



Universidade Federal Do Pará
Núcleo de ciências agrárias e desenvolvimento rural
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária–Amazônia Oriental
Universidade Federal Rural da Amazônia
Programa de pós-graduação em ciência animal

Michel Yoshio Almeida Miyasaki

Comparação entre o TRIS, Lactose/TRIS, Ringer-Lactato e Leite Desnatado como diluidores na criopreservação do sêmen bubalino.

Belém
2012

Michel Yoshio Almeida Miyasaki

Comparação entre o TRIS, Lactose/TRIS, Ringer-Lactato e Leite Desnatado como diluidores na criopreservação do sêmen bubalino.

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal. Programa de Pós-graduação em Ciência Animal. Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural Universidade Federal do Pará. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Amazônia Oriental. Universidade Federal Rural da Amazônia.

Área de concentração: Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. William Gomes Vale

**Belém
2012**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) –
Biblioteca Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural / UFPA, Belém-PA

Miyasaki, Michel Yoshio Almeida

Comparação entre o TRIS, Lactose/TRIS, Ringer-Lactato e Leite Desnatado como diluidores na criopreservação do sêmen bubalino / Michel Yoshio Almeida Miyasaki: orientador, William Gomes Vale, Belém, PA, 2011.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Pará, Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2011.

1. Búfalo. 2. Búfalo - Reprodução. 3. Criopreservação de órgãos, tecidos, etc.. 4. Sêmen. I. Título.

CDD – 22.ed. 636.293

Michel Yoshio Almeida Miyasaki

**COMPARAÇÃO ENTRE O TRIS, LACTOSE/TRIS, RINGER-LACTATO E
LEITE DESNATADO COMO DILUIDORES NA CRIOPRESERVAÇÃO DO
SÊMEN BUBALINO.**

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal. Programa de Pós-graduação em Ciência Animal. Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural Universidade Federal do Pará. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Amazônia Oriental. Universidade Federal Rural da Amazônia.
Área de concentração: Produção Animal.

Data: Belém-PA: 29 de fevereiro de 2012

Banca Examinadora:

Prof. Dr. William Gomes Vale
Universidade Federal do Oeste do Pará
Orientador e Presidente

Prof. Dr. Haroldo Francisco Lobato Ribeiro
Universidade Federal Rural da Amazônia
Examinador Titular

Prof. Dr. Luiz Fernando de Souza
Rodrigues
Universidade Federal Rural da Amazônia
Examinador Titular

A Deus e minha família,
em especial, Katia Almeida (Mãe) e
Lindalva Almeida (Avó) por
toda força, amor e apoio em
todos os sentidos.
Dedico!

AGRADECIMENTOS

À Deus a fonte do meu viver, sua graça maravilhosa, sua força, e seu querer em minha vida, confiando em mim tornando-me capaz desta missão, da qual saio fortalecida em meu espírito, em função do caráter desafiador e disciplinador da árdua e trabalhosa tarefa de conclusão desta obra acadêmica;

Agradeço a minha querida família. Aos meus pais (Takio e Kátia), Keilinha e ao meu grande exemplo, vó Lindalva Almeida, por seu amor, ajuda e compreensão! Meus irmãos Marcelo Takio, Marcos Seichy, Jéssica Akemy, Gabriel e cunhada Edilene Miyasaki. São tudo em minha vida! Os amo e agradeço, pois esta etapa é vencida com o apoio de vocês!

Ao Prof. William Gomes Vale, meu orientador, pela orientação, apoio, conselhos, pelos valiosos ensinamentos e principalmente pela amizade e agradável convívio durante essa caminhada. E ao co-orientador Dr. Haroldo Francisco Lobato Ribeiro, por estar sempre pronto a nos ajudar em momentos de maiores dificuldades;

À Fazenda Pacú (Dona Marlene, Ronaldo França, Mario França e família) pela disponibilização dos animais, espaço físico e grande amizade. Aos funcionários da Fazenda Pacú (Shimba, Cláudia, “Tchula”, Ismael e demais...), pelo dia-a-dia, pelo auxílio constante e disposição para a realização deste trabalho. Ao estagiário e amigo Mario Uribe, pela contribuição direta na realização do experimento com grande colaboração durante as etapas de colheita e criopreservação do sêmen;

Ao Dr. Humberto Hamad (UFOPA), pelo grande apoio nas análises estatísticas dos dados deste experimento;

Ao Laboratório de pesquisa em caprinos e ovinos (CPCOP/UFRA-Belém), na pessoa do prof. Dr. Luiz Fernando de Souza Rodrigues, por disponibilizar espaço e equipamentos para a leitura de materiais do experimento e por compor parte da banca examinadora de defesa desta tese;

À Universidade Federal do Pará, Universidade Federal Rural da Amazônia e à Embrapa Amazônia Oriental, que através do Curso de Pós-graduação em Ciência Animal me proporcionou grande crescimento profissional;

Aos grandes amigos Fábio André Campos e Marcela Videira, primeiramente pela amizade, pela sua grande ajuda, apoio e incentivo durante toda minha jornada. E aos demais: Kelly Gonçalves, Carla Carvalho, Renata Bastos, Samuel Vidal, Larissa Seixas, Daniel Santos, Andréia Silva, Jonathan Palmer, Tamiris Sousa, Adriel Arruda e Neto Rodrigues pela grande amizade e companheirismos;

A todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho, mas que, injustamente, por um lapso de memória não foram citados;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro com bolsa de estudo, nível mestrado.

RESUMO

O objetivo do experimento foi testar a eficácia de diferentes diluidores, a base de Ringer-Lactato, Leite Desnatado, TRIS (hidroxi-metil-amino-methan) e Lactose/TRIS, na criopreservação de sêmen bubalino. Foram utilizados três machos bubalinos da raça Murrah em plena atividade sexual. O sêmen foi colhido por vagina artificial totalizando 71 ejaculados. Após a colheita, cada amostra foi submetida às análises qualitativas e quantitativas do sêmen. Os ejaculados foram fracionados e diluídos nos quatro diluidores. O sêmen diluído foi envasado em palhetas de 0,25ml e submetidos a um tempo de equilíbrio de até quatro horas a 5°C, com posterior congelação em nitrogênio líquido. As amostras identificadas foram descongeladas em banho maria à temperatura de 40°C por 30 segundos e seqüencialmente avaliadas quanto a motilidade, vigor, lesão de acrossoma, e percentual de patologias espermáticas. As amostras também foram submetidas ao teste de termo-resistência, permanecendo incubadas à temperatura de 40°C durante 30 segundos, 3-5 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas e 3 horas, onde foram avaliadas quanto a motilidade e o vigor espermático. As características físico-químicas, após análise do sêmen *in natura*, encontraram-se dentro dos valores preconizados para a espécie bubalina e satisfatórios para o processo de congelação. Após descongelação do sêmen, observou redução numérica estatística ($p < 0,05$) na motilidade espermática, sendo que no sêmen *in natura* se observou $86,67 \pm 6,17\%$ reduzindo para $70 \pm 6,92\%$ em TRIS, $67,4 \pm 8,01\%$ em Ringer/lactato, $67,09 \pm 9,03\%$ em Lactose/TRIS e $59,7 \pm 9,05\%$ em leite desnatado e ao comparar entre os quatro tratamentos apenas o Leite desnatado mostrou diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Após descongelação, o vigor espermático também diminuiu estatisticamente ($p < 0,05$) nos quatro tratamentos ($3,50 \pm 0,53$ TRIS; $3,38 \pm 0,49$ Ringer-lactato; $3,3 \pm 0,46$ Lactose/TRIS e $3,25 \pm 0,44$ Leite desnatado) *versus* ($4 \pm 0,39$ sêmen *in natura*) e ao comparar entre os tratamento, apenas entre Leite desnatado e TRIS se observou diferença estatística ($p < 0,05$). Quanto aos defeitos maiores ($4,15 \pm 1,9\%$ sêmen *in natura*; $10,51 \pm 4,4\%$ TRIS; $11,94 \pm 4,2\%$ Ringer-Lactato; $11,88 \pm 4,8\%$ Lactose/TRIS; $12,01 \pm 5\%$ Leite desnatado), menores ($3,81 \pm 1,2\%$ sêmen *in natura*; $4,67 \pm 1,1\%$ TRIS; $4,98 \pm 1,7\%$ Ringer-Lactato; $4,93 \pm 2,0\%$ Lactose/TRIS; $4,93 \pm 2,0\%$ Leite desnatado) e totais ($7,91 \pm 2,1\%$ sêmen *in natura*; $15,18 \pm 4,7\%$ TRIS; $16,92 \pm 4,8\%$ Ringer-Lactato; $16,82 \pm 5,6\%$ Lactose/TRIS; $17,11 \pm 5,6\%$ Leite desnatado), após descongelação houve aumento significativo dos defeitos nos quatro tratamentos ($p < 0,05$), e entre eles não foram observadas diferenças estatísticas entre si ($p > 0,05$). Na fase pós-TTR, após 3 horas de incubação, a motilidade progressiva (TRIS $21,13 \pm 7,5\%$; Ringer-Lactato $20,78 \pm 7,4\%$; Lactose/TRIS $20,25 \pm 5,3\%$; Leite desnatado $20,12 \pm 6,6\%$) e vigor espermático (TRIS $2,04 \pm 0,5$; Ringer-Lactato $2,07 \pm 0,5$; Lactose/TRIS $2,02 \pm 0,4$; Leite desnatado $2,00 \pm 0,5$) não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos ($p < 0,05$). Quanto a intergridade do acrossoma, após a descongelação (Sêmen *in natura* $97,85 \pm 0,6\%$; TRIS $91,65 \pm 4,3\%$; Ringer-Lactato $90,46 \pm 4,8\%$; Lactose/TRIS $89,76 \pm 5,4\%$; Leite desnatado $90,56 \pm 5,6\%$), houve diminuição estatística ($p < 0,05$) e quando se comparou tal parâmetro entre os tratamentos não foi observado diferenças estatísticas significativas entre os tratamento ($p > 0,05$). Diante dos resultados observados é possível concluir que a congelação de sêmen de búfalo com os diluidores TRIS (Tris-hydroxy-methyl-amino-methan), Ringer-Lactato, Lactose/TRIS, e Leite desnatado mostraram satisfatória função de crioproteção na viabilidade espermática do sêmen nas diferentes etapas da criopreservação.

Palavras chaves: Bubalino. Congelação. Diluidores. Sêmen.

ABSTRACT

The objective of this experiment was to test the effectiveness of different extenders, the basis of Ringer Lactate, Skim Milk, TRIS (hydroxymethyl-amino-methyl Methan) and Lactose/TRIS, the cryopreservation of buffalo semen. We used three male Murrah buffaloes in full sexual activity. The semen was collected by artificial vagina total of 71 ejaculates. After harvest, each sample was subjected to qualitative and quantitative analyzes of semen. The ejaculates were split and diluted in four extenders. The diluted semen was stored in straws of 0,25 mL and subjected to an equilibration time of up to four hours at 5°C, with subsequent freezing in liquid nitrogen. The identified samples were thawed in a water bath at a temperature of 40°C for 30 seconds and subsequently evaluated for motility, vigor, acrosome damage, and percentage of sperm pathologies. The samples were also tested with heat-resistance, while remaining incubated at 40°C for 30 seconds, 3-5 minutes, 30 minutes, 1 hour, 2 hours and 3 hours, which were evaluated for motility and spermatic. The physico-chemical, after fresh semen analysis, were within the prescribed values for buffaloes and satisfactory for the freezing process. After thawing the semen, observed numerical reduction ($p < 0,05$) in sperm motility, with fresh semen was found $86,67 \pm 6,17\%$ decreasing to $70 \pm 6,92\%$ in TRIS, $67,4 \pm 8,01\%$ in Ringer/lactate, $67,09 \pm 9,03\%$ in Lactose/TRIS and $59,7 \pm 9,05\%$ in skim milk and to compare between the four treatments only the skimmed milk showed a statistically significant difference ($p < 0,05$). After thawing, spermatic vigor also decreased significantly ($p < 0,05$) in four treatments ($3,50 \pm 0,53$ TRIS, $3,38 \pm 0,49$ Ringer's lactate, $3,3 \pm 0,46$ Lactose/TRIS and $3,25 \pm 0,44$ Skim milk) versus ($4 \pm 0,39$ fresh semen) and when comparing between treatment, only between skimmed milk and TRIS was no statistical difference ($p < 0,05$). As for the larger defects ($4,15 \pm 1,9\%$ fresh semen; $10,51 \pm 4,4\%$ TRIS, $11,94 \pm 4,2\%$ Ringer's lactate, $11,88 \pm 4,8\%$ Lactose/TRIS; $12,01 \pm 5\%$ skim milk), smaller ($3,81 \pm 1,2\%$ fresh semen and $4,67 \pm 1,1\%$ TRIS, $4,98 \pm 1,7\%$ Ringer's lactate, $4,93 \pm 2,0\%$ Lactose/TRIS, $4,93 \pm 2,0\%$ skimmed milk) and total ($7,91 \pm 2,1\%$ fresh semen; $15,18 \pm 4,7\%$ TRIS, $16,92 \pm 4,8\%$ Ringer's lactate, $16,82 \pm 5,6\%$ Lactose/TRIS, $17,11 \pm 5,6\%$ skimmed milk), after thawing showed a significant increase of defects in the four treatments ($p < 0,05$), and among them were not statistically different between groups ($p > 0,05$). In the post-TTR after 3 hours of incubation, progressive motility ($21,13 \pm 7,5\%$ TRIS; Ringer lactate $20,78 \pm 7,4\%$; Lactose/TRIS $20,25 \pm 5,3\%$; Skimmed milk $20,12 \pm 6,6\%$) and spermatic vigor (TRIS $2,04 \pm 0,5$, Ringer Lactate $2,07 \pm 0,5$, Lactose/TRIS $2,02 \pm 0,4$, 2 skim milk, $2,00 \pm 0,5$) showed no statistical difference between treatments ($p < 0,05$). As for intergridade acrosome after thawing (semen in natura $97,85, \pm 0,6\%$; TRIS $91,65 \pm 4,3\%$, Ringer-Lactate $90,46 \pm 4,8\%$; Lactose/TRIS $89,76 \pm 5,4\%$; Skimmed milk $90,56 \pm 5,6\%$), decreased ($p < 0,05$) and when comparing this parameter between treatments was not observed statistically significant differences between the treatment ($p > 0,05$). Given the observed results we conclude that the freezing of buffalo semen extenders with TRIS (Tris-hydroxy-methyl-amino-Methan), Ringer Lactate, Lactose / TRIS and skimmed milk showed satisfactory function in cryoprotection of sperm viability semen in different stages of cryopreservation.

Key words: Buffalo. Freezing. Extenders. Semen.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Páginas

Figura 1	Organização da membrana plasmática.....	21
Figura 2	(A) Membrana acrossômica normal, (B) Membrana acrossômica alterada, (C) Início de desprendimento (D) Perda total da membrana acrossômica.....	41
Figura 3	(A e B) Imagem de satélite e fotografia da Central de inseminação e Reprodução de Búfalos, localizado no município de Inhaúma, estado de Minas Gerais.....	43
Figura 4	Exemplar bubalino utilizado no trabalho experimental.....	44
Figura 5	Procedimento de colheita de sêmen bubalino pelo método da vagina artificial.....	44
Figura 6	Câmara de Neubauer utilizada na contagem de espermatozóides e determinação da concentração espermática.....	45
Figura 7	Esquema ilustrativo de como determinar a concentração espermática através do uso da câmara de Neubauer.....	46
Figura 8	Imagem de microscopia óptica de espermatozóides bubalinos, corado em vermelho congo e violeta genciana, em aumento de 100x. No detalhe, espermatozóide normal (N) e espermatozóide com cauda dobrada (C.D.).....	47
Figura 9	Minitubos de 0,25 mL previamente identificados.....	49
Figura 10	Envasamento manual do sêmen em Minitubos de 0,25 mL.....	49
Figura 11	Desenho esquemático de uma caixa isotérmica com uma plataforma de nitrogênio líquido de 4cm de altura.....	49
Figura 12	Incubação das partidas de sêmen em banho maria a temperatura de 40°C.....	50

LISTA DE TABELAS

	Páginas
Tabela 1 Média \pm Desvio padrão das características físico-químicas iniciais do ejaculado (n=71) de três touros bubalinos, na fase de pré-congelação (n=71).....	52
Tabela 2 Análise comparativa da Média \pm Desvio padrão da motilidade progressiva (%) de sêmen bubalino, na fase de pré-congelação (Sêmen <i>in natura</i>) e pós-descongelação nos diluidores TRIS (hidroxi-metil-amino-methan), Ringer-Lactato, Lactose/TRIS e Leite desnatado.....	54
Tabela 3 Análise comparativa da Média \pm Desvio padrão do vigor espermático (%) de sêmen bubalino, na fase de pré-congelação (Sêmen <i>in natura</i>) e pós-descongelação nos diluidores TRIS (hidroxi-metil-amino-methan), Ringer-Lactato, Lactose/TRIS e Leite desnatado.....	56
Tabela 4 Média \pm Desvio padrão dos defeitos maiores, menores e totais (%) de sêmen bubalino, na fase de pré-congelação (Sêmen <i>in natura</i>) em comparação com a fase pós-descongelação nos diluidores TRIS (hidroxi-metil-amino-methan), Ringer-Lactato, Lactose/TRIS e Leite desnatado.....	57
Tabela 5 Média das motilidades espermáticas \pm Desvio padrão (%) pós-descongelação no Teste de termorresistência em cada um dos tempos avaliados (3-5 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas e 3 horas) entre os diluidores TRIS (hidroxi-metil-amino-methan), Ringer-Lactato, Lactose/TRIS e Leite desnatado.....	59
Tabela 6 Média do vigor \pm Desvio padrão (%) pós-descongelação no Teste de termorresistência em cada um dos tempos avaliados (3-5 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas e 3 horas) entre os diluidores TRIS (hidroxi-metil-amino-methan), Ringer-Lactato, Lactose/TRIS e Leite desnatado.....	61
Tabela 7 Média \pm Desvio padrão da Integridade de acrossoma (%) de sêmen bubalino, na fase de pré-congelação (Sêmen <i>in natura</i>) em comparação com a fase pós-descongelação nos diluidores TRIS (hidroxi-metil-amino-methan), Ringer-Lactato, Lactose/TRIS e Leite desnatado.....	61
Tabela 8 Valor monetário em reais do custo de insumos utilizados para produção de 100mL de diluidor.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP - adenosina trifosfato
BSA - Albumina Sérica Bovina
C.D.- patologia espermática denominada decauda dobrada
CIRB- Central de Inseminação e Reprodução de Búfalos
cm³ - centímetro cúbico, unidade de medida de volume
cm- centímetro, unidade de medida de comprimento
CH₃H₈O₃ - fórmula molecular do glicerol
C₆H₁₂O₆ - fórmula molecular da hexose
C₆H₈O₇- Fórmula molecular do ácido cítrico
DNA - ácido desoxirribonucléico
DMSO- dimetilsulfoxide
FAO - Food and Agriculture Organization
g - grama, unidade de medida de massa
H⁺ - íon hidrogênio
IA - inseminação artificial
IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
kg - quilograma, unidade de medida de massa
L - litro, unidade de volume
µL - microlitro, unidade de medida de volume
mg - miligrama, unidade de medida de massa
mL - mililitro, unidade de medida de volume
mM - milimol, unidade de medida de concentração
mm³ - milímetro cúbico, unidade de volume
min- minuto. Múltiplo do segundo, unidade de tempo do sistema métrico internacional.
N- espermatozóide normal
pH - potencial hidrogeniônico
P- símbolo estatístico que denota grau de significância entre as variáveis estudadas
PIB- Produto Interno Bruto
% - porcentagem, unidade de razão na base 100
R\$- Símbolo monetário composto da moeda real
S- Latitude sul
TES-TRIS - diluidor utilizado para congelação de sêmen, principalmente em bubalinos
TRIS- hidroximetil-amino-methan
TES- hidroximetil-amino-ethan
TTR- teste de termorresistência
U.I.- unidade internacional, é uma unidade de medida para a quantidade de uma substância
W-Longitude oeste

LISTA DE SÍMBOLOS

%- porcentagem

°C - grau Celsius, unidade de temperatura

/ - símbolo matemático que indica proporção

<- menor, símbolo matemático que indica valores inferiores

>- maior, símbolo matemático que indica valores superiores

±- mais ou menos, símbolo utilizado entre as unidades estatísticas de média e desvio padrão

= - igual, símbolo matemático que indica igualdade

+ - mais, símbolo matemático que indica soma / positivo

° - grau

- - menos, símbolo matemático que indica menos / negativo

(-)- substância química levógira, com a característica de fazer girar o plano da luz polarizada para o sentido contrário ao das substâncias dextrógiras.

