horas a 5°C se demonstrou eficaz na fertilização de óocitos de búfalas pela técnica de PIVE.

O sêmen refrigerado por 24 horas a 5°C demonstrou superioridade para obtenção de embriões no processo de PIVE quando comparado ao sêmen congelado.

## AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT da Pecuária) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por cederem parte dos recursos para compra de material do experimento e pela concessão da bolsa, fator indispensável para o andamento e finalização do curso.

Aos Veterinários do Laboratório BH Embriões, por realizarem os trabalhos de aspiração e processo de fertilização *in vitro*.

## REFERÊNCIAS

AHMAD, H.; ANDRABI, S.M.H.; ANWAR, M. et al. Use of post-thaw semen quality parameters to predict fertility of water buffalo (*Bubalus bubalis*) bull during peak breeding season. *Andrologia*, May, v.49, n.4, p.1-6, 2017.

AKHTER, S.; ANSARI, M.S.; RAKHA, B.A. et al. Effect of low density lipoproteins in extender on freezability and fertility of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull semen. *Theriogenology*. v.76, p.759-764, 2011a.

AKHTER, S.; ANSARI, M.S.; RAKHA, B.A. et al. *In vitro* evaluation of liquid-stored buffalo semen at 5°C diluted in soya-lecithin based extender (Bioxcell®), Tris-citric egg yolk, skim milk and egg yolk-citrate extenders. *Reprod. Domest. Anim.* v.46, p.45-49, 2011b.

ALMEIDA, J.; BECERRA, V.A.B.; NEVES, B.P. et al. Refrigeração de sêmen bubalino (*Bubalus bubalis*) frente a diferentes extensores e avaliação da motilidade espermática no CASA. *Proceedings...* In: 30<sup>th</sup> ANNUAL OF THE BRAZILIAN EMBRYO TECHNOLOGY SOCIETY (SBTE), Foz do Iguaçu, PR, Brazil. August 25<sup>th</sup> to 27<sup>th</sup>, 2016, and 32<sup>th</sup> Meeting of the European Embryo Transfer Association (AETE), Barcelona, Spain, Septembre 9<sup>th</sup> and 10<sup>th</sup>, 2016. Abstracts. *Anim. Reprod.* v.13, n.3, p.557, Jul./Sept., 2016.

BECERRA, V.A.B. Efeito da adição de *Aniba canelilla*, blueberry e polifenol de chá verde sobre a viabilidade *in vitro* de espermatozoides de búfalo (*Bubalus bubalis*) resfriados a 5°C. 2017. 69f. Dissertação (Mestrado) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG.

BERNARDES, J. Nascem bezerras geradas de embriões de animais de dois meses. *J. USP*. 02/05/17. <http://jornal.usp.br/ciencias/ciencias-agrarias/nascem-bezerras-geradas-de-embrioes-de-animais-de-dois-meses/>, 2017.

CBRA. Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal. 3<sup>a</sup> ed. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, Belo Horizonte. 104p, 2013.

COX, J.F.; ALFARO, V.; MONTENEGRO, V. et al. Computer-assisted analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm migration in cervical mucus. *Theriogenology*, v.66, p.860-867, 2006.

DANELL, B. Oestrous behaviour, ovarian morphology and cyclical variation in follicular system and endocrine pattern in water buffalo heifers. 1987. 124f. Thesis (Doctorat) - Faculty of Veterinary Medicine, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden.

DI FRANCESCO, S.; BOCCIA, L.; CAMPANILE, G. et al. The effect of season on oocyte quality and developmental competence in Italian Mediterranean buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Anim. Reprod. Sci.* v.123, p.48-53, 2011.

EL-BADRY, D.A.; RAWASH, Z.M.; ELAAL, M.B. et al. The Effect of LDL from Different Bird's Eggs on the Freezability of Buffalo Spermatozoa. *Global Vet.*, v.14, cap.2, p.158-165, 2015.

EL-SHERBIENY, M.A. Impact of replacing egg yolk with lecithin on sperm characteristics, bacterial count and fertilizing ability of cryopreserved buffalo semen. *J. Anim. Poultry Prod.*, Mansoura University, v.5, n.6, p.353-364, 2014.

ERICKSON, B.H. Development and radio-response of pre-natal bovine ovary. *J. Reprod. Fertil.* v.10, p.97-105, 1966.

FARRELL, P.B.; PRESICCE, G.A.; BROCKETT, C.C. et al. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. *Theriogenology*, v.49, p.871-879, 1998.

FERRAZ, M.L.; SÁ FILHO, M.F.; BATISTA, E.O.S. et al. Paradoxical effects of bovine somatotropin treatment on the ovarian follicular population and *in vitro* embryo production of lactating buffalo donors submitted to ovum pickup. *Anim. Reprod. Sci.*, v.154, n.1-7, 2015.

GASPARRINI, B.; NEGLIA, G.; DI PALO, R. et al. Influence of oocyte donor on *in vitro* embryo production in buffalo. *Anim. Reprod. Sci.*, v.144, p.95-101, 2014.

HANCOCK, J.L. The morphology of boar espermatozoa. *J. Reprod. Microsc. Soc.*, v.76, p.84-97, 1957.

IN VITRO Brasil (2016). <http://invitrobrasil.com.br/fiv-bubalinos.php>

LE VAN TY, D.; CHUPIN, D.; DRIANCOURT, D.A. Ovarian follicular population in buffaloes and cows. *Anim. Reprod. Sci.*, v.19, p.171-178, 1989.