®- marca registrada

x - vezes, símbolo matemático que indica multiplicação

10⁶- milhões

10⁹- bilhões

: - para (1:100)

mOsm- miliosmol, constituindo-se da milésima parte do osmol, que é o peso atômico dividido pelo número de partículas que exercem pressão osmótica

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 OBJETIVOS.....	15
2.1 OBJETIVO GERAL.....	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
3. 1 CRIOPRESERVAÇÃO DE CÉLULAS ESPERMÁTICAS.....	16
3. 2 PRINCIPIOS DA CRIOPRESERVAÇÃO.....	17
3. 2. 1 Diluição e envase do sêmen.....	17
3. 2. 2 Resfriamento do sêmen.....	18
3. 2. 3 Tempo de equilíbrio do sêmen.....	19
3. 2. 4 Congelação do sêmen.....	20
3.2.4.1 Membrana plasmática.....	20
3.2.4.2 Princípios da criopreservação.....	22
3. 2. 5 Descongelção.....	23
3.3 DILUENTES E CRIOPROTETORES PARA CONGELAÇÃO DE SÊMEN.....	25
3.3.1 Composição básica do meio diluente.....	25
3.3.2 Crioprotetores.....	26
3.3.2.1. Crioprotetores penetrantes.....	26
3.3.2.2. Crioprotetores não penetrantes.....	27
3.3.3 Diluidores na congelação de sêmen bubalino.....	29
3.4 TESTE DE TERMO-RESISTÊNCIA (TTR).....	39
3.5 LESÃO DE ACROSSOMA	40
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	43
4.1 LOCAL DO EXPERIMENTO.....	43
4.2 ANIMAIS E MEDIDAS DE MANEJO.....	43
4.3 COLHEITAS DO SÊMEN.....	44
4.4 AVALIAÇÃO DOS EJACULADOS.....	45
4.4.1 Determinação das características físicas do ejaculado.....	45
4.4.1.1 Volume, aspecto, pH seminal e concentração.....	45
4.4.1.2 Turbilhonamento, motilidade e vigor espermático.....	46
4.4.2 Determinação das características morfológicas dos espermatozóides.....	47

4.5 ADAPTAÇÃO TÉRMICA.....	48
4.6 PREPARO DOS DILUIDORES.....	48
4.7 ANÁLISE DE CUSTO FINANCEIRO DOS DILUIDORES.....	48
4.8 DILUIÇÃO DO SÊMEN.....	48
4.9 TEMPO DE EQUILÍBRIO.....	49
4.10 CONGELAÇÃO.....	49
4.11 AVALIÇÃO PÓS DESCONGELAÇÃO.....	50
4.12 TESTE DE TERMO RESISTÊNCIA (T.T.R.)	50
4.13 TESTE DE LESÃO DE ACROSSOMA.....	50
4.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	51
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
5.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO SÊMEN NA FASE PRÉ- CONGELAÇÃO.....	52
5.2 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO SÊMEN NA FASE PÓS- DESCONGELAÇÃO.....	53
5.2.1 Motilidade espermática.....	53
5.2.2 Vigor espermático.....	55
5.2.3 Morfologia espermática.....	57
5.2.3.1 Defeitos Menores.....	57
5.2.3.2 Defeitos Maiores.....	57
5.2.3.3 Defeitos totais.....	58
5.2.4 Teste de termorresistência.....	58
5.2.4.1 Motilidade espermática.....	58
5.2.4.2 Vigor espermático.....	60
5.2.5 Integridade de acrossoma.....	61
5.3 ANÁLISE DE CUSTO FINANCEIRO DOS DILUIDORES.....	62
6 CONCLUSÃO.....	62
REFERÊNCIAS.....	65
ANEXOS.....	79

1 INTRODUÇÃO

Segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) o contingente populacional mundial de búfalos em 2009 foi estimado em torno de 188 milhões de cabeças (FAO, 2009), das quais mais de 80% estão localizadas na Índia, China e Paquistão (DIXIT; SIKKA, 2009).

No Brasil, a bubalinocultura se destaca, sendo que em 2009 o efetivo total de búfalos no Brasil totalizou 1.160.000 cabeças, sendo que o maior percentual efetivo desta espécie se localiza na região Norte com 62,8%. O Estado do Pará apresenta o maior contingente da região Norte, com um efetivo de 442.405 cabeças em 2008, o que corresponde a 38,57% do total nacional (VALE, 2008; IBGE, 2009), cuja criação, abate, transformação, comercialização de produtos (carne, couro, leite e derivados), turismo rural, tem contribuindo para o crescimento do agronegócio regional e para o Produto Interno Bruto (PIB) do Estado (CASTRO, 2010).

A expansão da exploração de bubalinos com aptidão leiteira no Brasil teve início a partir da década de 90, obtendo um crescimento estimado de 15% em 2009, reflexo do grande interesse pela exploração do potencial da espécie (ABCB, 2011).

Em função deste crescente interesse pela bubalinocultura, se faz premente a necessidade de aumentar as características qualitativas da espécie, já que assim o crescimento do rebanho estará associado ao controle da produtividade, possibilitando a identificação de animais que apresentem méritos genéticos, sua multiplicação e distribuição, a partir do auxílio das biotecnologias da reprodução (VALE, 1994; RODRIGUES, 2007).

O desenvolvimento de técnicas adequadas para a criopreservação de sêmen em bubalinos representa um passo importante no avanço da reprodução animal, já que possibilita um aumento na eficiência produtiva dos rebanhos, especialmente devido ao uso em maior escala de animais geneticamente superiores, que vem sendo conseguido através da aplicação de biotécnicas, cada vez mais modernas (PAPA et al., 2002).

Segundo Crowe et al. (1987), Liu et al. (1998), Guthrie et al. (2002) e Siddique et al. (2006) no que concerne a criopreservação de sêmen muitos são os fatores as quais podem afetar a sobrevivência dos espermatozóides e a fertilidade do sêmen congelado, dentre os quais incluem-se a composição dos meios e os crioprotetores usados para congelamento. Logo, a escolha de um diluidor ideal, deve estar baseada na capacidade

deste em manter as funções celulares espermáticas durante o processo de congelação e descongelação.

Segundo Vale (1994, 2008), os seguintes diluidores tem sido bastante utilizados na criopreservação do sêmen bubalino: TRIS (hidroxi-metil-amino-methan), TES (Tris-hidroxi-metil-amino-ethan), Citrato-Gema, Leite-Citrato, Ácido Cítrico-Soro, Lactose, Leite desnatado, Soro de Leite e Água de Coco. Segundo Nahúm (2000), alguns destes possuem eficiência comprovada, porém de alto custo e difícil aquisição, encarecendo o processo de criopreservação, e nem sempre mostrando uma relação custo benefício favorável.

Levando em consideração as várias interações que ocorrem no processo de criopreservação de espermatozóides na espécie bubalina, esta deve ter suas técnicas aprimoradas, a partir da adoção de critérios de viabilidade espermáticas aceitáveis que sejam condizentes com os padrões normais de fertilidade (VALE, 2002).

Na última década houve maior interesse na inseminação artificial (IA), com destaque para a IA em tempo fixo e na criopreservação do sêmen na espécie bubalina. A exemplo, a solução de Ringer-Lactato já foi comprovada como bom diluidor de sêmen bubalino em experimento desenvolvido por Silva et al. (2002a), e foi constituído como alternativa econômica na criopreservação de sêmen para a espécie. Comparativamente, o custo do diluente Ringer-Lactato, é de 3 dólares/L contra 25 do TES (Tris-hidroxi-metil-amino-ethan, Laboratório Merk, Germany), representando uma redução de custo de aproximadamente 12% por dose produzida com o uso de Ringer-Lactato em comparação ao TES.

Assim, é de fundamental importância a busca de diferentes diluidores a fim de garantir a preservação eficiente das células garantindo boa habilidade de fertilização, estabelecendo-se alternativas mais práticas e econômicas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Comparar diferentes diluidores no processo de criopreservação de sêmen bubalino que venham garantir adequada preservação espermática, que possam servir como alternativas mais práticas e econômicas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar turbilhonamento, motilidade, vigor espermático, pH, patologias e integridade de acrossoma de espermatozoides na fase de pré-congelação;

Avaliar os parâmetros motilidade espermática, vigor espermático, patologias e integridade de acrossoma com diluidores a base de Ringer-Lactato, Leite desnatado, TRIS (hidroxi-metil-amino-methan) e Lactose/TRIS na fase de pré-congelação;

Comparar os parâmetros motilidade, vigor espermático, patologias e integridade de acrossoma nas fases de pré-congelação e pós-congelação com diluidores a base de Ringer-Lactato, Leite desnatado, TRIS (hidroxi-metil-amino-methan) e Lactose/TRIS;

Comparar motilidade e vigor espermático pelo teste de termo-resistência (TTR) do diluidor padrão TRIS (hidroxi-metil-amino-methan) aos demais diluidores: Ringer-Lactato, Leite Desnatado e Lactose/TRIS, após 30 dias do sêmen estar contido em botijão criogênico, nas etapas 3-5', 1 hora, 2 horas e 3 horas, pós-congelação;

Avaliar a relação custo-benefício dos diluidores a base de Ringer-Lactato, Leite desnatado, TRIS (hidroxi-metil-amino-methan) e Lactose/TRIS.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 CRIOPRESERVAÇÃO DE CÉLULAS ESPERMÁTICAS

As pesquisas com criopreservação de sêmen bubalino foram iniciadas na Índia, na década de 50, por Bhattacharya e Srivastava (1955). Sendo que os primeiros a obter sucessos com a congelação de sêmen bubalino foi Roy et al. (1956) e Basirov (1964) que foi o primeiro a publicar uma gestação a partir da congelação e descongelação de sêmen bubalino. Desde então, a IA foi aprovada em bubalinos, porém, permaneceu impopular em função de baixas taxas de fertilidade com sêmen descongelado (SHUKLA; MISRA, 2007). Sendo que após a realização de um seminário sobre Reprodução e IA realizado na Índia no ano de 1979, organizado pela FAO e pelo governo Sueco em Karnal, começaram a se obter resultados satisfatórios sobre as taxas de concepção, que segundo Vale (2008) estes resultados precisavam ser superiores a 65%.

No Brasil, as primeiras inseminações em bubalinos foram desenvolvidas no arquipélago do Marajó, que resultaram no nascimento de quatro bezerros no ano de 1982, pouco tempo após o início dos estudos sobre processamento tecnológico de sêmen de búfalos no Brasil, desenvolvidos por Vale e colaboradores na região amazônica (RIBEIRO et al., 1994).

A criopreservação é um método não-fisiológico, que envolve elevado grau de adaptação das células biológicas aos choques térmicos e osmóticos, durante os processos de diluição, resfriamento, congelação e descongelação (WATSON et al., 1992; HOLT 2000), tendo por objetivo preservar as células espermáticas por um longo período, já que, segundo Amman e Graham (1993), o resfriamento e a congelação do sêmen reduzem o metabolismo espermático, diminuindo desta forma a produção de catabólitos e a peroxidação de lipídeos da membrana espermática, aumentando assim a vida útil dessas células.

No entanto, tais processos também podem produzir danos aos espermatozóides, por gerarem estresses físicos ou químicos, tanto nas membranas dos espermatozóides, quanto no núcleo. Estes procedimentos ocasionam danos celulares devido a mudança na temperatura, formação de cristais de gelo, estresse osmótico, alterações na membrana do espermatozóide, injúrias oxidativas, lesões no DNA, toxicidade dos crioprotetores (WATSON, 1995; WATSON, 2000; BALL; VO, 2001; GARNER et al., 2001; BLESBOIS, 2007).

Geralmente, é aceito que com o processo de criopreservação haja uma redução de mais de 50% da viabilidade espermática (WATSON, 1979). Oba et al. (1993) relatam que entre 32,5 a 58,8% dos espermatozóides bubalinos tornam-se inviáveis após processo de congelamento e descongelamento.

Segundo Andrabi (2009), tais danos acarretam consequências cruciais a viabilidade celular e na sua capacidade fecundante. De acordo com Medeiros et al. (2002a) o sucesso da criopreservação do sêmen dependerá da manutenção do potencial fertilizante dos espermatozóides, devendo estes apresentarem integridade e funcionalidade das suas diferentes estruturas celulares

Descreveram Amann e Pickett (1987) os passos para a criopreservação do sêmen: diluição, resfriamento, congelamento, armazenamento e descongelamento. Segundo Yoshida (2000), a preservação das estruturas espermáticas após congelamento é obtida a partir de interações entre diluidor, crioprotetor, taxas de resfriamento, congelamento e descongelamento, com o intuito de se minimizar os danos causados pelo choque frio, formação de cristais de gelo e desidratação celular

3.2 PRINCIPIOS DA CRIOPRESERVAÇÃO

3.2.1 Diluição e envase do sêmen

O sucesso da criopreservação de sêmen também é dependente da taxa de diluição. A “*priori*” este processo foi pensado para a proteção dos espermatozóides durante o resfriamento, congelamento e descongelamento, mas seus benefícios também proporcionaram aplicações técnicas, como possibilidades de se obter maior número de vacas inseminadas com um mesmo ejaculado (SALAMON; MAXWELL, 2000).

Segundo Vale (2008) após colheita do sêmen, este deve ser imediatamente pré-diluído com o diluente, misturando lentamente com o auxílio de uma pipeta, tendo o cuidado de tanto o sêmen quanto o diluente estarem a temperatura de 37°C, assim, é importante ambos estarem submersos em banho maria à mesma temperatura.

Taxas de diluição de 1:1 e 1:12 tem sido utilizadas com sucesso para sêmen bubalino (ANDRABI, 2009). Segundo Purdy (2006), melhores taxas de diluição tem sido preconizadas baseado-se na concentração de espermatozóides por ejaculado. Em estudo sobre o efeito da redução do número de espermatozóides por dose inseminantes sobre a fertilidade de sêmen bubalino criopreservado, Andrabi et al. (2006), observaram amostras congeladas com fertilidade aceitáveis, variando de 30×10^6 a 120×10^6 células

por mL. Ao final da diluição, deve-se proceder a avaliação da motilidade e vigor, antes do envase (VALE, 2008). As Mini palhetas (0,25 mL) são geralmente as mais utilizadas devido à sua relação custo/benefício e otimização do espaço para o armazenamento em botijões criogênicos (SANSONE et al., 2000).

Haranath et al. (1990) trabalhando com sêmen bubalino observaram em palhetas de 0,25 e 0,5 mL, motilidades pós-descongelamento de $56,4 \pm 0,86$ e $55,64 \pm 0,86\%$, respectivamente. Observaram também melhora na taxa de concepção para o sêmen envasado e congelado em mini palhetas de 52,7%, quando comparada a palhetas média de 0,5 ml com taxas de concepção de 50,4%.

3.2.2 Resfriamento do sêmen

Segundo Watson (2000), a curva de resfriamento é considerada o principal entrave no processo de criopreservação do sêmen.

Durante o processo de criopreservação, o sêmen bubalino primeiramente deve ser resfriado da temperatura corpórea à temperatura ambiente, ou seja, de aproximadamente de 38 a 20°C, antes da diluição final, que para Keith (1998) não costuma ocasionar danos aos espermatozoides, quando diluído em meio adequado.

Após a diluição, o sêmen deve ser resfriado lentamente a uma temperatura de aproximadamente 4 à 5°C, constituindo-se um período de adaptação dos espermatozoides ao metabolismo reduzido, com o objetivo de diminuir o potencial ao choque térmico (ANDRABI, 2009).

Watson (2000) cita que grandes mudanças em espermatozoides de bovinos ocorrem em um intervalo de 15 a 5°C. Segundo o autor, isto ocorre devido a fase de transição da membrana plasmática do estado líquido cristalino para o estado de gel (AMANN; PICKETT, 1987; GRAHAM, 1996; MEDEIROS, 2002a).

No estudo com sêmen de equinos as curvas de resfriamento rápida (queda maior que 1°C/mim), média (queda entre 1-0,3°C/mim) e lenta (queda menor que 0,3°C/mim) tem sido bastante descritas na literatura (JASKO, 1994).

Se o resfriamento for feito de maneira inadequada, ocorrem alterações físicas e químicas nas membranas celulares, sofrendo um fenômeno conhecido como choque térmico, induzindo a danos irreversíveis aos espermatozoides, 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 (GRAHAM, 1995, 1996). Alterações na fluidez e na permeabilidade da membrana plasmática também geram danos ao acrossoma pois levam à redução da atividade metabólica e ao consumo de ATP, refletindo de maneira geral na fertilidade do espermatozóide (WEITZE; PETZOLD, 1992).

Processos de resfriamento lento de sêmen bubalino também foram testados por Ramakrishnan e Ariff (1994), onde resfriaram a uma temperatura de 5°C por 45, 65 e 90 minutos, não observando diferenças significativas na motilidade pós-descongelação entre os diferentes tratamentos em que a variável era tempo.

Talevi et al. (1994) resfriando sêmen de búfalo de 28°C à 5°C, em 15 minutos e então, equilibrando a 5°C por 1 hora e 45 minutos (resfriamento rápido) ou resfriando em 1 hora e equilibrando por 1 hora (resfriamento lento), observaram que a motilidade espermática pós-descongelação foi significativamente maior no resfriamento lento quando comparado ao resfriamento rápido. Por outro lado, a taxa de resfriamento não teve efeito significativo sobre a integridade do acrossoma.

Dhami e Sahni (1994) refrigerando o sêmen de búfalos de 30 a 5°C em 60 e 120 minutos, obteve melhores resultados com 120 minutos.

Segundo Graham (1996) e Sansone et al. (2000), um processo de resfriamento lento obtendo 0,2-0,4°C/minuto seria o mais recomendado ao longo de um processo de congelação de sêmen de búfalos, minimizando assim, os efeito deletérios durante a taxa de resfriamento entre as temperaturas de 19 a 8°C.

3.2.3 Tempo de equilíbrio do sêmen

O tempo de equilíbrio é o tempo no qual o espermatozóide permanece à temperatura de 4-5°C permanecendo em contato com o crioprotetor antes da congelação (WIGGIN; ALMQUIST, 1974). Nesta fase, o crioprotetor penetra nas células espermáticas estabelecendo concentrações equilibradas intra e extracelular (SALAMON; MAXWELL, 2000). Esse tempo é necessário para que os espermatozoides interajam com os constituintes do meio (gema de ovo e crioprotetores) e esses adquiram máxima resistência aos danos causados à célula espermática pelo processo de criopreservação (BOUCHARD et al., 1990; ENGLAND, 1993).

Tuli et al. (1981) avaliando o tempo de equilíbrio de sêmen bubalino diluído em TRIS e ácido cítrico para 2, 4 e 6 horas, observaram que a sobrevivência pós-congelação foi superior para o tempo de equilíbrio de quatro horas em detrimento ao de

duas e seis horas. Já Dhami e Kodagali (1990) e Talevi et al. (1994) sugeriram que esse tempo deve compreender seis horas de equilíbrio. Por outro lado, Singh et al. (1989), Dhami e Sahni (1994) e Del Sorbo et al. (1995), sugeriram que esse tempo pode compreender entre 2 a 4 horas.

3.2.4 Congelação do sêmen

3.2.4.1 Membrana plasmática

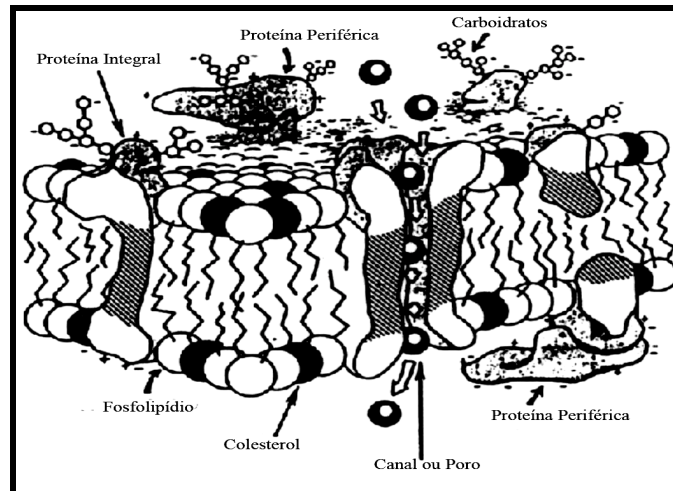
As membranas espermáticas seguem o modelo clássico de membrana plasmática (WATSON, 1981, 1995). Desta forma, a membrana plasmática dos espermatozoides de mamíferos se apresenta organizada em domínios regionais bem delineados que diferem em composição e função (WOLFE et al., 1998). Essa integridade estrutural da membrana é determinada pela temperatura e pela solução na qual ela está banhada (COOPER, 1996; GRAHAM, 1995).

Sendo que tal membrana engloba todas as estruturas do espermatozoide, mantendo a diferenças entre o citosol e o ambiente extracelular. Sendo composta de moléculas lipídicas e protéicas, unidas principalmente por ligações não-covalentes (ALBERTS et al., 2004).

A porção extracelular das proteínas da membrana plasmática são recobertas por carboidratos que estão presentes na superfície celular, sendo, esta estrutura, conhecida como glicocálice, a qual tem a função de proteger a superfície celular, além de servir de marcador para uma grande variedade de interações celulares (Figura 1) (COOPER, 1996).

Tais proteínas de membrana são entremeadas por uma dupla camada lipídica, sendo que os principais componentes são os fosfolipídios (colina, serina, glicerol e inositol), que são os elementos estruturais fundamentais das membranas dos espermatozoides; glicolipídios e colesterol (Figura 1) (WATSON, 1981; COOPER, 1996).

Figura 1. Organização da membrana plasmática



Fonte: (ZAFIAN, 1984).

Essa quantidade de colesterol tem grande influência sobre índices de capacitação espermática, quanto também a afetar a fertilidade e a capacidade do ejaculado em suportar o resfriamento e a congelação do sêmen (AMMAN; GRAHAM, 1993)

Essas camadas com moléculas lipídicas possuem uma extremidade hidrofílica ou polar, voltada para o meio externo e uma extremidade hidrofóbica ou apolar, voltada para o meio interno (SQUIRES et al., 1999).

A membrana plasmática dos espermatozoides não é estática, haja vista que em sua maioria todos os componentes encontram-se dispostos aleatoriamente e são livres para movimentarem-se lateralmente, visto que a membrana é fluída a temperatura ambiente, denominado estado líquido-cristalino (PARKS; GRAHAM, 1992; SQUIRES et al., 1999).

Estas membranas plasmáticas podem ser alteradas com a utilização de técnicas de preservação de sêmen. Em situações de resfriamento do sêmen ocorre uma reorientação dos lipídios, podendo afetar a estabilidade da membrana ou induzir a um rearranjo das moléculas, fase essa denominada de Hexagonal II, e assim formando pontos de fragilidade promovendo permeabilidade excessiva ou até mesmo ruptura da membrana plasmática. Sendo uma fase que pode ser transitória ou até mesmo persistir irreversivelmente mesmo após o aquecimento (PARKS; GRAHAM, 1992).

Nestas situações de resfriamento também podem ocorrer uma produção ineficiente de Adenosina Trifosfato (ATP) pelas células, promovendo diversas alterações no metabolismo espermático, principalmente a abertura dos canais de cálcio

seguido de hidrólise dos fosfolipídios danificando e aumentando a permeabilidade da membrana plasmática do espermatozóide (AMANN; PICKETT, 1987).

3.2.4.2 Princípios da criopreservação

Na criopreservação, quando os espermatozóides chegam a uma temperatura de 19 a 5°C, a membrana plasmática passa por uma fase de transição, do estado líquido cristalino para o de gel, podendo ocorrer perda de movimentos progressivos, alterações nas membranas plasmática e acrossomal, sendo o primeiro desafio para estas células, que pode ser transitório ou irreversível (PARKS; GRAHAM, 1992; WATSON, 1995).

Quando a temperatura atinge entre -5°C e -10°C, a água pura no meio extracelular se transforma em cristais de gelo, e como o meio intra-celular está protegida 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. E a concentração de soluto na fração descongelada aumenta, enquanto a membrana plasmática impede formação de cristais de gelo intracelular (GRAHAM, 1996).

Nestas temperaturas, a curva de congelação 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 (SQUIRES et al, 1999).

De -6°C a -15°C, a água no meio começa a cristalizar e a concentração de soluto na fração descongelada aumenta, enquanto a membrana plasmática impede formação de cristais de gelo intracelular (GRAHAM, 1996).

Como a água super resfriada no interior da célula tem maior pressão de vapor que o gelo, a célula perde água até atingir o equilíbrio. E assim, a água do interior da célula flui por osmose para o meio externo e também se congela. Os outros elementos do meio extracelular (sais, proteínas e gorduras), permanecem na porção não congelada (HOLT, 2000). Como resultado dessa desidratação, de acordo com Mazur (1990) e Meyers (2005), ocorre a concentração intracelular de soluto e diminuição do tamanho da célula

Segundo Squires et al. (1999) a perda de água e a desidratação são eventos desejáveis, reduzindo a probabilidade da formação de grandes cristais de gelo dentro da célula que causam danos às estruturas internas e/ou a membrana plasmática.

Ao passo que a temperatura diminui, mais moléculas de água se cristalizam, resultando em uma concentração maior de solutos na fração não congelada, que formarão os “canais não congelados”. O volume destes canais é importante, pois somente as células que estiverem neles irão sobreviver a criopreservação. Assim, os crioprotetores são adicionados ao meio diluidor para reduzir o ponto de congelação e proteger as estruturas espermáticas durante a congelação e descongelação (AMAN; PICKETT, 1987).

O processo de congelação se dá após o tempo de equilíbrio, onde o sêmen envasado é congelado em nitrogênio líquido. E pode ser feito quando as células alcançam a temperatura crítica (-60°C), onde os espermatozoides ficam relativamente inertes e o sêmen pode ser imerso em nitrogênio líquido, para seu armazenamento (GRAHAM, 1996).

Essa congelação em nitrogênio líquido é relativamente prática podendo ser executada a partir de uma caixa isotérmica simples, onde as palhetas ficam suspensas em posição horizontal a uma distância de 4 centímetros do nitrogênio líquido por 20 minutos, após o qual serão imersas em nitrogênio líquido a temperatura de -196°C (VALE, 2008).

3.2.5 Descongelação

O processo de descongelação é tão importante para a sobrevivência dos espermatozoides quanto a fase de congelação. Os espermatozoides que sobreviveram a congelação a -196°C ainda enfrentam o desafio de sofrerem aquecimento e descongelação, e, portanto, re-atravesar a zona de temperatura de -50 a -5°C (MARSHALL, 1984). E dependendo da curva de resfriamento (lenta, moderada e rápida) irá demandar técnicas diferentes para a descongelação (ANDRABI, 2009).

O efeito da descongelação muitas vezes irá depender se a taxa de resfriamento foi alta o suficiente para induzir a congelação intracelular, ou baixa o suficiente para produzir a desidratação celular (ANDRABI, 2009).

Se o espermatozoide for descongelado de maneira rápida, o gelo derreterá abruptamente, diluindo o soluto do meio, e assim a água fluirá rapidamente para o espermatozoide, o qual se encontra altamente concentrado, danificando-o. Nessas situações os espermatozoides possuem um período muito curto para que haja o equilíbrio intra e extracelular. Porém, a descongelação rápida muitas das vezes é

necessária a fim de se evitar a recristalização de qualquer gelo intracelular presente nos espermatozóides (SALAMON; MAXWELL, 2000).

Se o espermatozóide for congelado na curva lenta, a descongelação deverá ser executada de maneira lenta, já que assim haverá tempo suficiente para que o gelo extracelular descongele e a água reingresse diluindo o meio intracelular. (GRAHAM, 1996).

Já no caso de sêmen congelado em curvas moderadas de descongelação, o gelo extracelular descongelará de maneira lenta, diluindo gradativamente o soluto das frações de água não congeladas, o que permite que a água se difunda lentamente para dentro da célula, diluindo o soluto intracelular até atingir a concentração inicial (GRAHAM, 1996). Vale (2008) sugere que a descongelação para espécie bubalina deva ser feita em curvas moderadas de descongelação, em água por 30 segundos a 40°C.

Rao et al. (1986), testando duas taxas de descongelação (37°C por 30 segundos e 75°C por 9 segundos) na criopreservação de sêmen bubalino em diluidor a base de TRIS obteve melhor percentual de motilidade para o sêmen descongelado a 37°C por 30 segundos. Por sua vez, Dhimi et al. (1992) testando a 40°C por 60 segundos, 60°C por 15 segundos e 80°C por 5 segundos também criopreservando sêmen bubalino com diluidor a base de TRIS, chegaram a conclusão que a descongelação a 60°C por 15 segundos produziu maior motilidade espermática em comparação a outras taxas. Anos depois, Dhimi et al. (1996) testando a descongelação a 4°C por 5 minutos, 40°C por 1 minutos ou 60°C por 15 segundos, também chegaram a resultados semelhantes em que a descongelação do sêmen a 60°C por 15 segundos rendeu melhor recuperação pós-descongelação dos espermatozóides.

Baliero (1993) comparou três métodos de descongelação de sêmen de búfalos de 75°C durante 9 segundos, 40°C durante 10 segundos e 37°C durante 30 segundos, não encontrando diferença significativa na motilidade progressiva e integridade acrossômica.

Portanto, para uma partida de sêmen congelado ser liberada para uso em programas de IA, esta deve apresentar motilidade mínima de 70%, vigor 2-3, limites totais para defeitos maiores e menores aceitáveis com uma concentração de 40 milhões por dose com 30% de patologia total (VALE, 1994, 1997). Sendo que esta avaliação do sêmen ser executada da mesma forma em que foi feita quando recém colhido através da vagina artificial (VALE, 2008).

3.3 DILUENTES E CRIOPROTETORES PARA CONGELAÇÃO DE SÊMEN

3.3.1 Composição básica do meio diluente

Segundo Godim et al. (2009), a função do diluidor é manter a viabilidade das células espermáticas por alguns dias após a colheita, fornecer substratos necessários ao metabolismo dos espermatozóides, proteger o sêmen contra choque térmico, aumentar o volume do sêmen, manter o pH e inibir o crescimento bacteriano, sendo que para isso são necessários a presença de alguns componentes básicos como: fontes energéticas para o espermatozóide, estabilizador do pH no meio (LINDE-FORSBERG, 1991; ENGLAND, 1993), substâncias iônicas e não iônicas que mantenham a osmolaridade, enzimas, antibióticos e tampões como o citrato de sódio, que previnem alterações de pH à medida que se acumulam resíduos metabólicos; lipoproteínas ou material de alto peso molecular que previnam o choque frio, como a gema de ovo ou leite, glicerol e o propanediol, ou dimetilsulfoxide (DMSO) como agentes crioprotetores intracelular (VISHWANATH; SHANNON, 2000).

O TRIS constitui-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 diluente, atuando como tampão bipolar em pH entre 7 e 9 (McPHAIL; GOODMAN, 1984), difundindo facilmente através de espaços intracelulares (KALLET et al., 2000), uma vez que a atividade metabólica do espermatozóide 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 (ENGLAND, 1993).

Conhecido também pela sua propriedade de não inibir diversos sistemas enzimáticos e habilidade de reduzir o metabolismo da frutose contribuindo para a preservação da energia das células espermáticas (SILVA, 2005).

Para o preparo dos diluentes, usualmente, realiza-se a adição de uma hexose ($C_6H_{12}O_6$), como fonte exógena de substrato energético para o espermatozóide (ENGLAND, 1993), e através da via glicolítica ou do ciclo de Krebs, as células espermáticas dos mamíferos obtêm energia necessária para a manutenção de sua motilidade (RIGAU et al., 2002).

Rigau et al. (2002) demonstraram que a frutose parece ser mais sensível à atividade da enzima hexoquinase, apresentando efeito positivo mais significativo sobre o metabolismo da célula espermática, quando comparada à glicose.

Ahmad e Chaudhry (1980) investigando a lactose e a frutose em meios diluidores na criopreservação do sêmen de búfalos constaram que o diluente contendo 11% de lactose e 6% de frutose alcançaram melhores resultados quando observado motilidade pós-descongelação e sobrevivência.

O ácido cítrico (ácido 2-hidroxi-1,2,3-propanotricarboxílico - $C_6H_8O_7$) é um ácido fraco inorgânico que em temperatura ambiente, se apresenta como um pó cristalino branco, na forma anidra ou monohidratada, sendo que quando adicionada ao diluente a base de TRIS, esta na forma monohidratada (SILVA et al., 2002b).

Possui ação anti-oxidante e relevante atuação no ciclo de Krebs, importante via da respiração celular que ocorre nas mitocôndrias, e semelhante ao TRIS, contribui para a preservação da célula espermática auxiliando na manutenção do pH, quando se transforma em citrato ao doar prótons (SILVA, 2005).

3.3.2 Crioprotetores

As substâncias crioprotetoras adicionadas ao sêmen são de fundamental importância para criopreservação de quase todos os sistemas biológicos (FAHY, 1986). De acordo com Amann e Pickett (1987) estas auxiliam na preservação da integridade da membrana plasmática, que pode sofrer alterações devido às mudanças de temperatura durante o processo de congelação e descongelação. Para Sirivaidyanpong et al. (2000) preserva uma das habilidades do espermatozóide que é a reação acrossômica.

Segundo Castelo et al. (2008) as substâncias crioprotetoras podem ser classificadas penetrantes ou não penetrantes de acordo com o peso molecular e a consequente propriedade de atravessar ou não a membrana celular.

3.3.2.1 Crioprotetores penetrantes

Os crioprotetores penetrantes utilizados em meios diluentes para congelação de sêmen em animais domésticos são: glicerol, etilenoglicol, etanol, metanol, polietilenoglicol e o grupo das amidas: dimetilsulfóxido (DMSO), formamida, lactamida, acetamida e dimetilformamida (DE LEEUW et al., 1993, MEDEIROS et al., 2002b).

Os crioprotetores penetrantes são substâncias que tem a capacidade de diminuir as lesões de origem química ou mecânica que a criopreservação causa sobre as células espermáticas (NASH, 1966, CASTELO et al., 2008). Segundo Dalimata e Graham (1997) estes agentes crioprotetores promovem ligações de nitrogênio com moléculas da

água, criando um ambiente menos nocivo para as células, já que estas ligações mudam a orientação da molécula da água nos cristais de gelo.

O glicerol ($\text{CH}_3\text{H}_8\text{O}_3$), um álcool polihídrico altamente permeável, é o crioprotetor mais empregado na congelação de sêmen nas diferentes espécies e tem sido de grande importância para o avanço na tecnologia de criopreservação de sêmen (SILVA et al., 2003), por reduzir danos mecânicos aos espermatozóide durante o processo de congelação e por prevenir os efeitos de concentração do meio extracelular (VISHWANATH; SHANNON, 2000), semelhante a outros crioprotetores penetrantes como o DMSO (NICOLAJSEN; HVIDT, 1994).

Parks e Graham (1992) sugeriram que a penetração do glicerol na célula se dá através de difusão passiva, permanecendo tanto na membrana celular quanto no citoplasma. Segundo Kundu et al. (2000), o mecanismo de proteção desta molécula se deve à capacidade de ligação dos átomos de hidrogênio dos grupos hidroxila com os átomos de oxigênio dos grupos fosfato dos fosfolipídios da membrana do espermatozóide, promovendo assim a estabilização da membrana durante o processo de criopreservação.

Segundo Lovelock e Polge (1954) e Watson (2000), como efeito crioprotetor do glicerol tem-se a impedimento da formação de cristais de gelo intracelulares, diminuição do ponto de congelação e conseqüente redução das concentrações de eletrólitos na fração não-congelada da amostra.

No entanto, o glicerol apesar de ser um bom crioprotetor espermático, pode apresentar ações deletérias sobre os espermatozóides, induzindo desnaturação de proteínas, alteração de interações da actina, indução da liberação das proteínas do seu local na membrana (FAHY et al. 1990) e efeitos contraceptivos, provavelmente, pelas alterações causadas na membrana plasmática dos espermatozóides (BECKER et al. 1977, McLAUGHLIN et al. 1992, HAMMERSTEDT; GRAHAN, 1992).

3.3.2.2 Crioprotetores não penetrantes

Os mecanismos de ação dos agentes crioprotetores não penetrantes baseiam-se na proteção dos espermatozóides contra os efeitos osmóticos durante o processo de congelação, uma vez que aumentam a osmolaridade do meio extracelular, e são responsáveis pela passagem da água do interior da célula espermática para o meio extracelular, levando a desidratação, ou seja, impedindo assim, a formação de cristais de

gelo em seu interior durante a criopreservação. Estes são representados por açúcares (glicose, lactose, xilose, frutose, rafinose, sacarose e cheeni), lipoproteínas da gema do ovo, proteínas do leite e alguns aminoácidos (SEIDEL, 1984, AMANN; PICKETT, 1987, PICKETT et al. 1987, RODRIGUES, 1992, HOLT, 2000).

O crioprotetor tem um importante papel na permeabilidade da membrana celular e manutenção do balanço eletrolítico exercidos pelos açúcares de alto peso molecular (SANSONE et al., 2000).

Kumar et al. (1994) estudando os efeitos crioprotetores de 6 açúcares (glicose, xilose, frutose, rafinose, sacarose e cheeni) em diferentes concentrações, observaram que os açúcares se comportam independente em diferentes tampões, logo, suas concentrações influenciarão sobre possíveis efeitos na motilidade espermática após descongelação. Tais açúcares criam uma pressão osmótica, provocando desidratação celular e, portanto favorecendo menor incidência de formação de gelo intracelular (AISEN et al. , 2002).

Ala Ud et al. (1981) estudando a criopreservação de sêmen bubalino com diluidores a base de Leite integral homogeneizado, Laiciphos, Lactose e Cítrato, observaram que o diluidores a base de Lactose deram uma melhor proteção aos espermatozóides durante o processo criogênico.

A solução de Ringer com lactato é com freqüência utilizada na medicina humana e veterinária como fluidoterapia, possui uma composição semelhante a água de coco, que foi comprovado como bom diluidor para criopreservação de sêmen bubalino (NAHÚM, 2000). Em sua composição também possui a lactose que possui a propriedade de proteger as membranas celulares reduzindo o percentual de patologias espermáticas além de possuir semelhante osmolaridade ao plasma seminal (BALIEIRO, 1993; SILVA et al. 2002a).

O leite de vaca é um diluidor amplamente utilizado para a congelação de sêmen bubalino. Segundo Kumar et al. (1993) recomenda-se que antes do uso para a diluição, se proceda o aquecimento do leite e posterior resfriamento durante a noite em geladeira, seguida de retirada da camada de gordura e aquecimento em banho-maria por 10-12 minutos. Após o resfriamento repetido, a gordura restante deve ser removida por filtração através de lã de algodão.

A gema de ovo é um dos principais crioprotetores não-penetrantes e seu principal benefício é o fornecimento de uma fração LDL (lipoproteína de baixa

densidade), as quais aderem a membrana celular durante o processo de criopreservação, preservando a membrana do espermatozóide e prevenindo a saída de fosfolipídio e colesterol da membrana espermática, através da formação de um complexo com as proteínas do plasma seminal, prevenindo a ruptura da membrana plasmática, aumentando desta forma a tolerância ao choque térmico e ao processo de congelamento (HOLT et al., 1992; FARSTARD, 1996; MOUSSA et al. 2002; BERGERON et al., 2004; GONZALEZ, 2004; PRADO, 2009). Esses fosfolipídeos que compõem a fração LDL da gema de ovo também protegem o sêmen especificamente durante o processo de resfriamento a 5°C (WILHELM et al., 1996).

As evidências dos estudos criomicroscópicos em sêmen de carneiro (JONES; MARTIN, 1973; HOLT et al., 1992; KUMAR et al., 1992) demonstram que a presença da gema de ovo no diluidor, além de contribuir na proteção da membrana plasmática contra o choque térmico estimulam as vias de sinalização do sistema enzimático na fecundação, e permitem suportar a presença em meios hiper ou hiposmóticos, por ser a gema de ovo um tampão osmótico.

Entretanto, apesar de seus efeitos benéficos, a presença da gema de ovo também pode possibilitar alguns efeitos indesejados como: a contaminação do meio diluidor, favorecendo a produção de endotoxinas capazes de prejudicar a capacidade de fecundação dos espermatozoides (BOSSEAU et al. 1998; AIRES et al., 2003; PAGL et al., 2006). Para Martin (2005) dificuldade na padronização da gema de ovo. De acordo com Wall e Foote (1999) diminuição da motilidade espermática por conter substâncias que possam inibir a atividade mitocondrial dos espermatozoides.

3.3.3 Diluidores na congelamento de sêmen bubalino.

Inúmeros são os diluidores utilizados para a criopreservação de sêmen bubalino. Na criopreservação de sêmen de búfalo a composição do diluidor constitui um dos principais fatores que influenciam os resultados pós-descongelamento (DHAMI et al., 1996).

Ganguli et al. (1973), colhendo sêmen de 10 búfalos da raça Murrah, estudaram a motilidade espermática em diferentes diluidores (leite desnatado, leite desnatado-gema de ovo, Ácido cítrico-soro de leite e Ácido cítrico-soro de leite-glicerol 7%) incubando a 4°C e estocando à 96 e 144 horas. Desta forma os autores observaram nos diferentes diluidores, respectivamente, à 0 hora, motilidades espermática de $98\pm 0,8\%$; $80\pm 0,82\%$;

73±2,11% e 82±15,55%. Às 96 horas só observaram motilidades nos diluidores leite desnatado-gema de ovo; Ácido cítrico-soro de leite e Ácido cítrico-soro de leite-glicerol 7%, com motilidades apresentando 60±1,82%; 52±4,9% e 62±17,11%, respectivamente. De acordo com os autores, em 144 horas de incubação apenas foi observado motilidade no Ácido cítrico-soro de leite de 30±14,2% e Ácido cítrico-soro de leite-glicerol 7% de 50±3,07%.

Bhosrekar e Ganguli (1976) criopreservando sêmen de oito búfalos da raça Murrah, com diluidores a base de Ácido cítrico-soro de leite, leite desnatado-gema de ovo e bicarbonato de sódio-glicose-frutose-gema de ovo observaram motilidade antes e após o armazenamento a uma temperatura de 5-7°C nos tempos 0, 96 e 144 horas. Segundo os autores, nos diluidores (Ácido cítrico-soro de leite, leite desnatado-gema de ovo e bicarbonato de sódio-glicose-frutose-gema de ovo) observaram motilidades apenas às 0 e 96 horas, com 85% e 58%; 78% e 43% e 77% e 28%, respectivamente. Os autores verificaram que apenas quando foi suplementado com frutose e um outro grupo contendo Glicerol ao diluidor Ácido cítrico-soro de leite observaram motilidade às 144 horas, com valores de 40 e 50%, respectivamente.

Avenell (1982) para preservar sêmen bubalino utilizou diluidor a base de lactose com e sem a remoção do plasma seminal. O autor observou que o sêmen diluído com motilidades pré-congelação de 60-70% mostraram motilidade de 60% e 40-50% após a descongelação a 4°C por 5 e 180 minutos, respectivamente.

Em experimento realizado por Vale et al. (1984), utilizando diluidores a base de Gema-Citrato ou Leite Desnatado, a motilidade pós-descongelação ficou próxima aos 20%, e quando a Lactose foi utilizada, a motilidade aumentou e ficou em torno de 30%. De acordo com os autores, melhores resultados foram obtidos com diluidor a base de TES-TRIS, com uma motilidade espermática de pós-descongelação sempre superior a 40% e vigor de 3%.

Rajamahendran e Dharmasena (1984) obtiveram um total de 86 ejaculados a partir da colheita de sêmen de oito búfalos. A partir de 27 amostras do sêmen *in natura* de búfalo da raça Murrah observaram motilidade de 70,1%±1,8% e percentual de espermatozóides mortos de 17,6±1,2%. Após 24 horas de congelação, o sêmen diluído em TRIS e Ácido cítrico-soro de leite, foi descongelado, os autores verificaram motilidades de 50,2±4,1% e 19,6±2,4%, e espermatozóides mortos de 43,6±5,5% e 58,5±5,5%, respectivamente. Após descongelação os autores avaliaram o efeito do

tempo sobre a motilidade às 0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 horas, e observaram as motilidades de 44%, 44%, 42%, 37%, 34%, 7% e 4%, respectivamente.

Ahmad (1984) a partir de 18 ejaculados de três búfalos Nili-Ravi, diluiu em Lactose-fructose-gema de ovo-glicerol, testando a eficiência do tempo e a temperatura na pós-descongelação do sêmen, sendo que com 37°C por 15 segundos, observou motilidade de $40 \pm 1,43\%$ e 75°C por 9 segundo, motilidades de $50 \pm 0,99\%$.

Haranath et al. (1990) diluindo sêmen de seis búfalos em TRIS-gema de ovo e glicerol, congelados em nitrogênio líquido, armazenados por 24 horas, e descongelados a 37°C por 30 segundos, observaram motilidade média em sêmen fresco de 81,8% e após descongelação em palhetas de 0,25 e 0,5 mL, motilidades de $56,4 \pm 0,86\%$ e $55,64 \pm 0,86\%$, respectivamente.

Amstalden et al. (1993), obtiveram médias de motilidade espermática com sêmen *in natura* de $65,5 \pm 18,3\%$ e percentual de espermatozóides vivos e de patologias espermáticas de $67,03 \pm 17,25\%$ e $23,60 \pm 20,56\%$, respectivamente.