LOAIZA-ECHEVERRI, A.M.; CRUZ, B.C.; DAS NEVES SNOECK, P.P. et al. Low density lipoproteins added to an extender frozen or lyophilized are evenly efficient in cryoprotecting ovine sperm cells than when 16% whole egg yolk was added. *Semina: Ciênc. Agrár.*, v.3, n.36, p.1315-1346, 2015.

MADAN, M.L.; SINGLA, S.K., JAIN, G.C. Ovulatory response to different superovulatory treatment amongst buffaloes (*Bubalus bubalis*). In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND AI, 11, 1992, Dublin. *Proceedings...* Dublin: ICAR, 1992. 1, p.172, 1992.

MATOS, D.L; ARAÚJO, A.A.; ROBERTO, I.G. et al. Análise computarizada de espermatozóides: revisão de literatura. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.32, n.4, p.225-232, out./dez. 2008.

MOUSSA, M.; MARTINET, V.; TRIMECHE, A. et al. Low density lipoproteins: extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*, v.57, p.1695-1706, 2002.

NEVES, M.M. Extração das lipoproteínas de baixa densidade da gema do ovo de gallus domesticus e sua aplicação na criopreservação do sêmen canino. 2008. 116f. Tese (Doutorado) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brasil.

OHASHI, O.M.; CORDEIRO, M.S.; MIRANDA, M.S. Biotecnologia da reprodução aplicada a bubalinos. *Rev. Cienc. Agrar*, v.45, p.58-63, 2006.

OHASHI, O.M.; COSTA ALMEIDA, N.N.; CORDEIRO, M.S. et al. Produção *in vitro* de embrião (PIVE) na espécie bubalina. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.41, n.1, p.195-200, jan./mar., 2017.

OHASHI, O.M.; MIRANDA, M.S.; SOUZA, J. et al. Produção *in vitro* de embrião bubalino. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* v.27, p.103-109, 2003.

OHASHI, O.M.; SANTOS, S.S.D.; MIRANDA, M.S. et al. Morfologia do sistema genital, distúrbio reprodutivo e manejo do macho bubalino (*Bubalus bubalis*). *Rev. Bras. Reprod. Anim.* v.35, p.88-94, 2011.

- PEREIRA, E.C.M. Produção de óocitos e embriões bubalinos: efeitos da época do ano e da adição de óleo essencial de *Lippia origanoides* na maturação *in vitro*. Botucatu, 2015, 140p. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista- UNESP.
- SAACKE, R.G.; DEJARNETTE, J.M.; BAME, J.H. et al. Can spermatozoa with abnormal heads gain access to the ovum in artificially inseminated super and single-ovulating cattle? *Theriogenology*, v.51, p.117-128, 1998.
- SÁ FILHO, M.F.; CARVALHO, N.A.T.; GIMENES, L.U. et al. Effect of recombinant bovine somatotropin (bST) on follicular population and on *in vitro* buffalo embryo production. *Anim. Reprod. Sci.* v.113, p.51-59, 2009.
- SANSONE, G.; NASTRI, M.J.F.; FABBROCINI, A. Storage of buffalo (*Bubalis bubalis*) semen. *Anim. Reprod. Sci.* v.62, p.55-76, 2000.
- SEVERO, N. C. Influência da qualidade do sêmen bovino congelado sobre a fertilidade. *H. Vet.*, ano 28, Jan-Fev, n.167, p.36-39, 2009.
- SINGH, R.K.; KUMARESAN, A.; CHHILLAR, S. et al. Identification of suitable combinations of *in vitro* sperma-function test for the prediction of fertility in buffalo bull. *Theriogenology*, v.86, p.2263-2271, 2016.
- SINGH, A.K.; SINGH, V.K.; NARWADE, B.M. et al. Comparative quality assessment of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen chilled (5°C) in egg yolk- and soya milk-based extenders. *Reprod. Dom. Anim.* v.47, p.596-600, 2012.
- STATACORP. Stata: Release 12. Statistical Software. College Station, TX: StataCorp LP, 2012.
- SURRESH, K.P.; NANDI, S.; MONDAL, S. Factors affecting laboratory production of buffalo embryos: a meta-analysis. *Theriogenology*, v.72, p.978-985, 2009.
- TOTEY, S.M.; SINGH, G.; TANEJA, M. et al. *In vitro* maturation, fertilization and development of follicular oocytes from buffalo (*Bubalus Bubalis*). *J. Reprod. Fertil.* v.95, p.597-607, 1992.
- VALE, W.G. Avances biotecnológicos em reproducción de búfalos. *Tecnol. Marcha*, v.24, n.5, p.89-90, 2011.
- VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.I.; OCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, v.57, p149-179, 2002.
- VITORIA, A. Anatomy of female genital tract in the buffalo. In: Course on Biotecnology of Reproduction in Buffaloes. Casserta, Italy, v.3, 1997.
- WILMUT, I.; YOUNG, L.; DE SOUSA, P. et al. New opportunities in animal breeding and production: an introductory remark. *Anim. Reprod. Sci.* v.60, p.5-14, 2000.
- ZICARELLI, L.; MARIOTTI, E.; DI FRANCESCO, S. Efeito do touro na capacitação de esperma *in vitro* induzida por diferentes agentes em espécies de búfalos (*Bubalus bubalis*). *Ital. J. Anim. Sci.* v.8 (Suppl. 2), p.177-179, 2009.