Ohashi (1993) congelando sêmen bubalino, com diluidores a base de Citrato-Leite e Lactose obteve motilidades pós-descongelação abaixo de 20% e 30%, respectivamente.

Oba et al. (1993), encontraram motilidade pós-descongelação para sêmen bubalino de $67,5 \pm 5\%$ para o diluidor glicina-gema, $60 \pm 14,1\%$ para TES e $41,2 \pm 17,5\%$ para TRIS.

Baliero (1993) obteve motilidade do sêmen *in natura* de touros bubalino de $85,78 \pm 5,97\%$. E assim, testou o uso dos diluidores a base de TRIS, TES e Citrato, numa congelação com tempo de equilíbrio de sete horas. Observou motilidade pós-decongelação de 52,7%, 50,5% e 39,9%, respectivamente. Concluiu que o diluidor TES apresentava uma boa capacidade de proteção das células espermáticas contra injúrias no processo de congelação em relação a outros diluidores, e que esta proteção se deve a presença da lactose.

Fritsch (1994) reportou motilidades média pós-descongelação, de sêmen bubalino da raça mediterrâneo, em diluidores TES e TRIS de $73,03 \pm 7,84\%$ e $65,57 \pm 10,73\%$, respectivamente. Também observou vigor de sêmen diluído no TRIS, onde 38,3% das amostras passaram de grau 5 para 4, e no diluidor TES permanecendo inalterado (grau 5) em 98,3% das amostras.

Misra et al. (1994) conseguiram obter em sêmen bubalino, em diluidor TRIS, motilidade pós-descongelamento de 60,8%.

Barnabe et al. (1994), após congelamento-descongelamento do sêmen bubalino com uso de diluentes à base de TES-TRIS e TRIS-gema observaram motilidades progressiva média inicial do sêmen *in natura* de 75% e, após descongelamento com diluidor à base de TES-TRIS, de 52,5%. Após três horas de incubação a 37°C, a motilidade passou a ser de 40% no diluidor TES-TRIS, por outro lado o TRIS-gema, em similares condições, permaneceu entre 20 e 30%.

Dhami et al. (1996) realizaram experimento para determinar a eficácia de dois diluentes (TRIS e Leite), na criopreservação de sêmen em três búfalos da raça Murrah. Observaram que as motilidade pós-descongelamento foram significativamente mais elevadas ($p < 0,01$) após 2 horas de resfriamento em comparação à 1 hora de resfriamento (63,4% vs 59,5%). Para os autores, ambos os diluentes TRIS e Leite foram igualmente eficazes quando se comparou as motilidades pós-descongelamento.

Chacur (1996) testando os tempos de equilíbrio de 1, 2, 3, e 4 horas em touros bubalino da raça Murrah, entre 5 e 12 anos de idade, não observou diferença no vigor e na motilidade espermática quando utilizou os diluentes TES, Glicina-Gema e Triladyl, como também não encontrou diferença na manutenção da integridade acrossômica para o meio TES na pós-descongelamento, e assim chegando a conclusão que estes diluidores são adequados para criopreservação do sêmen bubalino. Segundo o mesmo autor, utilizando um tempo de equilíbrio de três horas reportou valores de motilidade pós-descongelamento de 65,5% no TES e 61,5% no TRIS.

Nahúm (2000) congelando sêmen bubalino utilizando diluidor TES obteve 52% de motilidade pós-descongelamento. Ao congelar com água de coco obteve motilidade média pós-descongelamento de 46%, 7,15% de defeitos de acrossoma e 3,38% de defeitos de cauda, comprovando ser um bom diluidor para criopreservação de sêmen de búfalo.

Rasul et al. (2000) utilizaram diluidor TES-TRIS em sêmen bubalino e observaram, após a descongelamento, valores de 59% de motilidade progressiva, 53,2% de integridade de acrossoma e 41,4% de integridade de membrana plasmática.

Silva et al. (2002a) compararam no sêmen de quatro reprodutores bubalino da raça Murrah, a eficiência do diluidor TES ao Ringer-Lactato (CEBRAN-II), conseguindo demonstrar que o diluidor CEBRAN II quando comparado ao TES, mostrou-se uma alternativa mais econômica na criopreservação de sêmen bubalino. Na pós-

descongelção a motilidade no CEBRAN II foi de $55 \pm 15,67\%$ não significativamente diferente ($p < 0,2$) aquela demonstrada pelo diluidor TES $57,5 \pm 10,55\%$, embora o vigor no diluidor TES ($2,75 \pm 0,62$) tenha sido superior ($p < 0,01$) ao $2,08 \pm 0,05$ no diluidor CEBRAN II.

Mota (2005) estudou o efeito de uma pré-lavagem dos espermatozoides anterior ao processo de congelação, em gradientes de Percoll. O diluidor utilizado na criopreservação do sêmen bubalino foi o diluidor TES. As médias de vigor espermático foram de $3 \pm 0,8$; $2,3 \pm 1,10$ e $1,3 \pm 1,40$ respectivas para o sêmen a fresco, controle (diluidor TES) e tratado (pré-lavagem+diluidor TES), sendo que o sêmen a fresco não diferiu do grupo controle ($p > 0,05$). As médias de motilidade espermática foram de $57,3 \pm 18,6\%$ para o sêmen fresco, $20 \pm 17,30\%$ para o controle e $17,30 \pm 25,5\%$ para o tratado. As médias das motilidades do grupo controle e tratado não diferiram quando comparado ao sêmen a fresco ($p > 0,05$), porém diferiram entre si ($p < 0,05$). O sêmen teve médias respectivas para os grupos a fresco, controle e tratado, de percentuais de patologias de cauda fortemente dobrada de $23,1 \pm 30,4\%$; $29,2 \pm 21,5\%$ e $17,8 \pm 23,9\%$, cauda dobrada de $9,8 \pm 6,6\%$; $7,82 \pm 13\%$, $5,64 \pm 4\%$ e defeitos de peça intermediária de $9,8 \pm 6,6\%$; $7,82 \pm 13\%$, $5,64 \pm 4\%$ (MOTA, 2005).

Siddique et al. (2006) a partir de dois touros bubalino Nili-Ravi, preservaram dezesseis amostras de sêmen em nitrogênio líquido a -196°C por 24 horas, a fim de estudarem o efeito de cinco diluidores na motilidade pós-descongelção.

Sendo que, todos os cinco diluidores continham 0,25mg de Frutose, 0,25mg de Glicose, 1mg de Lactose, 100000mg/unidade de Penicilina, 100mg/mL Streptomina, 7mL de Glicerol, 20mL de gema de ovo e 100mL de água destilada. O que diferiam em cada diluidores era o seguinte: diluidor A (2,4mg de TRIS e 1,4mg de ácido cítrico), B (1,82mg de TRIS, 1mg de ácido cítrico e 0,52mg de citrato de sódio), C (1,21mg de TRIS, 0,67mg de ácido cítrico e 1,04mg de citrato de sódio), D (0,6mg de TRIS, 0,34mg de ácido cítrico e 1,56mg de citrato de sódio) e E (2,08mg de citrato de sódio). Os valores médios de pós-descongelção para o percentual de motilidade foram $45,9 \pm 5,2$; $38,1 \pm 5,2$; $50,0 \pm 6,4$; $41,9 \pm 7,9$ e $40,9 \pm 6,3$ para os diluidores A, B, C, D e E, respectivamente (SIDDIQUE et al., 2006).

Hashemi et al. (2007) estudaram a eficácia de quatro diluidores (TRIS-Ácido cítrico-frutose-glicerol, Universidade Cornell-gema de ovo-glicerol, Illinois-temperatura variável-gema de ovo-glicerol e Minnesota-gema de ovo-glicerol) a partir

de 24 ejaculados de um total de quatro touros bubalinos. O percentual de motilidade espermática do sêmen *in natura* foi de $89,86 \pm 0,64\%$. O percentual de motilidade espermática pós-descongelação foi significativamente maior ($p < 0,01$) em TRIS-Ácido cítrico-frutose-glicerol ($71,56 \pm 1,21\%$) e em Universidade Cornell gema de ovo-glicerol ($67,56 \pm 1,01\%$) que no diluidor Minnesota-gema de ovo-glicerol ($39,15 \pm 2,27\%$) e Illinois-temperatura variável-gema de ovo-glicerol ($34,41\% \pm 3,01\%$). Segundo os autores, houve diferença entre os dois primeiros e entre estes dois últimos, entretanto a diferença não foi significativa ($p > 0,05$). A porcentagem de danos acrossomas foi significativamente maior ($p < 0,05$) em Illinois-temperatura variável-gema de ovo-glicerol ($25,41 \pm 1,55\%$) que em TRIS-Ácido cítrico-frutose-glicerol ($14,66 \pm 1,1\%$) e Universidade Cornell-gema de ovo-glicerol ($15,02 \pm 1,05\%$), porém a diferença entre o diluidor Minnesota-gema de ovo-glicerol ($20,55 \pm 1,54\%$) e Illinois-temperatura variável-gema de ovo-glicerol ($25,41 \pm 1,55\%$), não foi significativa ($p > 0,05$).

Singh et al. (2007) utilizaram espermatozóides obtidos a partir da punção do epidídimo de búfalos oriundos de matadouros. Foi feita a congelação em diluidor a base TRIS-ácido cítrico-frutose sem (Grupo I) e com heparina (Grupo II) na concentração de $80 \mu\text{g/mL}$. A motilidade espermática, a viabilidade espermática e a integridade do acrossoma na fase pré-congelação, no grupo I, foi de $71,7 \pm 1,14\%$; $83,6 \pm 0,95\%$ e $80,2 \pm 1,08\%$, respectivamente, já na fase de pós-descongelação foi de $52,3 \pm 1,35\%$; $67,9 \pm 0,95\%$ e $71,8 \pm 1,08\%$, respectivamente. No grupo II, a motilidade espermática, a viabilidade espermática e a integridade do acrossoma, na fase pré-congelação, foi de $73,2 \pm 0,98\%$; $83,7 \pm 1,08\%$ e $80,2 \pm 1,11\%$, respectivamente e na fase de pós-congelação foi de $14,7 \pm 0,67\%$; $25,7 \pm 0,73\%$ e $24,8 \pm 1,25\%$, respectivamente. Houve variação significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos observados apenas na fase pós-descongelação.

Abdel-Khalek et al. (2008) obtiveram com sêmen de búfalos colhido através de vagina artificial, um volume do ejaculado *in natura* de $3,15 \pm 0,2\text{mL}$, motilidade espermática de $68,1 \pm 1,6\%$, concentração espermática de $1,98 \pm 11,4 \times 10^9$ espermatozóides/mL, $72,8 \pm 1,4\%$ espermatozóide vivos, anormalidades espermáticas de $3,9 \pm 0,3\%$ e integridade de acrossoma de $84,9 \pm 1\%$. Após criopreservação em TRIS e pós-descongelação obtiveram motilidades espermáticas, espermatozóide vivos, anormalidades espermáticas e concentração espermática de $63,5\%$; $76,6\%$; $4,4\%$; $7,1(x10^6)$ espermatozóides/mL), respectivamente.

Fatih et al. (2010) estudaram o efeito de diferentes níveis de gema de ovo (20, 15 e 10%) em diluidor a base de TRIS na qualidade de sêmen de búfalo Kundhi na pós-descongelamento. Observou-se que em todos os ejaculados a cor e aspecto foram branco cremoso, apresentando volume médio, pH, turbilhonamento, concentração espermática e motilidade espermática de $2,95 \pm 0,07$ mL, $6,63 \pm 7,30$, $3,64 \pm 0,05\%$, $1283,7 \pm 12,12 \times 10^6$ /mL e $80,05 \pm 3,79\%$, respectivamente. O efeito de diferentes níveis de gema de ovo nos diluentes indicou que 15% de gema de ovo resultou em aumento significativo ($p < 0,05$) dos parâmetros pós-descongelamento para motilidade e integridade de membrana plasmática. Os parâmetros motilidade e integridade de membrana plasmática para gema de ovo a 15% foram $45,71 \pm 0,61\%$ e $31,5 \pm 0,82\%$, respectivamente. No entanto, segundo os autores houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos gema de ovo com 20% e 10%, sobre os parâmetros motilidade espermática e integridade de membrana plasmática na fase pós-descongelamento. A motilidade espermática pós-descongelamento com 20% de gema de ovo foi de $39,83 \pm 0,64\%$, e integridade de membrana plasmática $23,56 \pm 0,91\%$. Já com 10% foram $36,89 \pm 0,62\%$ e $18,78 \pm 0,72\%$, respectivamente.

Singh (2010) obteve motilidade progressiva de $48,1 \pm 1,9\%$, integridade de acrossoma de $17,6 \pm 1,0\%$ e espermatozoides vivos de $61,7 \pm 1,7\%$, após descongelamento de doses de sêmen em temperatura a 40°C por 14 segundos, proveniente do sêmen de quatro búfalos da raça Murrah diluídos em meio à base de TRIS.

Ansari et al. (2010), congelando sêmen de 5 touros adultos Nili-Ravi (*Bubalus bubalis*), utilizando o diluidor TRIS-Ácido Cítrico suplementado com diferentes concentrações de glutathione exógenas (0,5mM GSH, 1,0 mM GSH, 2,0 mM GSH e 3,0 mM GSH), avaliaram os parâmetros motilidade espermática, viabilidade e integridade da membrana plasmática à 0, 3 e 6 horas após a descongelamento, obtiveram resultados mais favoráveis com concentrações de até 2,0 mM de GSH, com percentuais de motilidade progressiva à 0, 3 e 6 horas de $56,7\%$; $41,7\%$; $28,3\%$ X 40% , 20% , 10% grupo controle, viabilidade espermática de 89% ; $75,3\%$; $59,3\%$ X 70% , 50% , 30% grupo controle e integridade da membrana plasmática de $88,7\%$; $70,3\%$; $58,7\%$ X 70% , 50% , 30% grupo controle, às 0, 3 e 6, respectivamente.

Castro (2010), congelando sêmen de cinco touros bubalinos da raça Murrah (4-8 anos), obteve motilidade espermática de $39,5 \pm 23,8\%$ utilizando diluidor a base de TES-TRIS na fase de pós-descongelamento contra $41,9 \pm 22,3\%$ (TES-TRIS + Vitamina C),

44,6±19,9% (TES-TRIS + Pentoxifilina) e 46,9±19,0% (TES-TRIS + Vitamina C + Pentoxifilina), observando variações numéricas entre os tratamentos ($p < 0,05$). Também observou vigor de 3,8±0,6 na fase de pré-congelação e pós-congelação de 2,4±0,6 (TES-TRIS), 2,6±0,6 (Vitamina C), 3,1±0,6 (Pentoxifilina) e 3,1±0,6 (Vitamina C + Pentoxifilina). O percentual de células com membrana íntegra na fase de pré-congelação foi de 85,4±8,3%, sendo que na fase pós-descongelação, os valores observados foram de 62,2±15,9% (TES-TRIS), 63,5±13,3% (Vitamina C), 57,9±15,7% (Pentoxifilina) e 57,6±15,9% (Vitamina C + Pentoxifilina) ($p > 0,05$). A integridade de membrana plasmática analisada pelo teste hiposmótico (HOS) na fase pré-congelação foi de 73,1±10,5%. Na fase de pós-descongelação, os dados apresentaram variação numérica entre os tratamentos ($p < 0,05$), com 87,0±6,8% de células com membranas íntegras para o grupo controle, 85,3±7,6% para Vitamina C, 85,8±7,0% para Pentoxifilina e 86,7±6,2% para Vitamina C + Pentoxifilina.

Akhter et al. (2010a) conseguiram observar percentual de motilidade espermática de touros bubalinos pós-descongelação de (45,3±1,1%, 45±1,4%), viabilidade espermática (66,2±1,1%, 64,4±1,3%) integridade de membrana plasmática (60,4±1,2%, 59,2±1,4%) e integridade de acrossoma (82,9±0,5%, 80,7±0,5%) em TRIS-Ácido cítrico-gema de ovo e diluidor Bioxcell[®], respectivamente. Não sendo observada diferença estatística entre os tratamentos ($p > 0,05$). Patologia de cabeça (1,2±0,1%, 1,2±0,1%), peça intermediária (0,67±0,1%, 0,87±0,1%) e cauda (11,7±0,2%, 11,6±0,3%) em TRIS-Ácido cítrico-gema de ovo e diluidor Bioxcell[®], respectivamente, não sendo também observada diferença estatística entre tratamentos ($p > 0,05$).

Akhter et al. (2010b) estudaram o efeito da adição de frutose ao diluidor leite desnatado sobre a qualidade seminal de cinco búfalos Nili-Ravi sobre a motilidade, longevidade *in vitro*, integridade da membrana plasmática, anormalidade de cabeça, peça intermediária e cauda. As alíquotas de sêmen foram diluídas a 37°C com leite desnatado sem frutose (controle), leite desnatado contendo frutose 5mM ou 10mM. Nesse ensaio não foi observado diferenças estatísticas ($p > 0,05$) na motilidade dos espermatozoides, na longevidade *in vitro* e integridade da membrana plasmática no primeiro dia de armazenamento entre os grupos experimentais (grupos: controle, e frutose 5mM ou 10mM). Neste primeiro dia de armazenamento os autores observaram motilidades entre 70 e 80% entre os grupos experimentais. No entanto, segundo os

autores a motilidade dos espermatozoides, longevidade *in vitro* e integridade da membrana plasmática nos dias 3, 5 e 7 de armazenamento foi significativamente melhor ($p < 0,05$) nos diluidores contendo frutose 5mM e 10mM em relação ao controle. Neste estudo os autores concluíram que a adição de frutose 5mM e 10mM melhorou a motilidade espermática, em termos de longevidade *in vitro* e integridade da membrana plasmática.

Um ano depois, Akhter et al. (2011) estudando o efeito do ácido ascórbico e α -tocoferol suplementado no diluidor leite desnatado na capacidade de preservação espermática de três touros bubalino Nili-Ravi. As amostras de sêmen foram diluídas a base de leite desnatado contendo ácido ascórbico (0,5 mM), outro com α -tocoferol (1,0 mM) e um sem qualquer suplemento (Controle- Leite desnatado). Neste ensaio o percentual de motilidade espermática foi menor ($p < 0,05$) no diluidor contendo α -tocoferol, em comparação com o ácido ascórbico e controle no primeiro e terceiro dia de armazenamento, no entanto, não diferiu no dia quinto de armazenamento ($p > 0,05$). No primeiro dia de armazenamento estas motilidades ficaram em torno de 70 a 80% nos diferentes grupos experimentais. Não houve diferença ($p > 0,05$) no percentual de integridade da membrana acrossômica por cinco dias de armazenamento. Além disso, anormalidades espermáticas (cabeça, peça intermediária e cauda) mantiveram-se semelhantes ($p > 0,05$) em todos os grupos experimentais com cinco dias de armazenamento.

Swelum et al. (2011) avaliando a substituição de glicerol por etilenoglicol na criopreservação de sêmen de búfalo, utilizando quatro tipos de diluidores (TRIS-gema de ovo-glicerol; TRIS-gema de ovo-etilenoglicol; Leite-gema de ovo-glicerol e Leite-gema de ovo-etilenoglicol), observaram respectivamente motilidade pós-descongelção de $61,75 \pm 0,85\%$; $61,15 \pm 0,75\%$; $56,6 \pm 0,76\%$; $55,95 \pm 0,56\%$, patologias espermáticas de $26,5 \pm 1,01\%$; $69,1 \pm 0,81\%$; $61,1 \pm 0,74\%$; $64,1 \pm 0,61\%$, integridade de acrossoma de $65,60 \pm 1,01\%$; $69,10 \pm 0,81\%$; $61,1 \pm 0,74\%$; $64,1 \pm 0,61\%$ e integridade de membrana plasmática de $68,50 \pm 0,91\%$; $71,75 \pm 0,72\%$; $63,45 \pm 0,81\%$; $66,45 \pm 0,78\%$. Verificaram que etilenoglicol melhorou significativamente a qualidade seminal pós-descongelção (patologias espermáticas, integridade de acrossoma e integridade de membrana plasmática), exceto motilidade espermática, que não apresentou diferenças estatísticas.

El-Gawad e Allah (2011) procuraram esclarecer o efeito de dois diluentes (TRIS e Leite), em duas taxas de resfriamento (35°C a 5°C por 1 e 2 h), em dois períodos de

equilíbrio (1 e 2 h) e suas interações sobre a congelabilidade, fosfatase alcalina (AKP), glutâmico oxalacética transaminase (GOT) e fertilidade do sêmen congelado-descongelado em 24 horas, de ejaculados de quatro búfalos. Assim, reportaram que espermatozoides de búfalos diluídos em Leite e resfriado por duas horas e equilibrado por duas horas resultaram em melhores valores de pré- e pós-congelação, com motilidades espermáticas em pré- de $67,5 \pm 0,1\%$ e em pós- de $42,6 \pm 0,5\%$, defeitos acrossômicos em pré- de $7,7 \pm 0,5\%$ e em pós- de $13,6 \pm 0,7\%$ e elevada taxa de fertilidade (46,4%). Quando utilizaram o diluente TRIS nas mesmas condições pré e pós-descongelação observaram motilidades em pré- de $65,1 \pm 1,1\%$ e em pós- de $38,7 \pm 1,2\%$, defeitos acrossômicos em pré- de $8,7 \pm 0,6$ e em pós- de $16,9 \pm 0,9\%$ e fertilidade de taxa de 40%.

El-Kon (2011), a partir de quatro touros bubalinos estudou as características pós-descongelação de espermatozoides através da adição de diferentes concentrações de Albumina Sérica Bovina (BSA) (0,5, 1,0, 5,0, 10 e 15%) aos diluentes de sêmen sem gema de ovo. No grupo controle o diluidor utilizado foi o TRIS-gema de ovo. No BSA 10 e 15%, a motilidade espermática pós-descongelação foi $58,2 \pm 4,6\%$ e $59,40 \pm 4,8\%$ e a viabilidade espermática foi $69,3 \pm 4,1\%$ e $69,2 \pm 4,2\%$, respectivamente. Sendo que foram significativamente maiores ($p < 0,05$) quando comparado ao diluidor TRIS-gema de ovo (controle). Os defeitos totais (cabeça e cauda) do sêmen foram significativamente menores ($p < 0,05$) nos tratamentos 10 e 15% de BSA com $16,80 \pm 1,6\%$ e $16,42 \pm 1,40\%$, respectivamente, quando comparado ao grupo controle com $22,24 \pm 1,89\%$ e em outras amostras tratadas com 0,5, 1,0 e 5,0% de BSA com $23,26 \pm 2,7\%$, $21,62 \pm 2,2\%$ e $22,4 \pm 2,30\%$, respectivamente. O autor não observou diferenças estatísticas no percentual de integridade de membrana plasmática entre o grupo controle e as amostras contendo 0,5, 1,0 e 5,0% de BSA.

Ansari et al. (2011) investigaram o efeito da cisteína (0, 0,5, 1,0, 2,0 e 3,0 mM) em diluidores sobre a qualidade pós-descongelação de espermatozoides de cinco búfalos adultos Nili-Ravi. Sendo o sêmen diluído em TRIS-Ácido cítrico-gema de ovo contendo de 0 (controle) 0,5, 1,0, 2,0 e 3,0 mM de cisteína. Em 0, 2 e 4 horas pós-descongelação, contendo 1,0mM de cisteína a motilidade espermática foi de ($58,3 \pm 2,9\%$, $43,3 \pm 2,9\%$, $30 \pm 5\%$), viabilidade espermática de ($89,7 \pm 2,1\%$, $75,3 \pm 1,2\%$, $61,0 \pm 2\%$) integridade da membrana plasmática ($82,7 \pm 3\%$, $68 \pm 2,6\%$, $54,3 \pm 0,9\%$) e integridade acrossômica ($92 \pm 1,2\%$, $87,3 \pm 1,2\%$, $84,3 \pm 0,9\%$), respectivamente, sendo estas, maiores ($p < 0,05$)

quando comparadas aos demais tratamentos (0, 5,0, 2,0 e 3,0mM). O grupo controle TRIS-Ácido cítrico-gema de ovo contendo de 0 mM de cisteína apresentou, aproximadamente, motilidade espermática pós-descongelação de 45%, viabilidade espermática de 69%, integridade da membrana plasmática de 60% e integridade acrossômica 80%.

3.4 TESTE DE TERMO-RESISTÊNCIA (TTR)

O fundamento do teste de termo-resistência tem por objetivo avaliar a resistência das células ao meio diluidor, à temperatura da água e ao tempo de exposição (SEVERO, 2009).

O teste consiste em incubar o sêmen em água morna à 40°C, por um tempo de 180 minutos de exposição, avaliando motilidade e vigor espermático aos 30, 60, 120 e 180 minutos, sendo que ao fim deste teste o sêmen devem apresentar uma motilidade mínima de 20% e vigor 2, para constituir-se apto para a inseminação (RIBEIRO et al., 1991; VALE, 2008).

Vale et al. (1984) congelando sêmen bubalino com diluidores à base de gema citrato ou leite desnatado, após TTR com três horas, observaram motilidade espermática próxima aos 20%.

Ohashi (1993) em experimento com sêmen bubalino observou após TTR com três horas e 30 minutos no diluidor TES motilidade espermática média de 20%, sendo que em Citrato, Leite desnatado e Lactose após 30 minutos de teste, todos os espermatozóides perderam a motilidade.

Dhami e Sahni (1994) no TTR em diluidores a base de citrato com 10% de gema de ovo e 6% de glicerol, após 30 minutos, 1 e 2 horas obtiveram motilidade média do sêmen bubalino de $26,67 \pm 3,45\%$, $11,11 \pm 2,85\%$ e $2,57 \pm 1,59\%$, respectivamente.

Fritsch (1994) na criopreservação de sêmen bubalino, após 3 horas em TTR com diluidor TES obteve um percentual de motilidade de $37,82 \pm 16,94\%$.

Chacur (1996) trabalhando com búfalos da raça Murrah, após 3 horas em TTR observou superioridade do vigor espermático no diluidor TES em detrimento ao diluidor TRIS (0,81 vs 0,65).

Nahúm (2000) após 3 horas de TTR, em sêmen de búfalo, observou em diluidores a base de água de coco e TES, motilidade e vigor espermático respectivos de $25,75 \pm 20,74\%$ e $2 \pm 1,36$, e $32,92 \pm 23,04\%$ e $2,26 \pm 1,28$.

Silva et al. (2002a) observando vigor e motilidade espermática no TTR até 3 horas de incubação em banho maria a temperatura de 40°C, motilidades média de $42,1 \pm 17,64$ no diluente CEBRAN II, semelhante aos encontradas no TES ($45,83 \pm 14,43\%$), e vigor espermático de $1,67 \pm 0,65$ CEBRAN II, inferior ($p < 0,01$) ao apresentado no diluente TES ($2,67 \pm 0,65$).

Em experimento, Moose et al. (2007) utilizando o TTR para avaliar pós-descongelção, as características motilidade e vigor, às 0 e 5 horas de incubação de 139 amostras de sêmen congelado, obtidas a partir de 4 touros bubalinos mestiços Jafarabadi x Murrah, com três anos de idade, durante os meses de janeiro a novembro, não observaram diferença estatística ($p > 0,01$) à 0 hora das características motilidade e vigor pós-descongelção entre os diluidores (Lactose-gema, TRIS-I, TRIS-II, TRIS-III, Citrato-gema, TES-TRIS e Meio de Mem-Eagle, porém às 5 horas de incubação houve diferença ($p < 0,01$) entre os diluidores Lactose-gema, TRIS-I e TES-TRIS, sendo que o TES-TRIS superou o TRIS-I nas duas características avaliadas. A motilidade a 0 hora e a 5 horas nos diluidores foram: Gema-lactato ($27,18 \pm 2,45\%$; $4,28 \pm 1,39\%$), TRIS-I ($34,27 \pm 3,10\%$; $2,14 \pm 0,25\%$) e TES ($35,65 \pm 3,8\%$; $9,55 \pm 2,13\%$). Já o vigor (0-5) a 0 hora e a 5 horas foram: Gema-lactato ($2,73 \pm 0,19$; $0,62 \pm 0,17$), TRIS-I ($3,06 \pm 0,24$; $0,25 \pm 0,20$) e TES ($3,41 \pm 0,29$; $1,18 \pm 0,26$).

Castro (2010) estudando motilidade espermática progressiva e vigor espermático de touros bubalinos submetidos ao TTR, incubando em banho-maria a seco durante 3 horas a 36°C, obteve no grupo controle (diluitor TES-TRIS) na fase pós-TTR motilidade progressiva de 15,1%.

3.5 LESÃO DE ACROSSOMA

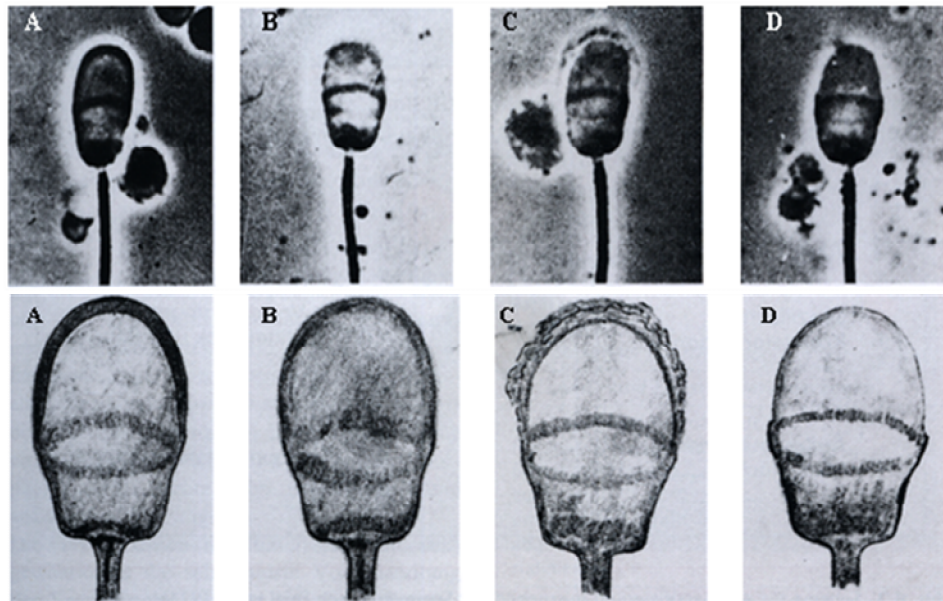
Segundo Garner e Hafez (2004), o acrossoma está situado na cabeça do espermatozóide, entre a membrana plasmática e a porção anterior do núcleo, constituindo-se de uma estrutura de dupla parede, essencial para o funcionamento das células espermáticas.

No acrossoma estão contidas as enzimas acrossomais, que são liberadas durante a reação acrossômica no momento da fertilização, sendo de essencial importância para que haja a penetração do espermatozóide na zona pelúcida e fusão com a membrana plasmática do oócito (KAWAKAMI et al., 1993). Daí a importância da integridade do acrossoma espermático, bem como a manutenção de suas enzimas, uma vez que há o

início das reações físico-químicas cruciais para o processo de fertilização (SILVA; GADELLA, 2006).

Segundo Weitze (2001), quanto à integridade de acrossoma podem ser classificadas como: membrana acrossômica normal, alterada, com início de desprendimento e com perda total da membrana acrossômica (Figura 2).

Figura 2. (A) Membrana acrossômica normal, (B) Membrana acrossômica alterada, (C) Início de desprendimento (D) Perda total da membrana acrossômica.



Fonte: (WEITZE, 2001).

Vários experimentos têm relatado correlações positiva entre a porcentagem de acrossomas intactos e a fertilidade (CORREA et al., 1997). Chan et al. (1996), relatam que a integridade da membrana acrossomal pode estar relacionada com a integridade de outras membranas bem como a motilidade celular.

Rahman et al. (1988) descreveram valores de anormalidade de acrossoma, em sêmen bubalino diluído, de $19,4 \pm 0,02\%$ no Citrato e $7,6 \pm 0,02\%$ no diluidor TRIS. Já Nahúm (2001), obteve $7,15\%$ de defeitos de acrossoma ao utilizar diluidor a base de água de coco pós-descongelção.

Fritsch (1994) avaliando o sêmen *in natura* encontrou $1,60 \pm 1,39\%$ de espermatozoides com patologias de acrossoma, ocorrendo um aumento de tais patologias no sêmen diluído em meio a base de TRIS ($2,07 \pm 1,89\%$), e não obtendo diferença estatística ao comparar com diluidor a base de TES ($1,62 \pm 1,59\%$).

Em experimento executado por Mota (2005) com sêmen fresco, pós-descongelado em TES (Controle) e pós-descongelado em TES após ser tratado em coluna de Percoll, para lavagem dos espermatozoides, apresentaram médias respectivas de alteração de acrossoma de $0,7\pm0,9\%$; $1\pm2\%$ e $20,9\pm14,6\%$, e de desprendimento de acrossoma de $0,8\pm1,5\%$; $1,1\pm2,2\%$ e $6,80\pm6,4\%$ para os grupos a fresco, controle e tratado. O aumento de defeitos de acrossoma no sêmen tratado foi superior ao do sêmen fresco e controle.

Akhter et al. (2010a) conseguiram observar de touros bubalino pós-descongelção percentual de integridade de acrossoma de $82,9\pm0,5\%$ e $80,7\pm0,5\%$ em TRIS-Ácido cítrico-gema de ovo e diluidor Bioxcell[®], respectivamente.

Ansari et al. (2011) investigaram o efeito da cisteína (0, 0,5, 1,0, 2,0 e 3,0 mM) no diluidor TRIS sobre a qualidade pós-descongelção. Em 0, 2 e 4 horas pós-descongelção, contendo 1,0 mM de cisteína, relataram integridade acrossômica de $92\pm1,2\%$, $87,3\pm1,2\%$, $84,3\pm0,9\%$. No grupo controle TRIS-Ácido cítrico-gema de ovo contendo de 0 mM de cisteína apresentou 80% de integridade acrossômica.

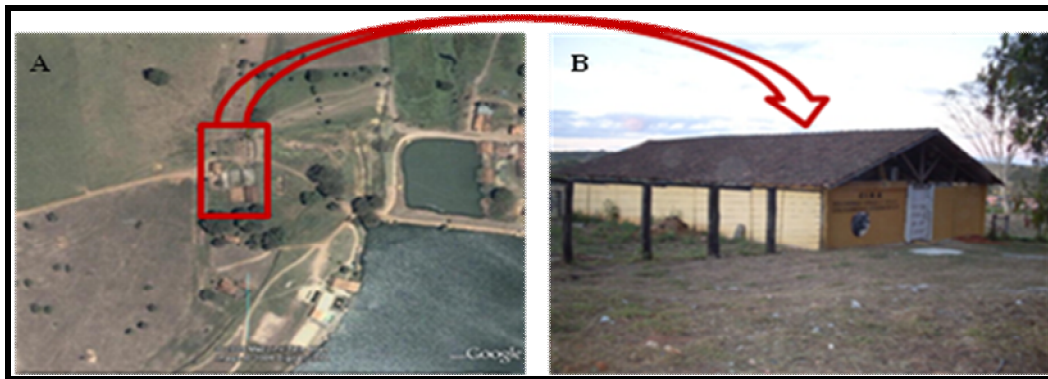
El-Kon (2011) nas amostras de sêmen contendo 10% BSA encontrou um percentual de integridade de acrossoma de $65,48\pm2,4\%$ e em 15% $66,46\pm2,4\%$, sendo significativamente maiores ($p<0,05$) quando comparados com o TRIS-gema de ovo (grupo controle) $45,6\pm1,2\%$.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAL DO EXPERIMENTO

O experimento foi conduzido na Central de Inseminação e Reprodução de Búfalos-CIRB, propriedade da Fazenda Pacú, no município de Inhaúma, estado de Minas Gerais, estando localizado geograficamente a 15°26'24.54" de latitude sul (S) e de 44°28'26.56" longitude oeste (W) (Figura 3).

Figura 3. (A e B) Imagem de satélite e fotografia da Central de inseminação e Reprodução de Búfalos, localizado no município de Inhaúma, estado de Minas Gerais.



Fonte: GOOGLE EARTH, 2009.

4.2 ANIMAIS E MEDIDAS DE MANEJO

Foram utilizados três reprodutores bubalinos (touros A, B e C), pertencentes à raça Murrah (Figura 4), em plena atividade sexual, pesando respectivamente, 850 Kg, 815 Kg e 665 Kg, apresentando idade média de oito anos.

Os touros, no decorrer do experimento, ficaram mantidos em regime de estabulação, recebendo alimentação com feno de capim Tifton (*Cinodon spp.*), juntamente com sal mineral e água “*ad libitum*”. Os animais eram banhados e escovados diariamente, principalmente nas horas mais quente do dia.

Figura 4. Exemplar bubalino utilizado no trabalho experimental.



Fonte: Arquivo pessoal, 2010.

4.3 COLHEITAS DO SÊMEN

As colheitas de sêmen foram intercaladas com intervalo de um dia totalizando 71 ejaculados, estendendo-se de maio a agosto de 2010, compreendendo a estação considerada favorável, onde os reprodutores bubalinos apresentam maiores manifestações de comportamento sexual e melhor qualidade seminal.

As colheitas de sêmen foram realizadas pelo método vagina artificial (Figura 5), com temperatura entre 42 a 46°C, utilizando-se como manequim fêmea bubalina sendo que antes de cada ejaculado foi estabelecida uma falsa monta com o intuito de se melhorar a qualidade do ejaculado, por metodologia preconizada por Vale (1994), (2008).

Figura 5. Procedimento de colheita de sêmen bubalino pelo método da vagina artificial.



Fonte: Arquivo pessoal, 2010.

As análises laboratoriais e o processamento das amostras de sêmen colhido foram realizados na Central de Inseminação e Reprodução de Búfalos- CIRB, localizada na Fazenda Pacú, em Inhaúma, Estado de Minas Gerais. O material utilizado para manipular amostras, como tubos, lâminas e lamínulas foram previamente aquecidos a 37°C.

4.4 AVALIAÇÃO DOS EJACULADOS

Após as colheitas de sêmen, o sêmen foi levado imediatamente ao laboratório, onde foram avaliadas e determinadas às características físicas e morfológicas do sêmen, sendo metodologia preconizada por Vale (2008).

4.4.1 Determinação das características físicas do ejaculado

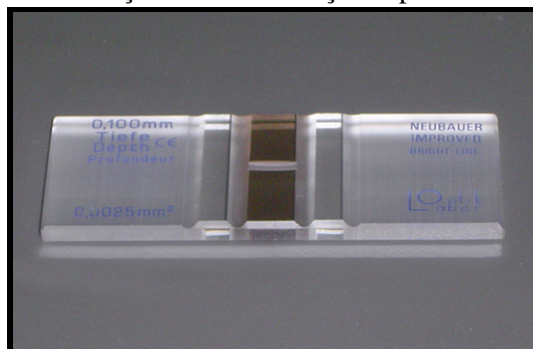
4.4.1.1 Volume, aspecto, pH e concentração

A determinação do volume de ejaculado foi realizada imediatamente após a colheita de sêmen sendo expresso em mililitros (mL) com a utilização de tubo graduado específico para a finalidade. Quanto ao aspecto foi feita avaliação visual representando principalmente a cor e a aparência do ejaculado (VALE, 2010).

O pH seminal foi determinado através de testes laboratoriais a partir de fitas de papéis específicas para a finalidade (MERK®)(2010).

A determinação da concentração espermática que expressa o número de espermatozóides por milímetro cúbico (mm^3) ou centímetro cúbico ($\text{cm}^3 = \text{mL}$) foi determinada a partir da contagem das células em câmara de Neubauer (Figura 6) utilizando técnica descrita por Vale (2008).

Figura 6. Câmara de Neubauer utilizada na contagem de espermatozóides e determinação da concentração espermática.

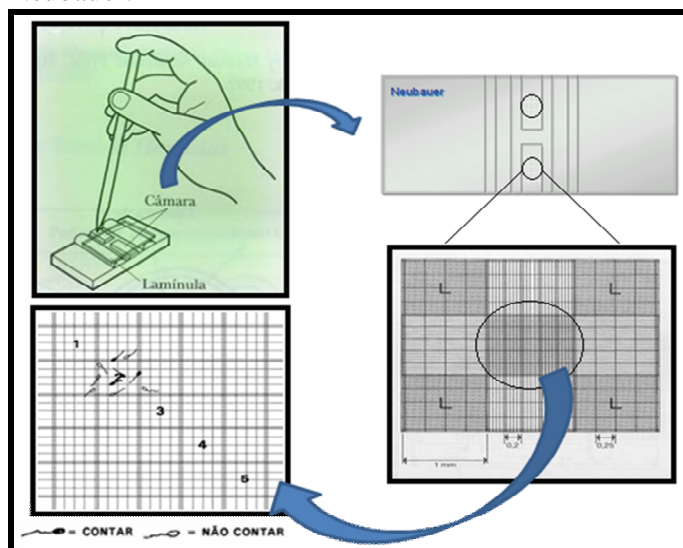


Fonte: Arquivo pessoal, 2010.

Uma alíquota de 20 μ L do sêmen fresco foi diluído em um tubo graduado contendo 4mL de uma solução de formol-salina-tamponada, chegando-se a uma diluição final de 1:200, em seguida, a amostra foi cuidadosamente homogeneizada para posterior preenchimento da câmara, onde ficou em repouso horizontal por cinco minutos, afim de que as células se depositassem no fundo da mesma.

Para a contagem das células foi utilizado microscópio óptico com objetiva de 40X (Eclipse 200[®], Nikon, Tóquio, Japão), realizando a soma em pelo menos cinco quadrados grandes (compostos de 16 pequenos quadrados) de apenas um lado da câmara (Figura 7), o resultado foi multiplicado pelo fator de diluição 10.000 para a obtenção da concentração do ejaculado por mL.

Figura 7. Esquema ilustrativo de como determinar a concentração espermática através do uso da câmara de Neubauer.



Fonte: Ilustração criada pelo autor.

4.4.1.2 Turbilhonamento, motilidade e vigor espermático.

Para determinação do turbilhonamento ou movimento de massa foi colocada um gota de sêmen sobre uma lâmina previamente aquecida a 37°C, e levado a microscópio óptico com objetivas de 20X (Eclipse 200[®], Nikon, Tóquio, Japão), onde então subjetivamente foi interpretado, sendo expresso através de uma classificação de 0 a 5, onde 0 representa a ausência de turbilhão e 5 acentuado movimento em massa (VALE, 2008, 2010).

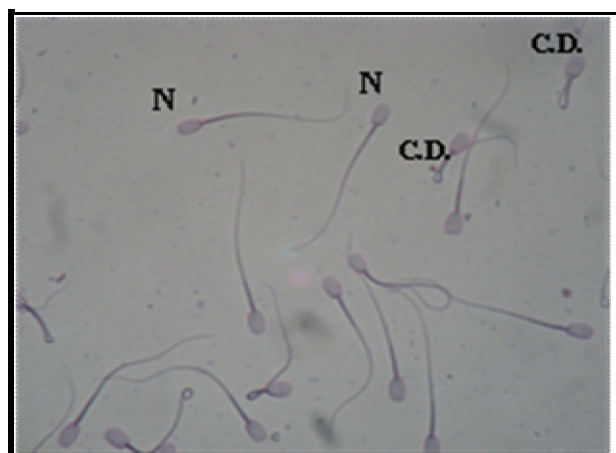
A motilidade espermática e o vigor foram avaliados a partir de uma alíquota de sêmen fresco, depositada sobre lâmina de vidro para microscopia e depois coberta com

lamínula de 22x22 mm, ambas previamente aquecidas a 37°C e posteriormente examinadas ao microscópio óptico binocular (Eclipse E200[®], Nikon Corporation, Tóquio, Japão), sobre platina aquecida a 37°C, em aumento de 10 a 40X, através de microscópico equipado com contraste de fase. O resultado da motilidade foi registrado percentual, de 0-100%, em função do número relativo de células com movimento progressivo no campo avaliado. E a avaliação do vigor, a partir do tipo e intensidade do movimento individual do espermatozóide no campo, em uma escala que vai de 0 a 5 (VALE, 2008, 2010).