## 6. CONCLUSÕES GERAIS

### *Experimento 1*

Os reprodutores bubalinos são passíveis de condicionamento para coleta de sêmen com vagina artificial em suas fazendas de origem.

Após doze sessões de tentativas de coleta seminal, os touros já respondem com uma certa regularidade a coleta de sêmen com o método de vagina artificial.

De todos os eventos estudados a contração peniana, foi o de maior importância na conduta sexual dos touros bubalinos, demonstrado pelas elevadas proporções de manifestação em relação a todos os comportamentos sexuais expressos, na presença de fêmea em estro.

Durante os quatro anos de avaliação do comportamento e condicionamento dos touros para a coleta de sêmen foi verificado que os animais ejaculam tanto no período reprodutivo favorável quanto no período reprodutivo desfavorável.

### *Experimento 2*

Conclui-se que dentre os três extensores testados (TRIS com 10%, Tolera D<sup>®</sup> e Botu-Bov<sup>®</sup>), para a refrigeração a 5°C por até 120 horas, o extensor Botu-Bov<sup>®</sup> foi o que apresentou melhores resultados pela avaliação no sistema CASA e integridade de membrana espermática pelo teste hiposmótico.

### *Experimento 3*

Dentre os extensores TES-TRIS e TRIS com as concentrações de 10 e 5% de LDL, testados sob refrigeração a 5°C para a longevidade espermática (sistema CASA) e integridade de membrana espermática (teste hiposmótico), o extensor TRIS com 10% de LDL foi o diluidor que manteve superioridade para a maioria dos parâmetros analisados durante os tempos de incubação.

### *Experimento 4*

Para as diferentes concentrações de lecitina de soja usadas no extensor TRIS 10% LDL, a concentração que apresentou melhores resultados foi a de lecitina 0,5% para o sêmen de búfalo, refrigerado e armazenado por até 72 horas à 5°C.

### *Experimento 5*

Em búfalos, as taxas de fertilização foram superiores utilizando-se sêmen refrigerado por 24 horas comparativamente ao congelado, quando utilizado em programas de IATF durante o período reprodutivo desfavorável.

### *Experimento 6*

O sêmen refrigerado por 24 horas aumenta as taxas de concepção comparado ao sêmen congelado e descongelado, em búfalas múltiparas no pós-parto submetidas a IATF no período reprodutivo favorável com o uso do protocolo Ovsynch.



## *Experimento 7*

O extensor TRIS 10% LDL + 0,5% lecitina de soja + 10 mM de Acetilcisteína foi eficiente para manter a motilidade, integridade da membrana espermática e fertilidade no sêmen de diferentes touros bubalinos tanto refrigerado quanto congelado. No entanto, o sêmen refrigerado apresentou melhores taxas de clivagem que o sêmen congelado para a fertilização *in vitro* de oócitos bubalinos.

## **7. CONSIDERAÇÕES GERAIS**

### *Condicionamento de touros*

O tronco para a coleta de sêmen, deve ser construído um local com sombra, afastado dos demais animais (principalmente de outros touros) e locais afastado de locais que estes transitam frequentemente, para permitir uma redução do estresse e distração do touro possibilitando a coleta a qualquer momento sem que haja interrupções.

O tronco onde a fêmea fica contida deve apresentar um apoio lateral, para que quando o touro efetue a monta, possa apoiar o peso (equilibrar) antes de descer totalmente da fêmea. Nesta espécie tem-se observado que os animais quando tem esse apoio, o usam frequentemente e se sentem mais seguros para efetuar a cópula.

Mesmo que geralmente se colete sêmen na maioria dos locais por um único lado o tronco deve permitir acesso para a mesma por ambos os lados, pois vez e outra um animal responde melhor a um lado para se coletar do que de outro.

O ideal é que nas primeiras tentativas de monta, seja utilizado uma manequim em cio natural ou induzido pois aumenta o interesse do macho e este responde com maior rapidez a monta e coleta. No entanto, touros mais velhos podem ejacular mesmo sem haver vacas em cio após algumas semanas contínuas de tentativas de coleta de sêmen.

Há casos em que o touro não tem interesse em saltar em uma determinada fêmea (raro, mas pode acontecer mesmo com vaca em cio), neste caso trocar a manequim por outra fêmea em cio, ou quando o macho já está condicionado, trocar por outra fêmea mesmo não estando no cio pode ocasionar sucesso nas coletas de sêmen. No entanto, esta fêmea substituta, não deve ficar muito próxima do macho durante as tentativas de coleta, pois o distrairá.

Outro artifício que pode ser utilizado para tentar enganar os reprodutores e forçá-los a saltar e ejacular, é a utilização de muco e urina de vacas em cio mantidos em recipiente fechado e refrigerado na geladeira por até um dia. Esse material deve ser utilizado na região da base da calda e perianal em vacas que não estão no cio e que serão usadas como manequins para a coleta.

Quando o touro já está condicionado e respondendo bem as coletas de sêmen, mas observa-se que em determinados dias este animal fica se masturbando e não ejacula, pode se suspeitar de duas coisas: 1) primeiro a vagina artificial pode estar com temperatura inferior a 42°C; 2) a pressão interna da mesma estar baixa, o que reduz o atrito da mesma com o pênis do animal e o faz não ejacular.

Preparar o sêmen (coleta para refrigeração) na véspera da IA e fazer o protocolo nas vacas, é um pouco mais trabalhoso que utilizar o sêmen congelado. No entanto, a manutenção do touro na fazenda para o uso do sêmen refrigerado, que proporciona maiores taxas de concepção, torna este processo viável. Pois aumenta o número de vacas gestantes já no primeiro ciclo de trabalho, o que reduz o intervalo entre partos e dependendo do número de vacas inseminadas, esse percentual a mais de gestação provavelmente pagará o protocolo.