4.4.2 Determinação das características morfológicas dos espermatozóides

A avaliação da morfologia espermática foi realizada em lâmina corada com vermelho congo e violeta genciana (CEROVSKY, 1976) (Figura 8), e analisado em microscópio óptico sob imersão, a um aumento de 1000X, sendo que a contagem foi feita em 200 células e expressa em porcentagem, com classificação individual das anormalidades, que foram agrupadas em defeitos maiores e menores segundo classificação proposta por Blom (1972), com o intuito de se detectar células que apresentem anormalidades de cabeça, peça intermediária e cauda. Sendo avaliado imediatamente ao dia da colheita de sêmen, na fase de pré-congelação e após descongelção das doses, em cada diluidor: Ringer-Lactato, Leite desnatado, TRIS (hidroxi-metil-amino-methan) e Lactose/TRIS (VALE, 2008, 2010).

Figura 8. Imagem de microscopia óptica de espermatozóides bubalinos, corado em vermelho congo e violeta genciana, em aumento de 100x. No detalhe, espermatozóide normal (N) e espermatozóide com cauda dobrada (C.D.).



Fonte: Arquivo pessoal, 2010.

4.5 ADAPTAÇÃO TÉRMICA

O ejaculado ainda fresco, logo após a colheita, em tubo, foi mantido por cinco minutos em mão fechada a uma temperatura de aproximadamente 37°C e em seguida mantida em banho-maria a 30°C por 15 minutos. Para por fim, ficar mais 15 minutos a temperatura ambiente de 22°C, depois de realizada a diluição final e antes de ser envasado .

4.6 PREPARO DOS DILUIDORES

Os diluidores foram preparados poucas horas antes de seu uso; à noite, no caso da colheita ter de ser realizada no outro dia bem cedo. A solução mãe pôde ficar preparada e guardada na geladeira por um período de máximo de aproximadamente três semanas.

Foram utilizados quatro diluidores para a congelação do sêmen bubalino: o diluidor TRIS (hidroxi-metil-amino-methan) que foi o tratamento controle, o diluidor à base de Lactose/TRIS, outro à base de Leite desnatado e um a base de Ringer-Lactato. Sendo suas respectivas composições sumarizadas em anexo (ANEXO A).

4.7 ANÁLISE DE CUSTO FINANCEIRO DOS DILUIDORES

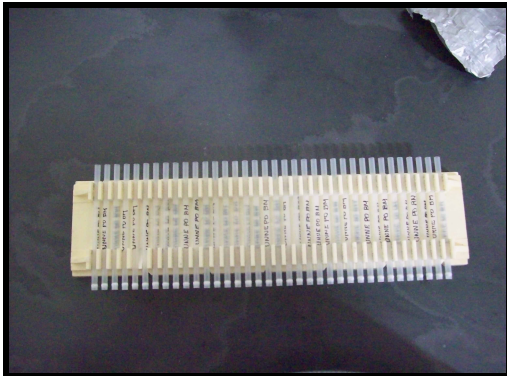
Para efeito de análise de custo financeiro de cada insumo utilizado, nos diferentes diluidores, um levantamento foi realizado junto ao mercado distribuidor, visando a apresentação dos resultados referente ao custo benefício de cada diluidor utilizado, que se encontram sumarizadas nos anexos (ANEXO B). Foi tomado como parâmetro para esta análise de custo a cotação do dólar americano.

4.8 DILUIÇÃO DO SÊMEN

Após a colheita, o sêmen aliquotado foi rapidamente pré-diluído com os diluidores (Ringer-Lactato, Leite desnatado, TRIS (hidroxi-metil-amino-methan) e Lactose/TRIS), onde se teve o devido cuidado de misturá-los lentamente, devendo tanto o sêmen quanto os diluidores estar submergidos no banho-maria a uma temperatura de 37°C. Para a diluição final os diluidores foram adicionados lentamente até alcançar uma concentração de 40×10^6 espermatozóides por dose.

Após diluição final foi realizado o envasamento manual do sêmen em minitubos de 0,25 mL previamente identificados (Figura 9 e 10).

Figura 9. Minitubos de 0,25 mL previamente identificados.



Fonte: Arquivo pessoal, 2010.

Figura 10. Envasamento manual do sêmen em Minitubos de 0,25 mL.



Fonte: Arquivo pessoal, 2010.

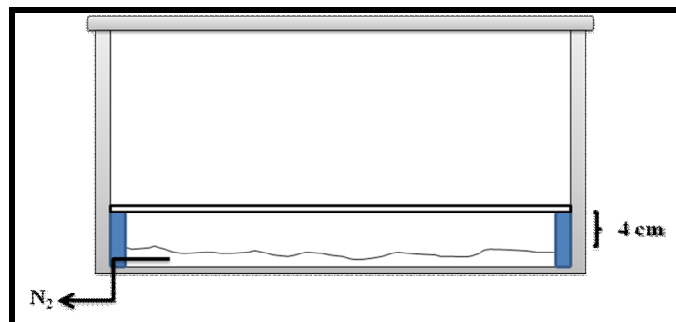
4.9 TEMPO DE EQUILÍBRIO

Consequente ao envase do sêmen, os minitubos foram condicionados em um refrigerador e resfriados a uma taxa decrescente de temperatura de $0,25^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ até alcançar 5°C , somando um total de tempo de equilíbrio de quatro horas (VALE, 1994, 2010).

4.10 CONGELAÇÃO

Após a fase de resfriamento o sêmen foi transferido a uma plataforma em vapor de nitrogênio líquido a -130°C durante 20 minutos, ficando a uma altura de 4 cm do nível do nitrogênio líquido. Assim que terminado o tempo, os minitubos foram submergidos diretamente no nitrogênio líquido, e posteriormente distribuídos e armazenados em botijões criogênicos.

Figura 11. Desenho esquemático de uma caixa isotérmica com uma plataforma de nitrogênio líquido de 4cm de altura.



Fonte: Ilustração criada pelo autor.

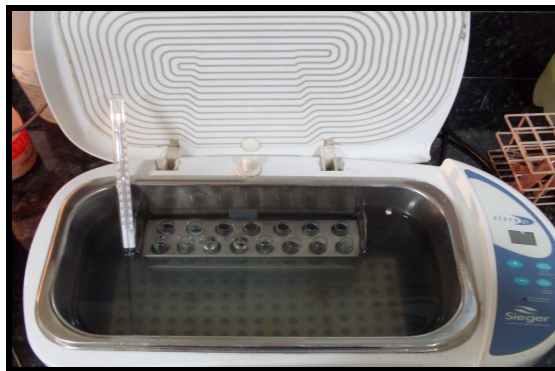
4.11 AVALIAÇÃO PÓS DESCONGELAÇÃO

As amostras devidamente identificadas foram descongeladas em água aquecida a uma temperatura de 40°C durante 30 segundos e seqüencialmente avaliadas quanto à motilidade, vigor, lesão de acrossoma, e percentual de patologias espermáticas de cada diluidor (Ringer-Lactato, Leite desnatado, TRIS (hidroxi-metil-amino-methan) e Lactose/TRIS).

4.12 TESTE DE TERMO RESISTÊNCIA (T.T.R.)

Mediante cada partida, seis doses de cada diluidor, foram submetidas ao teste de termo-resistência, as quais permaneceram incubadas em banho-maria (STERN 6[®], Sieger) à temperatura de 40°C durante 3-5 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas e 3 horas (Figura 12), onde foram avaliadas quanto à motilidade e o vigor espermático (VALE, 1994, 2008, 2010).

Figura 12. Incubação das partidas de sêmen em banho maria a temperatura de 40°C.



Fonte: Arquivo pessoal, 2010.

4.13 TESTE DE LESÃO DE ACROSSOMA

Segundo metodologia preconizada por Vale (2008) cada ejaculado foi analisado para determinar a porcentagem de lesões no acrossoma.

O exame foi realizado a partir da observação do sêmen fresco e descongelado de cada ejaculado, a partir de uma gota do sêmen pós-diluição em formal salino tamponado entre lâmina e lamínula, totalizando 200 espermatozóides de cada amostra, utilizando-se de microscópio invertido com contraste de fase, com aumento de 1000 vezes e assim classificados quanto à integridade de acrossoma, como membrana acrossômica normal, alterada, com início de desprendimento e com perda total da membrana acrossômica

(Figura 2), sendo que após esse exame, qualquer partida de sêmen congelado com mais de 50% desses defeitos foi considerada inadequada para uso em IA (VALE et al. 1991; VALE, 1994, 1997).

4.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística dos dados as variáveis foram inicialmente testadas quanto a sua distribuição utilizando o teste de Kolmogorov-Smirnov. As análises dos dados foram feitas em duas etapas, inicialmente foi realizada a comparação entre o sêmen fresco e o sêmen diluído em cada um dos diluidores individualmente, neste caso considerando como amostras dependentes. Para tal utilizou-se o teste de Mann-Witney para as variáveis com distribuição não normal e o teste T pareado para variáveis com distribuição normal.

Para comparação entre os diluidores os dados foram considerados como independentes e optou-se pela utilização do teste de Kruskal-Wallis para variáveis com distribuição não normal e análise de variância (ANOVA) seguido de teste T de Tukey para comparação de médias nas variáveis com distribuição normal.

Para análise do teste de termoresistência foram realizadas análises intra e entre grupos. Na análise intra-grupo, comparou-se cada um dos tempos avaliados com o tempo 3-5 minutos, considerado como basal, individualmente entre cada um dos diluidores. Para avaliação entre grupos, os quatro diluidores foram comparados separadamente em cada um dos tempos avaliados.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando software estatístico Minitab versão 14 (MINITAB, 2000) e seguindo as recomendações de Sampaio (2002). Foi adotado um nível de significância de 5%.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO SÊMEN NA FASE PRÉ-CONGELAÇÃO.

Os dados obtidos a partir de 71 ejaculados de três touros bubalinos, na fase de pré-congelação, referente às características físico-químicas espermáticas analisadas (volume, cor, aspecto, turbilhonamento, concentração espermática, pH, motilidade espermática, vigor, defeitos maiores, menores e totais e integridade de acrossoma), encontram-se sumarizadas na Tabela 1.

Tabela 1- Média \pm Desvio padrão dos parâmetros físico-químicos do sêmen *in-natura* (n=71) de três touros bubalinos, na fase pré-congelação.

Parâmetros	Valor
Volume (mL)	3,38 \pm 2,24
Turbilhonamento (0-5)	4,21 \pm 0,61
Concentração ($\times 10^9$ sptz/mL)	1,33 \pm 0,52
pH	7,1 \pm 0,65
Motilidade Progressiva (0-100%)	86,67 \pm 6,17
Vigor (0-5)	4 \pm 0,39
Defeitos Menores (%)	4,12 \pm 1,92
Defeitos Maiores (%)	8,19 \pm 1,99
Defeitos Totais (%)	7,92 \pm 0,24
Integridade de Acrossoma (%)	97,85 \pm 0,6

Fonte: Pesquisa de laboratório, 2010.

Os resultados referentes aos parâmetros físico-químico do sêmen *in natura* encontram-se dentro dos valores preconizados para a espécie bubalina e satisfatórios para o processo de congelação, que, segundo Vale (1997), o padrão normal para o volume é de 3,0mL, podendo variar de 2,0 a 8,0mL, cor e aspecto Branco, branco-leitoso, com estrias escuro-azulado, turbilhonamento espermático superior a 3,0 (escala de 0-5,0), concentração espermática de $0,6 \times 10^9$ a $1,2 \times 10^9$ espermatozóide por mL, pH de 6,7 a 7,5, motilidade progressiva superior a 70%, vigor espermático superior a 3,0 (escala de 0-5,0), patologias espermáticas totais inferior a 30% e menos de 50% de alterações acrossômicas.

As médias de motilidade em sêmen *in natura* também foram superiores aos resultados obtidos por Rajamahendran e Dharmasena (1984) que descreveram motilidade média de 70,1%, aos de Amstalden et al. (1993), com 65,5 \pm 18,3%, aos de Misra et al. (1994), com 71,4%, aos de Barnabe et al. (1994), com 75%, aos de Fritsch

(1994) de $78,29 \pm 6,29\%$, Vale (1997) com $85,78\%$; Balieiro (1993) com médias de $85,78 \pm 5,97\%$; Abdel-Khalek et al. (2008), com médias de $68,1 \pm 1,6\%$, e Fatih et al. (2010) com médias de $80,05 \pm 3,79\%$.

Resultados estes também superaram aos relatados por Chacur (1996), Silva et al. (2002a) e Castro (2010), com médias de motilidades e vigor espermático de $78,2 \pm 2,4\%$ e $3,4$; $80 \pm 7,38\%$ e $3,17 \pm 0,71$; $77,7 \pm 6,1\%$ e $3,8 \pm 0,6$, respectivamente, observado na espécie bubalina. Porém, inferiores aos observados por Dhami e Sahni (1994), com $87,5 \pm 1,09\%$ e aos de Hashemi et al. (2007) com $89,86 \pm 0,64\%$;

O vigor espermático também foi superior aos reportados por Raizada et al. (1990) com $3,3$ e Nahúm (2000) que trabalhando com raças Mediterrânea e Murrah encontrou média de $3,11 \pm 0,69$.

A excelente qualidade do ejaculado, demonstra, provavelmente, que os animais são fruto de um grande rigor de seleção dos touros, segundo padrões zootécnicos e sanitários, recomendado pelo ministério da agricultura e critérios técnicos utilizados para a criopreservação.

5.2 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO SÊMEN NA FASE PÓS-DESCONGELAÇÃO

5.2.1 Motilidade espermática

Após descongelamento do sêmen, observou-se redução numérica estatística ($p < 0,05$) na avaliação da motilidade espermática (Tabela 2). O sêmen *in natura* apresentou $86,67 \pm 6,17\%$ de motilidade reduzindo após descongelamento para $70 \pm 6,92\%$ no diluidor TRIS, $67,4 \pm 8,01\%$ no diluidor Ringer-Lactato, $67,09 \pm 9,03\%$ no diluidor Lactose/TRIS e $59,7 \pm 9,05\%$ no diluidor leite desnatado. Ao se comparar as motilidades espermáticas pós-descongelamento entre os tratamentos apenas o Leite desnatado mostrou diferença estatística significativa ($p < 0,05$) (tabela 2).

Tabela 2 – Análise comparativa da Média \pm Desvio padrão da motilidade progressiva (%) de sêmen bubalino, na fase de pré-congelação (Sêmen *in natura*) e pós-descongelamento nos diluidores TRIS (hidroxi-metil-amino-methan), Ringer-Lactato, Lactose/TRIS e Leite desnatado.

Grupos	Motilidade (%)
Sêmen <i>in natura</i>	86,67 \pm 6,17 ^{Aa}
TRIS	70 \pm 6,92 ^{Bb}
Ringer-Lactato	67,4 \pm 8,01 ^{Bb}
Lactose/TRIS	67,09 \pm 9,03 ^{Bb}
Leite desnatado	59,7 \pm 9,05 ^{Bc}

Letras maiúsculas distintas na mesma coluna em relação ao sêmen fresco diferem estatisticamente pelo teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

Letras minúsculas distintas na coluna significa diferença estatística pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$)

Fonte: Pesquisa de laboratório, 2010.

Apesar dessa redução, que segundo Oba et al. (1993) varia de 32,5 a 58,8% após processo de congelação e descongelamento. Segundo Vale (2008) tais resultados ainda encontram-se dentro dos padrões normais para motilidade pós-descongelamento, podendo ser destinado ao uso em programas de IA.

Na fase pós-descongelamento, resultados inferiores de motilidade progressiva espermática com diluente a base de Ringer-Lactato foram observados por Silva et al. (2002a) a qual relataram motilidades pós-descongelamento de 55 \pm 15,67% e por Nahúm (2000) que ao congelar com água de coco obteve motilidade média pós-descongelamento de 46%, que segundo Silva et al. (2002a) possui composições semelhantes à solução de Ringer-Lactato.

O diluidor TRIS apresentou motilidade pós-descongelamento de 70 \pm 6,92%, resultados inferiores, utilizando o mesmo diluidor foi observado por Rajamahendran e Dharmasena (1984) com média de motilidade progressiva de 50,2 \pm 4,1%; Haranath et al. (1990) 55,64 \pm 0,86%; Oba et al. (1993) 41,2 \pm 17,5%; Fritsch (1994) 65,57 \pm 10,73%; Misra et al. (1994) 60,8%; Chacur (1996) 61,5%, com 3 horas de tempo de equilíbrio, Abdel-Khalek et al. (2008) 63,5%; Fatih et al. (2010) 39,83 \pm 0,64%; Singh (2010) 48,1 \pm 1,9%, Ansari et al. (2010) associando ao diluidor TRIS 2,0 mM de glutatona com médias de 56,7%, Swelum et al. (2011) 61,75 \pm 0,85% e Ansari et al. (2011) 45%.

Resultados próximos a este estudo foram obtidos por Hashemi et al. (2007) utilizando TRIS-Ácido cítrico-frutose-glicerol com médias de motilidades pós-descongelamento de 71,56 \pm 1,21%.

Não houve diferença estatística do diluidor Lactose/TRIS quando comparado ao TRIS, resultado este também observado por Dhami e Kodagali (1990) que ao comparar TRIS e Lactose não observaram diferenças estatísticas entre os tratamentos.

Resultados inferiores a $67,09 \pm 9,03\%$ com diluidor a base de lactose foram observados por Avenell (1982), descrevendo motilidades médias pós-descongelção de 60% em Lactose; Siddique et al. (2006) com motilidades de $45,9 \pm 5,2\%$, diluindo em TRIS-Lactose-frutose-ácido cítrico-gema de ovo glicerol; Ahmad (1984) em diluidor a base de lactose com médias de $40 \pm 1,43\%$, quando descongelando à 37°C por 15 segundos e $50 \pm 0,99\%$ à 75°C por 9 segundos.

No diluidor Leite desnatado com motilidades pós-descongelção de $59,7 \pm 9,05\%$ foram superiores aos encontrados por Ohashi (1993) que com o diluidor a base de Citrato-Leite e Lactose obteve motilidade pós-descongelção abaixo de 20% e 30%, respectivamente, e Swelum et al. (2011) que ao utilizarem Leite desnatado-glicerol obtiveram motilidades pós-descongelção de $56,6 \pm 0,76\%$ e El-Gawad e Allah (2011), que resfriando por duas horas e equilibrando por duas horas, obtiveram médias de motilidade de $42,6 \pm 0,5\%$.

Ao comparar o tratamento Leite desnatado ao TRIS (grupo controle) observou-se diferenças estatísticas entre as motilidades pós-descongelção de TRIS $70 \pm 6,92\%$ e Leite desnatado $59,7 \pm 9,05\%$. Essa superioridade do TRIS foi observada por Swelum et al. (2011) onde conseguiram obter motilidades pós-descongelção em TRIS de $61,75 \pm 0,85\%$ contra $56,6 \pm 0,76\%$ em Leite desnatado. Por outro lado, El-Gawad e Allah (2011) observaram motilidades superiores pós-descongelção em Leite de $42,6 \pm 0,5\%$ ao diluidor a base de TRIS com $38,7 \pm 1,2\%$. Por sua vez, Dhami et al. (1996) quando compararam a motilidade pós-descongelção com sêmen diluído a base de TRIS ao Leite não conseguiram obter alguma diferença estatística.

5.2.2 Vigor espermático

Os resultados para vigor espermático estão demonstrados na tabela 3. Na Fase pré-congelção, o vigor foi de $4 \pm 0,39$ e diminuiu estatisticamente para a fase pós-descongelção ($p < 0,05$) em todos os tratamentos, sendo reflexo do aparecimento de alterações na morfologia espermática com aumento de patologias que provocam diminuição da motilidade e do vigor espermático, visto que a congelção e a

descongelamento provocam danos sérios aos espermatozoides (LAHNSTEINER et al., 1996).

Tabela 3 – Análise comparativa da Média \pm Desvio padrão do vigor espermático (%) de sêmen bubalino, na fase de pré-congelamento (Sêmen *in natura*) e pós-descongelamento nos diluidores TRIS (hidroxi-metil-amino-methan), Ringer-Lactato, Lactose/TRIS e Leite desnatado.

Grupos	Vigor (%)
Sêmen <i>in natura</i>	4 \pm 0,39 ^{Aa}
TRIS	3,50 \pm 0,53 ^{Bb}
Ringer-Lactato	3,38 \pm 0,49 ^{Bbc}
Lactose/TRIS	3,3 \pm 0,46 ^{Bbc}
Leite desnatado	3,25 \pm 0,44 ^{Bc}

Letras maiúsculas distintas na mesma coluna em relação ao sêmen fresco diferem estatisticamente pelo teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

Letras minúsculas distintas na coluna significa diferença estatística pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$)

Fonte: Pesquisa de laboratório, 2010.

Este pequeno decréscimo também pode estar relacionado com o maior consumo de substrato do meio celular, principalmente a frutose, havendo uma redução da atividade metabólica espermática ao decorrer do processo, além de uma maior metabolização de ATP (ABDEL-GHAFFAR et al., 1994; KAMP et al., 2003). Daí a importância da presença do tampão TRIS na redução do metabolismo da frutose, contribuindo para a preservação da energia das células espermáticas (SILVA, 2005).

Na Fase pós-descongelamento, o vigor espermático, mostrou diferença estatística entre os tratamentos ($p < 0,05$), com valores de 3,50 \pm 0,53 para TRIS (Controle), 3,38 \pm 0,49 para Ringer-lactato, 3,3 \pm 0,46 Lactose/TRIS e 3,25 \pm 0,44 para Leite desnatado. Sendo que entre Ringer-lactato, Lactose/TRIS e Leite desnatado não foi observado diferença estatística ($p > 0,05$), apenas entre Leite desnatado e TRIS ($p < 0,05$) (tabela 3).