Como perspectivas, pode ser afirmado que os dados descritos nessa tese servem de base para estudos que visem o desenvolvimento de biotécnicas reprodutivas para aumentar o número de descendentes de fêmeas bubalinas geneticamente superiores ao invés de aplicação direta de modelos desenvolvidos para bovinos.

#### *Extensores*

A preservação da viabilidade dos espermatozoides durante pelo menos 24 horas seria suficiente para o transporte e uso dos espermatozoides em fazendas distantes de onde os touros são mantidos, desde que mantidas as condições de armazenamento e transportes adequadas.

O uso do sêmen refrigerado por 24 horas é uma estratégia alternativa viável para melhorar a eficiência reprodutiva e reduzir os custos nos programas de IATF em búfalas.

#### *IATF*

É recomendado que os grupos a serem protocolados para a IATF, não tenham mais do que 20 a 30 animais. Isto porque, grupos maiores demandam maior tempo para a realização dos procedimentos e acabam ultrapassando a janela ideal para a realização das inseminações.

No caso particular das búfalas, após condicionadas, permitem a realização das inseminações em tronco coletivo (lado a lado), sem necessidade de contenção individual. Isto porque, diferentemente dos bovinos, raramente dão coice e ficam mais tranquilas quando colocadas próximas umas às outras.

#### *PIVE*

Mesmo com resultados promissores com o uso do sêmen refrigerado na PIVE, é importante comparar os resultados da fertilização *in vitro* com resultados *in vivo* por meio da inseminação artificial, pois é sabido que os resultados encontrados em laboratório, são na maioria das vezes diferentes dos encontrados a campo, pois no ambiente normal (trato genital da fêmea), os espermatozoides possuem o ambiente ideal para expressarem seu potencial.

Conforme resultados obtidos no trabalho, a produção de folículos e recuperação de oócitos vai reduzindo com o avançar do tempo durante o período reprodutivo favorável. Neste contexto, para o estado de Minas Gerais, a redução do fotoperíodo ocorrida entre março a junho melhora a qualidade dos oócitos bubalinos recuperados a partir da aspiração folicular de animais *in vivo* (Pereira, 2015).

## 8. ANEXOS

ANEXO 1 - Autorização para uso de imagem (Figura 5 - Mecanismo de proteção do espermatozoide por gema de ovo e leite, Manjunath, 2012) na tese.

Marc Henry <henrym2601@gmail.com>

Para:jaci Almeida

15 de mar às 18:29

Em 15 de mar de 2018 5:25 PM, [henrym2601@gmail.com](mailto:henrym2601@gmail.com) escreveu:

----- Mensagem encaminhada -----

De: [henrym2601@gmail.com](mailto:henrym2601@gmail.com)

Data: 15 de mar de 2018 5:24 PM

Assunto: Re: permission to use a figure you published

Para: Puttaswamy Manjunath <[puttaswamy.manjunath@umontreal.ca](mailto:puttaswamy.manjunath@umontreal.ca)>

Cc:

Thank you

Best regards

Marc

Em 15 de mar de 2018 4:33 PM, "Puttaswamy Manjunath"

<[puttaswamy.manjunath@umontreal.ca](mailto:puttaswamy.manjunath@umontreal.ca)> escreveu:

Dear Marc Henry

No problem as long he cites the source (complete reference: Author and journal name, vol, page numbers, year).

Best regards

--

Puttaswamy Manjunath Ph.D.

Research Professor, Medicine, University of Montreal

Mailing address:

Centre de Recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont

5415, blvd de L'Assomption

Pavillon JA-Desève, 2e étage

Montréal, Qc, H1T 2M4

Canada

Tel: 514-252-3562      Mobile: 514-943-0868      Fax: 514-252-3569

E-mail: [puttaswamy.manjunath@umontreal.ca](mailto:puttaswamy.manjunath@umontreal.ca)

Web sites:

<http://recherche.maisonneuve-rosemont.org/fr-ca/la-recherche/nos-chercheurs/manjunath-puttaswamy.html>

<http://www.biochimie.umontreal.ca/activites-de-recherche/themes-de-recherche-et-professeurs/puttaswamy-manjunath/>

<http://www.rqr.umontreal.ca/index.php/en/members/manjunath-puttaswamy>

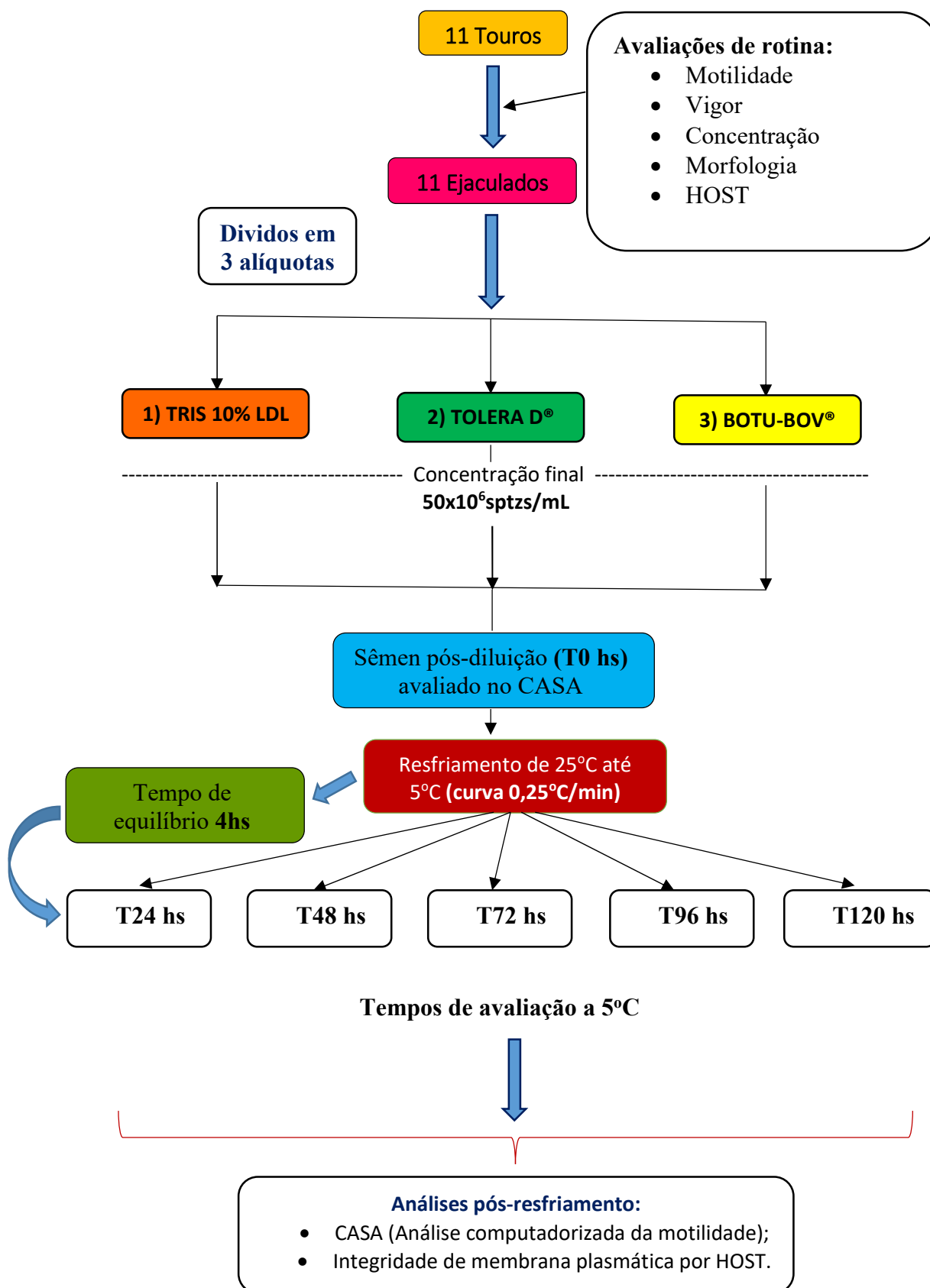
<https://www.medvet.umontreal.ca/crra/index.php/en/researchers/puttaswamy-manjunath>

ANEXO 2 – Modelo de ficha de avaliação do comportamento sexual de reprodutores bubalinos durante o condicionamento para coleta de sêmen/15 minutos.

Reprodutores Parâmetros	Data				Data				Data			
	Reprod.	Reprod.	Reprod.	Reprod.	Reprod.	Reprod.	Reprod.	Reprod.	Reprod.	Reprod.	Reprod.	Reprod.
Cheirar urina no solo												
Cheirar vulva												
Lamber vulva												
Reflexo de Flehmen												
Cocar a cabeça na fêmea												
Dar cabecada na fêmea												
Apoiar o queixo na fêmea												
Contração peniana												
Exposicao do pênis												
Monta incompleta s/exposição pênis												
Ejaculação no solo s/salto												
Ejaculação completa												
Volume (mL)												

Reprod. = Reprodutor.

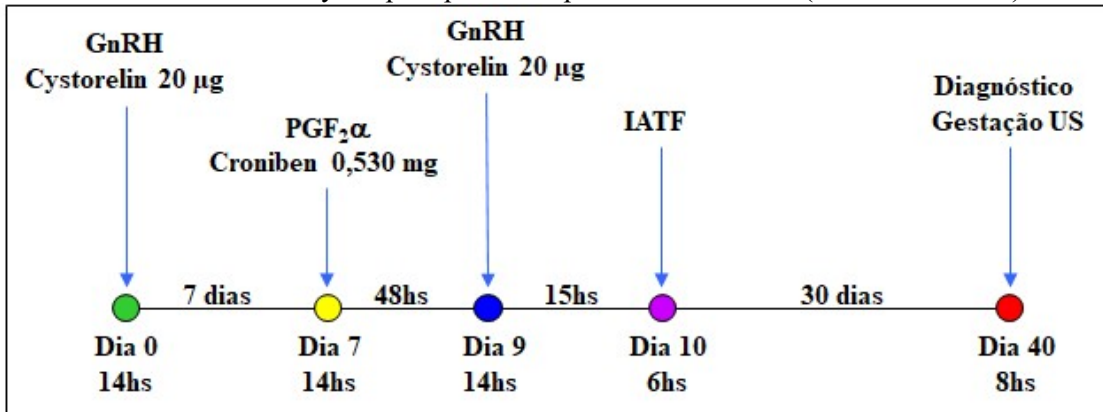
ANEXO 3 - Fluxograma do experimento com diferentes extensores (Botu-Bov<sup>®</sup>, Tolera D<sup>®</sup> e TRIS 10% LDL).