O vigor espermático observado no presente estudo corrobora aos reportados por Vale et al. (1984) onde obtiveram em diluidor TES-TRIS vigor de 3 e Oba et al. (1993) com vigor 3 no diluidor TES. Por outro lado, foram superiores aos observados por Silva et al. (2002a) onde obteve vigor espermático no diluidor Ringer-Lactato de 2,08 \pm 0,05; Castro (2010) utilizando TES-TRIS com 2,4 \pm 0,6; Oba et al. (1993) em diluidor TRIS 2,5 e Mota (2005) 2,3 \pm 1,10 em diluidor TES.

5.2.3 Morfologia espermática

5.2.3.1 Defeitos Menores

Na fase pré-congelação, com sêmen *in natura*, os defeitos menores observados totalizaram 3,81±1,2%. Na fase pós-descongelação, nos quatro diluidores TRIS, Ringer-Lactato, Lactato/TRIS e Leite desnatado, houve aumento numérico dos defeitos ($p<0,05$), sendo que não foram observadas diferenças estatísticas quando comparados entre si ($p>0,05$) (Tabela 4).

Para o sêmen *in natura* os defeitos menores observados neste experimento foram inferiores aos relatados por Chacur (1996) com percentuais de 7,60±1,57%, por Aguiar et al. (1996) 6,09±2,58%, em 22 búfalos Murrah e seus mestiços com idade entre 4 e 8 anos, criados de modo extensivo nos Estados de Minas Gerais e Bahia, por Sousa et al. (1998) que visualizaram 7,95% e por Garcia (2009) que observou 4,65±3,09% de defeitos menores, em estudo com machos bubalinos.

Tabela 4- Média ± Desvio padrão dos defeitos maiores, menores e totais (%) de sêmen bubalino, na fase de pré-congelação (Sêmen *in natura*) em comparação com a fase pós-descongelação nos diluidores TRIS (hidroxi-metil-amino-methan), Ringer-Lactato, Lactose/TRIS e Leite desnatado.

Grupos	Defeitos Menores (%)	Defeitos Maiores (%)	Defeitos Totais (%)
Sêmen <i>in natura</i>	3,81±1,2 ^{Aa}	4,15±1,9 ^{Aa}	7,91±2,1 ^{Aa}
TRIS (Controle)	4,67±1,1 ^{Bb}	10,51±4,4 ^{Bb}	15,18±4,7 ^{Bb}
Ringer-Lactato	4,98±1,7 ^{Bb}	11,94±4,2 ^{Bb}	16,92±4,8 ^{Bb}
Lactose/TRIS	4,93±2,0 ^{Bb}	11,88±4,8 ^{Bb}	16,82±5,6 ^{Bb}
Leite desnatado	5,09±1,5 ^{Bb}	12,01±5 ^{Bb}	17,11±5,6 ^{Bb}

Letras maiúsculas distintas na mesma coluna apresentam diferença estatística em relação ao Sêmen fresco pelo teste T pareado ($p<0,05$).

Letras minúsculas iguais na mesma coluna significa diferença estatística pelo teste de Tukey ($p<0,05$).

Fonte: Pesquisa de laboratório, 2010.

5.2.3.2 Defeitos Maiores

Na Fase pré-congelação, com sêmen *in natura*, os defeitos maiores observados totalizaram 4,15±1,92%. Na fase pós-descongelação, houve aumento numérico ($p<0,05$) para o sêmen tratado nos quatro tratamentos TRIS, Ringer-Lactato, Lactato/TRIS e Leite desnatado, sendo que não houve diferença estatística quando comparado entre eles ($p>0,05$) (Tabela 4). Sendo que este aumento das patologias maiores pode estar relacionado ao processamento do sêmen, que causam injúrias às células espermáticas,

podendo interferir na capacidade de fecundação e movimentação celular (CASTRO, 2010).

Aguiar et al. (1996), observando em sêmen *in natura* o percentual de defeitos maiores de touros bubalino obtiveram uma média de $7,05 \pm 3,63\%$, enquanto que Castro (2010) relatou $15,4 \pm 6,9\%$, e Garcia (2009) $5,79 \pm 3,17\%$, resultados estes superiores aos reportados no presente estudo. No entanto, tais resultados foram superiores aos de Chacur (1996) que chegaram a $3,52 \pm 3,45\%$ de defeitos maiores.

5.2.3.3 Defeitos totais

Na Fase pré-congelação, com sêmen *in natura*, os defeitos totais observados totalizaram $7,91 \pm 2,1\%$. Na fase pós-descongelação, houve aumento numérico ($p < 0,05$) para o sêmen tratado nos quatro diluidores (TRIS, Ringer-Lactato, Lactato/TRIS e Leite desnatado), sendo que não houve diferença estatística quando comparados entre si ($p > 0,05$) (Tabela 4).

Resultados superiores foram observados em sêmen *in natura* por Ahmad et al. (1985) que em nove touros reportaram médias de 22,21% de anormalidades espermáticas totais, por Chacur (1996) que observou $10,18 \pm 2,22\%$ e por Garcia (2009) que obteve $10,43 \pm 4,42\%$ de defeitos totais.

Na fase de pós-descongelação a média de percentual de alterações totais foram, respectivamente, para TRIS, Ringer-Lactato, Lactose/TRIS e Leite desnatado de $15,18 \pm 4,73\%$; $16,92 \pm 4,88\%$; $16,82 \pm 5,6\%$ e $17,11 \pm 5,66\%$. Resultados superiores foram observados por El-Kon (2011) relatando médias de $22,24 \pm 1,89\%$ em diluidor contendo TRIS-gema de ovo e por Swelum et al. (2011) em TRIS-gema de ovo-glicerol com $26,5 \pm 1,01\%$ e em Leite-gema de ovo-glicerol $61,1 \pm 0,74\%$ pós-descongelação.

As médias dos percentuais pós-descongelação dos diluidores TRIS, Ringer-Lactato, Lactose/TRIS e Leite desnatado para defeitos totais encontram-se todos dentro dos limites aceitáveis para a espécie bubalina que é de 30% (VALE, 1994; 1997).

5.2.4 Teste de termorresistência

5.2.4.1 Motilidade espermática

Na fase pós-TTR, a motilidade progressiva não apresentou diferença estatística significativa entre tratamentos ($p < 0,05$), conforme indicado na tabela 5. Sendo que nesta fase, o grupo TRIS (controle) apresentou motilidade progressiva após 3 horas pós-

TTR de $21,13 \pm 7,5\%$, valor acima do recomendado pelo CBRA (1998), Ribeiro et al. (1991) e Vale (2008), que é mínimo de 20% para constituir-se apto para a inseminação.

Tabela 5- Média das motilidades espermáticas \pm Desvio padrão (%) pós-descongelamento no Teste de termoresistência em cada um dos tempos avaliados (3-5 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas e 3 horas) entre os diluidores TRIS (hidroxi-metil-amino-methan), Ringer-Lactato, Lactose/TRIS e Leite desnatado.

Grupos	3-5 min	30 min	1 hora	2 hora	3 hora
TRIS	$71,13 \pm 5,3^{aA}$	$64,09 \pm 9,2^{aB}$	$50,45 \pm 8,6^{aC}$	$30,68 \pm 8,4^{aD}$	$21,13 \pm 7,5^{aE}$
Ringer	$66,05 \pm 9,1^{bA}$	$60,53 \pm 11,6^{abB}$	$48,16 \pm 11,3^{abC}$	$30,52 \pm 9,8^{aD}$	$20,78 \pm 7,4^{aE}$
Lactose	$65,38 \pm 6,8^{bA}$	$60,26 \pm 12,8^{abB}$	$50,00 \pm 14,8^{aC}$	$22,82 \pm 5,1^{bD}$	$20,25 \pm 5,3^{aE}$
Leite	$60,24 \pm 8,8^{cA}$	$56,83 \pm 11,9^{bB}$	$41,95 \pm 12,2^{bC}$	$28,39 \pm 9,8^{aD}$	$20,12 \pm 6,6^{aE}$

Valores nas colunas seguidos de letras minúsculas distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Valores seguidos de letras maiúsculas nas linhas diferem entre si pelo teste T pareado ($p < 0,05$).

Fonte: Pesquisa de laboratório, 2010.

Resultados estes superior ao resultado de Vale et al. (1984), onde relataram motilidade espermática próxima com diluidores à base de gema citrato ou leite desnatado de 20% após o TTR, aos de Ohashi (1993) que após TTR com três horas e 30 minutos no diluidor TES apresentou motilidade espermática média de 20%, e quando tratou com Citrato-gema, Lactato-Gema e Leite desnatado após 30 minutos de teste, todos os espermatozóides perderam total motilidade, aos de Castro (2010) durante TTR de três horas a 36°C , obteve em diluidor TES-TRIS motilidade progressiva de 15,1%.

No entanto, os resultados do presente estudo foram inferiores as motilidades espermáticas em TTR ao longo de três horas reportadas por Fritsch (1994) onde obteve em diluidor TES $37,82 \pm 16,94\%$, Nahúm (2000) em diluidores a base de água de coco $25,75 \pm 20,74\%$ e TES $32,92 \pm 23,04\%$ e por Silva et al. (2002a) com médias de $42,1 \pm 17,64\%$ no diluente CEBRAN II e TES $45,83 \pm 14,43\%$.

Ao longo de quase todos os momentos do TTR, os tratamentos TRIS e Ringer-Lactato não mostraram diferenças estatísticas ($p > 0,05$), com exceção aos 3-5 minutos, apresentando uma pequena superioridade do TRIS em relação ao Ringer ($p < 0,05$).

No TTR, ao comparar a Lactose/TRIS ao grupo controle (TRIS) apresentou diferença estatística apenas aos 3-5 minutos e às duas horas de observação.

Aos 3-5 minutos de TTR, o sêmen no diluidor Leite desnatado apresentou uma menor motilidade espermática quando comparado aos diluidores TRIS, Ringer-Lactato e Lactose/TRIS ($p < 0,05$) (Tabela 8), a 30 minutos não diferiu do Ringer-Lactato e

Lactose/TRIS ($p>0,05$). A uma hora se equiparou apenas ao Ringer-Lactato ($p>0,05$), às duas horas ao TRIS e Ringer-Lactato e às três horas a todos os tratamentos ($p>0,05$).

Por mais que o Leite desnatado tenha apresentando uma menor motilidade espermática quando comparado aos demais diluidores ao longo do TTR, às três horas, não mostrou diferença estatística entre os tratamentos ($p>0,05$), demonstrado assim, a habilidade do leite em sustentar a motilidade individual progressiva, a partir da capacidade do sêmen na utilização de certos componentes do leite como fonte de energia exógena (ALBRIGHT et al., 1956).

Assim, o Leite desnatado pode ser eficiente, barato e substituto disponível do TRIS para a congelação de sêmen bubalino, sendo tais conclusões também observadas por Dhimi et al (1992) e El-Gawad e Allah (2011).

5.2.4.2 Vigor espermático

No TTR, o vigor após três horas de incubação foi de $2\pm 0,4$ (TRIS- controle), $2,07\pm 0,5$ (Ringer-Lactato), $2,02\pm 0,4$ (Lactose/TRIS) e $2,00\pm 0,5$ (Leite desnatado), não havendo diferença estatística entre os tratamentos ($p>0,05$)(Tabela 6). Tais valores para vigor estão de acordo com os padrões do CBRA (1998), Ribeiro et al. (1991) e Vale (2008), que após o TTR recomenda 2,0 em uma escala de 0-5,0.

Resultados estes similares foram reportados por Nahúm (2000) que após 3 horas de TTR observou vigor espermático de $2\pm 1,36$, e $2,26\pm 1,28$ em diluidores a base de água de coco e TES, respectivamente.

Á zero hora Moose et al. (2007), observaram em diluidor a base de TRIS-I vigor de $3,06\pm 0,24$ e em TES de $3,41\pm 0,29$, resultados estes similares aos observados neste experimento, ao diluir em Gema-Lactato o mesmo autor observou vigor de $2,73\pm 0,19$ que comparando com o presente experimento foi inferior.

Tabela 6- Média do vigor \pm Desvio padrão (%) pós-descongelamento no Teste de termorresistência em cada um dos tempos avaliados (3-5 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas e 3 horas) entre os diluidores TRIS (hidroxi-metil-amino-methan), Ringer-Lactato, Lactose/TRIS e Leite desnatado.

Grupos	3-5 min	30 min	1 hora	2 hora	3 hora
TRIS	3,61 \pm 0,4 ^{aA}	3,02 \pm 0,1 ^{aB}	2,93 \pm 0,2 ^{aC}	2,61 \pm 0,5 ^{aD}	2,04 \pm 0,5 ^{aE}
Ringer	3,5 \pm 0,55 ^{bA}	3,13 \pm 0,4 ^{abB}	2,81 \pm 0,4 ^{abC}	2,65 \pm 0,6 ^{aD}	2,07 \pm 0,5 ^{aE}
Lactose	3,4 \pm 0,59 ^{bA}	3,07 \pm 0,3 ^{abB}	2,92 \pm 0,3 ^{aC}	2,52 \pm 0,6 ^{bD}	2,02 \pm 0,4 ^{aE}
Leite	3,39 \pm 0,54 ^{cA}	3,17 \pm 0,4 ^{bB}	2,90 \pm 0,3 ^{bC}	2,53 \pm 0,5 ^{aD}	2,00 \pm 0,5 ^{aE}

Valores nas colunas seguidos de letras minúsculas distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Valores seguidos de letras maiúsculas nas linhas diferem entre si pelo teste T pareado ($p < 0,05$).

Fonte: Pesquisa de laboratório, 2010.

5.2.5 Integridade de acrossoma

O sêmen *in natura* apresentou percentual de integridade de acrossoma de 97,85 \pm 0,6%. Após a descongelamento, houve diminuição ($p < 0,05$), no TRIS com 91,65 \pm 4,3%, no Ringer-Lactato 90,46 \pm 4,8%, em Lactose/TRIS 89,76 \pm 5,4% e em Leite desnatado 90,56 \pm 5,6% (Tabela 7). Quando se comparou tal parâmetro entre os tratamentos pós-descongelamento, não houve diferenças estatísticas significativas ($p > 0,05$).

Apesar dessa redução, em virtude do processo de congelamento e descongelamento, tais resultados encontram-se dentro dos padrões normais para integridade de acrossoma pré e pós-descongelamento para a espécie, apresentando menos de 50% de lesões, podendo ser destinado ao uso em programas de IA (VALE et al., 1991; VALE, 1994; 1997).

Tabela 7- Média \pm Desvio padrão da Integridade de acrossoma (%) de sêmen bubalino, na fase de pré-congelamento (Sêmen *in natura*) em comparação com a fase pós-descongelamento nos diluidores TRIS (hidroxi-metil-amino-methan), Ringer-Lactato, Lactose/TRIS e Leite desnatado.

Grupos	Integridade de Acrossoma (%)
Sêmen <i>in natura</i>	97,85 \pm 0,6 ^{Aa}
TRIS (Controle)	91,65 \pm 4,3 ^{Bb}
Ringer-Lactato	90,46 \pm 4,8 ^{Bb}
Lactose/TRIS	89,76 \pm 5,4 ^{Bb}
Leite desnatado	90,56 \pm 5,6 ^{Bb}

Diferença em relação ao sêmen fresco pelo teste T pareado ($p < 0,05$).

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna significam diferença estatística pelo teste Tukey ($p < 0,05$)

Fonte: Pesquisa de laboratório, 2010.

Resultados superiores, ao presente trabalho, de integridade de acrossoma em sêmen *in natura* foram observados por Fritsch (1994) que relatou 98,4% e por Castro (2010) que observou apenas $1,1\pm 0,8\%$ de defeitos de acrossoma na fase pré-congelação e inferiores por Singh et al. (2007) que observaram $80,2\pm 1,08\%$ e por Abdel-Khalek et al. (2008) que obtiveram $84,9\pm 1\%$.

Após descongelação, resultados um pouco superior a este estudo foram observados por Ansari et al. (2011) que em diluidor a base de TRIS-Ácido cítrico-gema de ovo, contendo 1,0 mM de cisteína, registrou integridades acrossômica de $92\pm 1,2\%$, por Rahman et al. (1988) em TRIS de 92,4% e por Nahúm (2000) que observou em água de coco 92,85% de integridade de acrossoma.

Por outro lado, inferiores por Fritsch (1994) com integridades acrossômicas em TRIS de 97,93% e em TES de 98,38%, por Mota (2005) relatando percentuais médios de 98,5% e por Castro (2010) onde observou apenas $0,4\pm 0,6\%$ de defeitos de acrossoma em TES-TRIS; $0,4\pm 0,6\%$ em (TES-TRIS+Vitamina C), $0,5\pm 0,6\%$ em (TES-TRIS+Pentoxifilina) e $0,6\pm 0,5\%$ em (TES-TRIS+Vitamina C+Pentoxifilina).

E por fim, superiores após descongelação aos de Rahman et al. (1988) que observaram alterações acrossômica de $19,4\pm 0,02\%$ em Citrato, aos de Rasul et al. (2000) em TES-TRIS com 53,2%, aos de Singh et al. (2007) em TRIS-ácido cítrico-frutose com $71,8\pm 1,08\%$ e em TRIS-ácido cítrico-frutose com heparina de $24,8\pm 1,25\%$, aos de Singh (2010) em TRIS de $17,6\pm 1,0\%$, aos de Akhter et al. (2010a) em TRIS-Ácido cítrico-gema de ovo de $82,9\pm 0,5\%$ e em Bioxcell[®] de $80,7\pm 0,5\%$, aos de El-Kon (2011) em TRIS-gema de ovo de $45,6\pm 1,2\%$, em TRIS suplementado com 10% de BSA e com 15% de BSA com percentuais médios de integridade de $65,48\pm 2,4\%$ e $66,46\pm 2,4\%$, respectivamente, aos de Ansari et al. (2011) em TRIS-Ácido cítrico-gema de ovo apresentando 80% e aos de Swelum et al. (2011) em TRIS-gema de ovo-glicerol com $65,60\pm 1,01\%$ e em Leite-gema de ovo-glicerol com $61,1\pm 0,74\%$, verificando diferença estatística entre os dois tratamentos ($p<0,05$), diferente aos observado no presente experimento que ao comparar TRIS ao Leite desnatado não se observou diferença estatística ($p>0,05$).

5.3 ANÁLISE DE CUSTO FINANCEIRO DOS DILUIDORES

A partir de uma análise de custo financeiro de cada insumo utilizado, nos diluidores TRIS, Lactose/ TRIS, Leite desnatado e Ringer Lactato, o custo para

produção de 100 mL de diluidor, em reais foi de 13,48; 29,63; 13,55 e 12,00, respectivamente (ANEXO 2).

Tabela 8- Valor monetário em reais do custo de insumos utilizados para produção de 100mL de diluidor.

Diluidor	Preço (R\$)/ 100mL
TRIS	13,48
LACTOSE/TRIS	29,63
LEITE DESNATADO	13,55
RINGER -LACTATO	12,00

Fonte: Soma de dados obtidos de sites de diferentes distribuidores.

Ao comparar entre os quatro diluidores, o ringer-lactato foi o que apresentou um menor custo comparado aos demais diluidores, como também observado por Silva et al. (2002a) que achou uma redução de 12% por dose produzida comparado ao diluidor TES. Desta forma, o Ringer-Lactato foi o que apresentou uma maior relação custo-benefício quando comparado aos demais diluidores, já que além de apresentar menor custo também apresentou satisfatória habilidade de preservação das células espermáticas.

7. CONCLUSÃO

Com base nos resultados do presente estudo é possível concluir que a congelação de sêmen de búfalo com os diluidores TRIS (Tris-hidroxi-metil-amino-ethan), Ringer-Lactato, Lactose/TRIS, e Leite desnatado mostraram satisfatória função de crioproteção na viabilidade espermática do sêmen nas diferentes etapas da criopreservação, podendo ser o Ringer-Lactato, Lactose/TRIS e o Leite desnatado substitutivos disponíveis para o TRIS na crioproteção de sêmen bubalino como alternativas práticas e econômicas.

REFERÊNCIAS

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS CRIADORES DE BÚFALOS-ABCB. Associação criadora de búfalo. Disponível: <www.bufalo.com.br> Acesso: em 10 Agosto 2011.
- ABDEL-GHAFFAR, A. E.; EL-AZAB, A. I.; EL-DAWY, K. H. Rabbit semen metabolism. **CIHEAM - Options Mediterraneennes**, v.8, p.305-312, 1994.
- ABDEL-KHALEK, A. E. et al. Semen Quality of Holstein and Buffalo Bulls after Filtration using Sephadex Column. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v.15, n.1, p.91-97, 2008.
- ALBERTS, B. et al. **Organização interna da célula: Estrutura da membrana**. In: **Biologia Molecular da Célula**. 4º. Ed., Porto Alegre: Artmed, Cap.10, 2004. p.583-595.
- ALBRIGHT, J. L.; EHLER, M. H.; ERB, R. F. Motility of sperm in milk diluent with and without seminal plasma. **Journal of Dairy Science**, v.39, p.922-925, 1956.
- AGUIAR, P. H. P. et al. Aspectos físicos e morfológicos e pH do sêmen de reprodutores bubalinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.48, n.3, p.325-31, 1996.
- AHMAD, K.; CHAUDHRY, R. A. Cryopreservation of buffalo semen. **Veterinary Record**, v.106, p.199-201, 1980.
- AHMAD, M. et al. Age-related changes in body weight, scrotal size and plasma testosterone levels in buffalo bulls (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, v.22, p.651-656. 1985.
- AHMAD, K. Effect of Thaw Rates on Survival of Buffalo Spermatozoa Frozen in Straws. **Journal of Dairy Science**. v.67, p.1535-1538, 1984.
- AIRES, V. A. 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.
- AISEN, E. G.; MEDINA, V. H.; VENTURINO, A. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. **Theriogenology**, v.57, p.1801-1808, 2002.
- AKHTER, S. et al. Cryopreservation of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen in Bioxcell® extender. **Theriogenology**, v.74, n.6, p.951-955, 2010a.
- AKHTER, S. et al. Effect of Fructose Addition in Skim Milk Extender on the Quality of Liquid Nili-Ravi Buffalo (*Bubalus bubalis*) Semen. **Pakistan Journal of Zoology**. v. 42, n.3, p.227-231, 2010b.