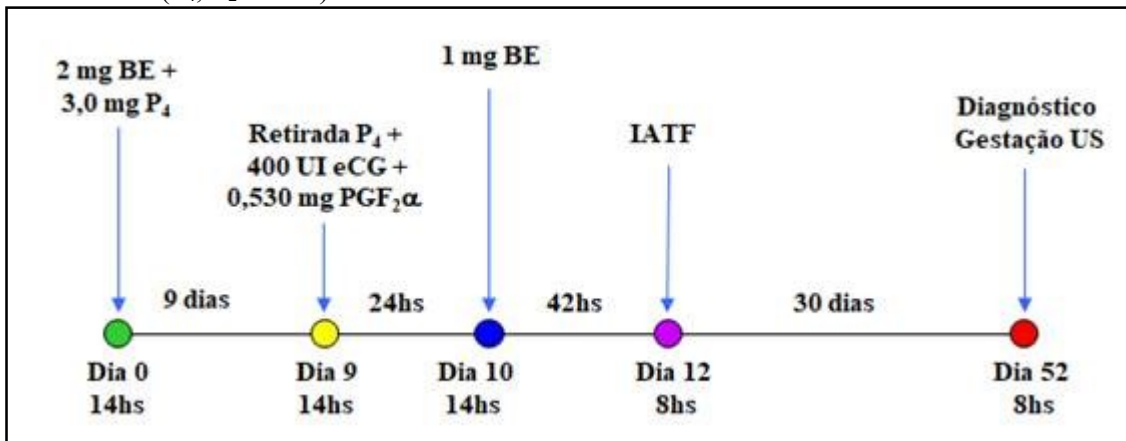
ANEXO 4 – Modelo de ficha de campo para IATF.

Ficha de controle reprodutivo Fazenda Bom Destino							Protocolo de IATF - Grupo I								
Ord.	Nº	Idade (anos)	Peso (kg)	ECC (1-5)	Dias Pós-parto	Diagnóstico 16/01/17 8:00hs	P4 + BE 16/01/17 14:00hs	Retirada P4 + eCG + PGF <sub>2</sub> α 24/01/17 14:00hs	BE 25/01/17 14:00hs	IATF 27/01/17 8:00hs	sêmen Refr. ou Cong.	Hs da IA	Touro	Diagnóstico 27/02/17	
1	33	3,7	500	4	392	Anestro	OK	OK	OK	Muco	Congelado	09:10	13	Fol. < 0,4	-
2	116	3,7	510	3	287	Anestro	OK	OK	OK	Muco	Congelado	08:55	13	Fol. < 0,2	+
3	139	4,7	430	3	247	Anestro	OK	OK	OK	Muco	Congelado	09:54	13	Fol. > 0,5	-
4	156	4,7	710	4	97	Anestro	OK	OK	OK	Muco	Congelado	08:44	13	Fol. < 0,4	-
5	198	8,7	630	4	141	Anestro	OK	OK	OK	Muco	Resfriado	10:20	13	Fol. > 0,5	-
6	223	3,7	510	4	238	Anestro	OK	OK	OK	-	Congelado	10:18	13	Fol. > 0,2	-
7	225	3,7	480	4	280	Anestro	OK	OK	OK	Muco	Congelado	08:26	13	Fol. < 0,4	-
8	280	6,7	490	3	317	Anestro	OK	OK	OK	-	Resfriado	09:28	13	Fol. > 0,5	-
9	343	3,7	480	3	300	Anestro	OK	OK	OK	Muco	Congelado	08:13	13	Fol. > 0,5	+
10	389	4,7	590	4	321	Anestro	OK	OK	OK	-	Resfriado	10:01	13	Fol. < 0,4	-
11	498	3,7	630	4	353	Anestro	OK	OK	OK	Muco	Congelado	09:34	13	Fol. > 0,5	-
12	514	3,7	520	4	357	Anestro	OK	OK	OK	Muco	Resfriado	09:51	13	Fol. > 0,5	+
13	601	3,7	460	3	269	Anestro	OK	OK	OK	-	Resfriado	09:03	13	Fol. < 0,4	-
14	668	3,7	590	4	252	Anestro	OK	OK	OK	Muco	Resfriado	08:38	13	Fol. > 0,6	-
15	732	3,7	750	4	317	Anestro	OK	OK	OK	Muco	Resfriado	08:49	13	Fol. > 0,8	-
15															
16															
17															
18															
19															
20															
21															
22															
23															
24															
25															
26															
27															
28															
29															
30															
31															

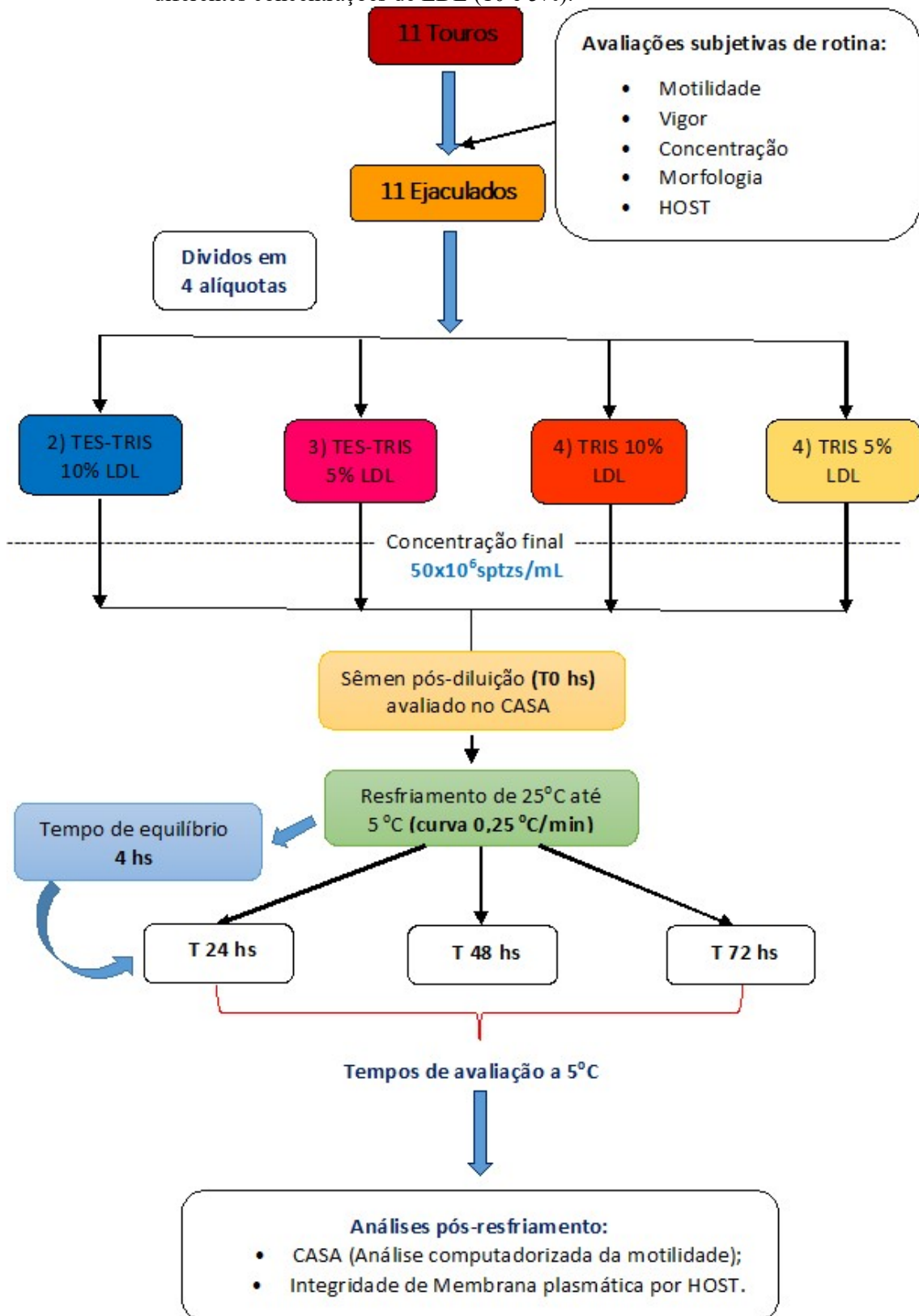
ANEXO 5 - Protocolo Ovsynch para período reprodutivo favorável (outono e inverno).



ANEXO 6 - Protocolo de IATF para período reprodutivo desfavorável (primavera e verão) com (P<sub>4</sub>, E<sub>2</sub> e eCG).

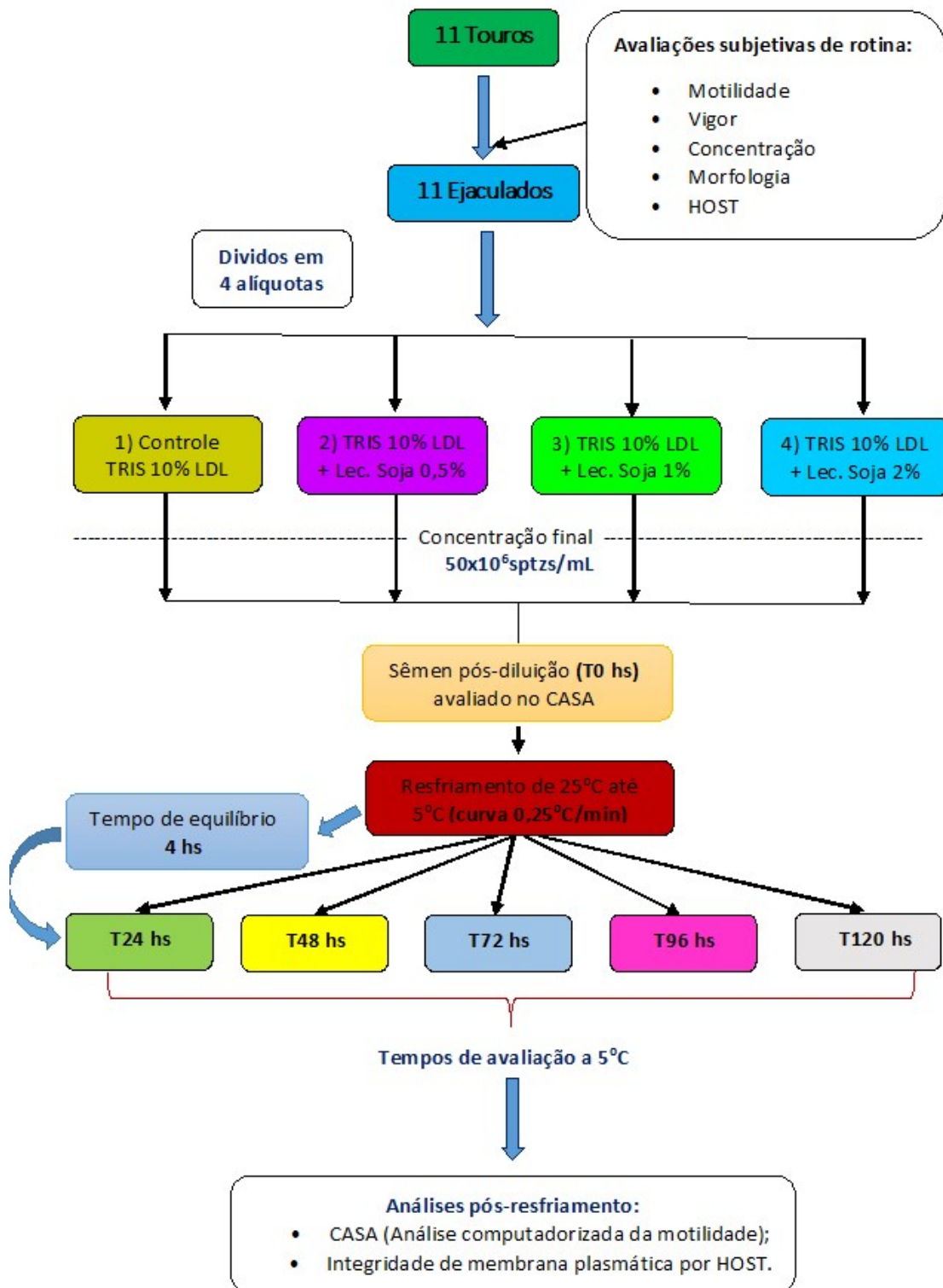


ANEXO 7 - Fluxograma do experimento com diferentes extensores (TES-TRIS e TRIS) em diferentes concentrações de LDL (10 e 5%).

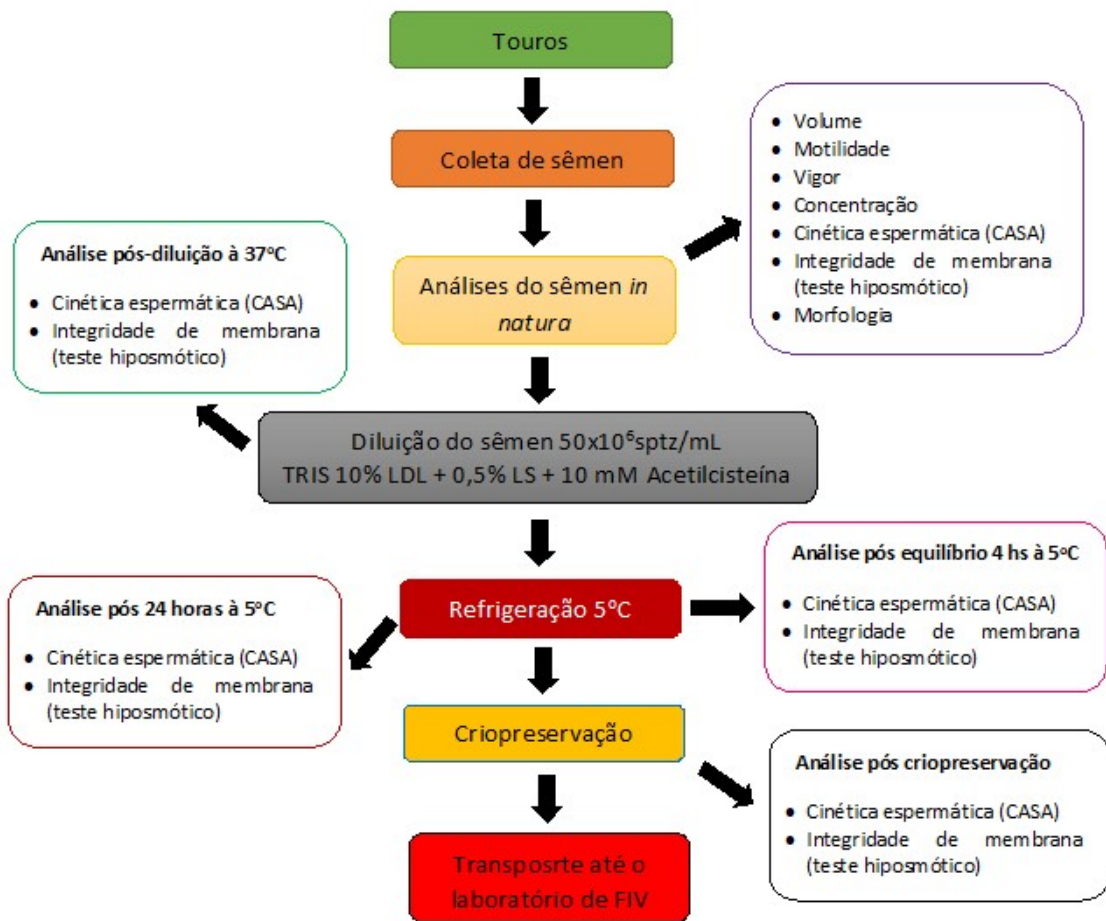




ANEXO 8 - Fluxograma do experimento com extensor TRIS 10% LDL e diferentes concentrações de lecitina de soja.



ANEXO 9 - Delineamento de coleta e processamento do sêmen e coleta e processamento de oócitos para FIV de búfalos.



ANEXO 10 - Delineamento de coleta e processamento de oócitos para PIVE de búfalos.