AKHTER, S. et al. Storage of Nili-Ravi Buffalo (*Bubalus bubalis*) Semen in Skim Milk Extender Supplemented with Ascorbic Acid and α -Tocopherol. **Pakistan Journal of Zoology**, v.43, n.2, p.273-277, 2011.

ALA UD, D.; CHAUDHRY, R. A.; AHMAD, K. Effect of different extenders on freezability of buffalo semen. **Pakistan Veterinary Journal**, v.1, p.59-61, 1981.

AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principle of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.7, p.147, 1987.

AMMAN, R. P.; GRAHAM, J. K. Spermatozoal function. In: MCKINNON, A. O.; VOSS, J. L. **Equine Reproduction**. Philadelphia, London: Lea & Febiger, 1993, p.715-745.

AMSTALDEN, M. et al. Estudo parcial das características quantitativas e qualitativas do sêmen bubalino. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL,10.,1993, Belo Horizonte. **Anais...** Minas Gerais, 1993. p.335.

ANDRABI, S. M. H. et al. Effect of reducing sperm numbers per insemination dose on fertility of cryopreserved buffalo bull semen. **Pakistan Veterinary Journal**, v.26, p.17-19, 2006.

ANDRABI, S. M. H. Factors Affecting the quality of cryopreserved buffalo (*Bubalus bubalis*) bull Spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v.44, p.552-569, 2009.

ANSARI, M. S. et al. Effect of exogenous glutathione in extender on the freezability of Nili-Ravi buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. **Animal Science Papers and Reports**, v.28 n.3, p.235-244, 2010.

ANSARI, M. S. et al. Effect of L-Cysteine in Tris-citric Egg Yolk Extender on Post-Thaw Quality of Nili-Ravi Buffalo (*Bubalus bubalis*) Bull Spermatozoa. **Paquistão Journal of Zoology**, v.43, n.1, p.41-47, 2011.

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

BALL, B. A.; VO, A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectant on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential. **Journal of Andrology**, v.22, p.1061-1069, 2001.

BALIEIRO, K. R. C. Efeito dos diluidores e das temperaturas de descongelamento sobre a motilidade progressiva e integridade de acrossoma de espermatóides de búfalos Murrah (*Bubalus bubalis*). 1993. 47f. Dissertação (Mestrado em reprodução animal)- Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1993.

BARNABE, V. H. et al. Artificial insemination of buffaloes using two different diluents. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 4., v. 3, 1994, São Paulo. **Proceedings...** São Paulo, 1994, p.547-548.

BASIROV, E. B. The biology of reproduction and artificial insemination of buffaloes. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 5., 1964, Trento. **Proceedings...**Trento, 1964. p.4-10.

BECKER, W. C., SENGER, P. L., AALSETH, E. P. Influence of glycerol levels, diluent and post-thaw temperature on motility and acrossomal maintenance in bovine semen frozen in plastic straws. **Journal Animal Science**, v.44, p.1067-1071, 1977.

BERGERON, A. et al. Low-density lipoprotein fraction from hen`s egg yolk decreases the binding of the major protein of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. **Biology Reproduction**, v.70, p.708-717, 2004.

BHATTACHARYA, P., SRIVASTAVA, P. N. Studies in deep freezing of buffalo semen. In: INDIAN SCIENCE CONGRESS, 42., v.3, 1955, Baroda. **Anais...** Baroda, 1955. p.348

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

BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of bull spermogram. In: SIMPOSIO INTERNAZIONALE DI ZOOTECNIA, 7., 1972, Milano, **Proceedings...** Milano, 1972. p.125-139.

BOSSEAU, S. 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**, v.50, p.699-706, 1998.

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

BHOSREKAR, M.; GANGULI, N. C. Preservation characteristics of buffalo semen in citric acid-whey as an extender. **Journal of Reproduction and Fertility**. v.48, p.215-216, 1976.

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

CASTRO, S. R. S. **Uso de antioxidantes para elevação da qualidade do sêmen criopreservado de búfalos (*Bubalus bubalis*)**. 2010. 71f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)- Universidade Federal do Pará, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária da Amazônia Oriental, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2010.

CEROVSKY, J. A new staining procedure for boar spermatozoa. **Zivocisna Vyroba**. v.21, p.361-362, 1976.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL - CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49p.

CHACUR, M. G. M. **Avaliação da congelação de sêmen bubalino com os diluidores Glicina-gema, Tryladil® e TES em diferentes tempos de equilíbrio**. 1996. 105f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal)- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1996.

CHAN, P. J. et al. Correlation between intact sperm acrosome using the Spermac stain and sperm fertilizing capacity. **Archives of Andrology**, v.36, p.25-27, 1996.

COOPER, G. M. **The cell: a molecular approach**. 1 ed., ASN Press: Washington, 1996, 673p.

CORREA, J. R.; PACE, M. M.; ZAVOS, P. M. Relationships among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an artificial insemination program. **Theriogenology**. v.48. p.721-731, 1997.

CROWE, J. H. et al. Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. **Biochemical Journal**, v.242, p.1-10, 1987.

DALIMATA, A. M., GRAHAM, J. K. Criopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with trehalose and methyl cellulose. **Theriogenology**, v.48, p.831-841, 1997.

DE LEEUW, F. E. V. et al. Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. **Cryobiology**, v.30, p.32-44, 1993.

DEL SORBO, C. et al. Piruvato quale substrato energetico in extenders crioprotettivi. Effetti sulla motilità a allo scongelamento di spermatozoi bufalini *Bubalus bubalis*. In: MEETING NAZIONALE "STUDIO SULLA EFFICIENZA RIPRODUTTIVA DEGLI ANIMALI DI INTERESSE ZOOTECNICO", 7., v.1, 1995, Bergamo, **Proceedings...**Bergamo, 1995. p.585-588.

DHAMI, A. J.; KODAGALI, S. B. Freezability, enzyme leakage and fertility of buffalo spermatozoa in relation to the quality of semen ejaculates and extenders. **Theriogenology**, v.34, n.5, p.853-863, 1990.

DHAMI, A. J.; SAHNI, K. L.; MOHAN, G. Effect of various cooling rates (from 30 deg to 5°C) and thawing temperatures on the deep-freezing of *Bos taurus* and *Bos bubalis* semen. **Theriogenology**, v.38, p.565-574, 1992.

DHAMI, A. J.; SAHNI, K. L. Effects of various cooling from 30°C to 5°C, equilibration and diluents treatments on freezability, post-thaw thermoresistance,

enzyme leakage and fertility of bubaline spermatozoa. **Buffalo Journal**, v.2, p.147-159, 1994.

DHAMI , A. J. et al. Effects of different variables on the freezability, post-thaw longevity and fertility of buffalo spermatozoa in the tropics. **Theriogenology**, v.46, n.1, p.109-120, 1996.

DIXIT, V. B.; SIKKA, P. Buffalo scenario in Indian animal husbandry. In: INDO-CHINA SYMPOSIUM ON BUFFALO PRODUCTION, 2009, Hisar. **Anais...Hisar: CIRB**, 2009. p.14-16.

EL-GAWAD, E. M. M. A.; ALLAH, S. M. A. **Evaluation of different semen processing for effects on deep-freezing, enzyme leakage and fertility of buffalo spermatozoa.** Dept. of Theriogenology, Fac. Vet. Med., Beni-Suef University. Disponível em: <http://bsu-eg.academia.edu/SaberAbdAllah/Papers/507927/EVALUATION_OF_DIFFERENT_SEMEN_PROCESSING_FOR_EFFECTS_ON_DEEP-FREEZING_ENZYME_LEAKAGE_AND_FERTILITY_OF_BUFFALO_SPERMATOZOA> Acesso em: 20 Dezembro 2011.

EL-KON, I. Testing Usability of Bovine Serum Albumin (BSA) for Preservation of Egyptian Buffalo Semen. **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Science**, v.11, n.4, p.495-502, 2011.

ENGLAND, G. C. W. Cryopreservation of dog semen: a review. **Journal of reproduction and fertility Supplement**, v.47, p.243-255, 1993.

FAHY, G. M. The relevance of cryoprotectant “toxicity” to cryobiology. **Cryobiology**, v.23, n.1, p.1-13, 1986.

FAHY, G. M. et al. Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: in search of molecular mechanisms. **Cryobiology**, v.27, p.247-268, 1990.

FARSTAD, W. Semen cryopreservation in dogs and foxes. **Animal Reproduction Science**, v.42, p.251-260, 1996.

FATIH, A. et al. Effect of different egg yolk levels on post thaw quality of Kundhi buffalo bull semen. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 9., 2010, Buenos Aires, **Proceedings...Buenos Aires**, 2010, p.864-266.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION - FAO. **FAOSTAT: Agriculture, 2009.** Disponível em: <[Http://faostat.fao.org/site/573/DesktopDefault.aspx?PageID=573#ancor](http://faostat.fao.org/site/573/DesktopDefault.aspx?PageID=573#ancor)>. Acesso: 18 abril 2011.

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

GANGULI, N. C.; BHOSREKAR M.; STEPHAN, J. Milk whey as a diluent for buffalo semen. **Journal of Reproduction and Fertility**. v.35, p.355-358, 1973.

GARCIA, O. S. **Estudo experimental da insulação testicular em bubalinos**. 2009. 68f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)- Universidade Federal do Pará, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária da Amazônia Oriental, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2009.

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

GARNER, D. L.; HAFEZ, E. S. E. Espermatozoides e plasma seminal. In: HAFEZ, E. S. E; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7° Ed., Barueri: Manole, 2004, p. 97-110.

GODIM, D. et al. Métodos de congelamento *One Step* e *Two Steps* do sêmen de cães, diluído em solução de água de coco e etilenoglicol. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.10, n.2, p.417-422, 2009.

GONZALEZ, R. A. F. **Efeito da criopreservação usando diferentes técnicas de congelação e crioprotetores sobre parâmetros espermáticos e a integridade de membranas do espermatozói de bovino**. 2004. 92f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2004.

GRAHAM, J. K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.12, p.131-147, 1996.

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, 1995. p.83-95.

GUTHRIE, H. D.; LIU, J.; CRITSER, J. K. Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v.67, p.1811-1816, 2002.

HAMMERSTEDT, R. H., GRAHAN, J. K. Cryopreservation of mammalian sperm: the enigma of glycerol. **Cryobiology**, v.29, p.26-38, 1992.

HARANATH, G. B. et al. Freezability of semen and fertility of frozen semen packaged in mini and medium French straws: a note. In: World Buffalo Congress held in India, 2., v.3, 1988, India. **Proceedings...**India: Physiology and reproduction , 1990. p.87-88.

HASHEMI, A. et al. Effect of Extender on Sperm Motility and Acrosomal Integrity of Frozen Buffalo Sperm. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v.6, n.11, p.1340-1342, 2007.

HOLT, W. V.; HEAD, M. F.; NORTH, R. D. Freeze-induced membrane damage in ram spermatozoa is manifested after thawing-observations with experimental cryomicroscopy. **Biology Reproduction**, v. 46, p.1086-1094, 1992.

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

IBGE. **Produção da Pecuária Municipal** - 2009. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/>>. Acesso: 18 novembro 2011.

JASKO, D. J. Procedures for cooling and freezing of equine semen. **Ars Veterinária**, v.10, p.156-165, 1994. Acesso: 30/04/2012.

JONES, R. T.; MARTIN, I. C. A. The effects of dilution, egg yolk and cooling to 5°C on the ultrastructure of ram spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.35, p.311-320, 1973.

KALLET, R. H. et al. The treatment of acidosis in acute lung injury with Tris-Hydroxymethyl-Aminomethane (THAM). **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v.161, p.1149-1153, 2000.

KAMP, G. et al. Energy metabolism and intracellular pH in boar spermatozoa. **Reproduction**, v.126, p.517-525, 2003.

KAWAKAMI, E. et al. Induction of acrosome reactions of canine sperm by homologous zona pellucida. **Biology of Reproduction**, v.48, p.841-845, 1993.

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

KUMAR, S.; SAHNI, K. L.; MOHAN, G. Effect of different levels of glycerol and yolk on freezing and storage of buffalo semen in milk, tris and sodium citrate buffers. **Buffalo Journal**, v.2, p.151-156, 1992.

KUMAR, S. et al. Effect of various levels of yolk on deep freezing and storage of buffalo semen in different diluters without adding glycerol. **Buffalo Journal**, v.1, p.79-85, 1993.

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

KUNDU, C. et al. Development of a simple sperm cryopreservation model using a chemical defined medium and the goat caudal epididymal spermatozoa. **Cryobiology**, v.40, p.117-125, 2000.

LAHNSTEINER, F. et al. Changes in morphology, physiology, metabolism, and fertilization capacity of rainbow trout semen following cryopreservation. **The Progressive Fish-Culturist**, v.58, n.3, p.149-156, 1996.

LINDE-FORSBERG, C. Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extend semen. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v.21, p.467-485, 1991.

LIU, Z.; FOOTE, H. R.; BROCKETT, C. C. Survival of bull sperm frozen at different rates in media varying in osmolality. **Cryobiology**, v.37, p.219-230, 1998.

LOVELOCK, J. E., POLGE, C. The immobilization of spermatozoa by freezing and thawing and the protective action of glycerol. **Biochemical Journal**, v.58, p.318-322, 1954.

McPHAIL, D. B., GOODMAN, B. A. Tris buffer – a case for caution in its use for cooper containing systems. **Biochemical Journal**, v.221, p.559-560, 1984.

MARSHALL, C. E. Considerations for cryopreservation of semen. **Zoo Biology**, v.3, p.343-356, 1984.

MARTIN, C. E. G. **Efeito da lipoproteína de baixa densidade sobre algumas características funcionais dos espermatozoides eqüinos criopreservados**. 2005. 17f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias)- Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2005.

MAZUR, P. Equilibrium, quasi-equilibrium and nonequilibrium freezing of mammalian embryos. **Cell Biophysical**, v.17, p.53-92.1990.

McLAUGHLIN, E. A., FORD, W. C. L., HULL, M. G. R. The contribution of the toxicity of a glycerol-egg yolk-citrate cryopreservative to the decline in human sperm motility during cryopreservation. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.95, p.749-754, 1992.

MEDEIROS, C. M. O. et al. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**, v.57, p.327-344, 2002a.

MEDEIROS, A. S. L. et al. Cryopreservation of stallion sperm using different amides. **Theriogenology**, v.58, p.273-276, 2002b.

MEYERS, S. A. Spermatozoa response to osmotic stress. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.57-64, 2005.

MINITAB. **The student edition of MINITAB statistical software adapted for education**: 13.0 release; user's manual. New York: Wesley, 2000. 624 p.

MISRA, A.K. et al. Buffalo semen characteristics and its freezability under indian conditions. In: World Buffalo Congress, 9., v.3, São Paulo, **Proceedings...**São Paulo, 1994. p. 495-497.

MOTA, A. V. **Identificação de espermatozóides portadores do cromossomo X em búfalos (*Bubalus bubalis*)**. 2005. 61f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2005.

MOOSE, G. et al. Efeito de diferentes diluidores na congelação e pós-descongelação de sêmen bubalino, submetido ao teste de termo-resistência. **Boletim da Indústria Animal**, v.64, n.3, p.233-239, 2007.

MOUSSA, M. et al. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by a easy method: cryoprotective effect on frozen - thawed bull semen. **Theriogenology**, v.57, p.1695-1706, 2002.

NAHÚM, B. S. **Uso da água de coco (*Cocos nucifera*) como diluidor para a criopreservação de sêmen bubalino**. 2000. 52f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)- Universidade Federal do Pará, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária da Amazônia Oriental, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2000.

NASH, T. Chemical constitution and physical properties of compounds able to protect living cells against damage due to freezing and thawing. In: MERYMAN, H. T., **Cryobiology**. New York: Academic Press. 1966, p.179-210.

NICOLAISEN, H., HVIDT, A. Phase behaviour of the system trehalose-NaCl-water. **Criobiology**, v.31, p.199-205, 1994.

OBA, E. et al. Estudo preliminar de diferentes meios para congelação de sêmen de búfalo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 10., 1993, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1993. p.337.

OHASHI, O. M. Inseminação artificial em búfalos: aspectos gerais e perspectivas de sua utilização no Brasil. In: SAMARA, S. I. et al. **Sanidade e produtividade em búfalos**. Jaboticabal: FUNEP, 1993, p.111-120.

PAGL, R. 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**, v.66, p.1115-1122, 2006.

PAPA, F. et al. Utilização do diluente MP50 para criopreservação de sêmen equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.26, p.184-191, 2002.

PARKS, E. J., GRAHAM, J. K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v.38, p.209-22, 1992.

PICKETT, B. W.; SQUIRES, E. L.; MACKINNON, A. O. **Procedures for collection, evaluation and utilization of stallion semen for artificial insemination**. Fort Collins: Colorado State University, Animal Reproduction Laboratory, 1987, Bull. 3.

PRADO, R. B. **Comparação de dois diluidores para o armazenamento de sêmen bovino utilizado na fecundação *in vitro***. 2009. 78f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)- Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.

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

RAJAMAHENDRAN, R.; DHARMASENA, L. Preservation of Buffalo Semen in Citric Acid Whey and Tris Buffer Extenders at -196°C. **Journal of National Science Foundation**. v.12, n.1, p.45-51, 1984.

RAHMAN, A.; DUTTA, J. C.; RAJKONWAR, C. K. A study on preservation of buffalo semen in two extenders. **Buffalo Journal**. v 1. p.57-60, 1988.

RAIZADA, B. C.; SATTAR, A.; PANDEY, M. D. A comparative study of freezing buffalo semen in two diluters. In: M.ACHARYA, R.; LOKESHWAR, R.R.; KUMAR, S. **Recent Advances in Buffalo Research**, v.3, 1990, p.66-74.

RAMAKRISHNAN, P.; ARIFF, M. O. Effect of glycerol level and cooling rate on post-thaw semen quality of Malaysian swamp buffalo. In: INTERNATIONAL BUFFALO CONGRESS, 4., v.3, 1994, São Paulo, **Proceedings...**São Paulo, 1994. p.540-542.

RAO, A. V. N. et al. Effect of thaw rates on motility, survival and acrosomal integrity of buffalo spermatozoa frozen in medium French straws. **Animal Reproduction Science**, v.12, p.123-129, 1986.

RASUL, Z. et al. Effect of buffering systems on postthaw motion characteristics, plasma membrane integrity, and acrosome morphology of buffalo spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.59, p.31-41, 2000.

RIBEIRO, H. F. L. et al. The use of thermoresistance test for water buffalo semen (preliminary report). In: WORLD VETERINARY CONGRESS, 24., 1991. Rio de Janeiro, **Anais...**Belém, 1991. p.1625.

RIBEIRO, H. F. L. 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, 1994. p.591-593.

RIGAU, T. et al. Differential effects of glucose and fructose on hexose metabolism in dog spermatozoa. **Reproduction**, v.123, p. 579-591, 2002.

RODRIGUES, J. L. Aspectos da congelação de embriões bovinos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES, 7., 1992, Jaboticabal. **Anais...**Jaboticabal: SBTE, 1992. p.55-79.

RODRIGUES, A. E. **Estimação de parâmetros genéticos para características produtivas em búfalos (*Bubalus bubalis*) na Amazônia Oriental**. 2007. 67f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)- Universidade Federal do Pará, Empresa

Brasileira de Pesquisa Agropecuária da Amazônia Oriental, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2007.

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

SALAMON, S., MAXWELL, W. M. C. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.77-111, 2000.

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

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 2º. ed. Belo Horizonte: Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002. 265 p.

SEIDEL, G. E. Principles of cryopreservation of mammalian embryos. In: **TECHNIQUES FOR FREEZING MAMMALIAN EMBRYOS**, 6, 1984, Colorado. **Proceedings...**Colorado: Presented by Animal Reproduction Laboratory, 1984. p.7-14.

SEVERO, N. C. Influência da qualidade do sêmen bovino congelado sobre a fertilidade. **A Hora Veterinária**, v.28, n.167, p.36-39, 2009.

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

SIDDIQUE, M.; ALI, R.; RAZA, A. Effect of Buffers on Freezing of Buffalo Bull Semen. **Journal of Agriculture & Social Sciences**, v.2, n.2, p.117-119, 2006.

SILVA, A. O. A. et al. Preliminary report on ringer-lactate solution as an alternative diluter for buffalo semen. In: **BUFFALO SYMPOSIUM OF AMERICAS**, 1., 2002. **Anais...** Belém: PRODEPA – Governo do Estado do Pará, 2002. p.467-470a.

SILVA, A. R. et al. Effect of Tris-buffer, egg yolk and glycerol on canine semen freezing. **The Veterinary Journal**, v.164, p.244-246, 2002b.

SILVA, A. R. et al. Quality of canine semen submitted to single or fractionated glycerol addition during the freezing process. **Theriogenology**, v.59, 821-829, 2003.

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, 2005.

SILVA, P. F. N.; GADELLA, B. M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, v.65, p.958-978, 2006.

SINGH, N. P.; MANIK, R. S.; RAINA, V. S. Effect of cysteine fortification on cryopreservation of buffalo semen in milk-whey extenders. **Theriogenology**, v.32, n.6, p.979-986, 1989.

SINGH, L.P.; HARSHAN, H. M.; ANSARI, M. R. Effect of egg yolk and seminal plasma heparin binding protein interaction on the freezability of buffalo cauda epididymal spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.99, p.395-400, 2007.

SINGH, M. Effect of post-thaw cotton incubation on semen quality of buffalo bulls. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 9., 2010, Buenos Aires, **Proceedings...**Buenos Aires, 2010, p. 873-875.

SIRIVAIDYANPONG, S. et al. Effect of sperm diluents on the acrosome reaction in canine sperm. **Theriogenology**, v.53, p.789-802, 2000.

SOUSA, J. S. et al. Seasonal characteristics of buffalo semen in the Amazon region. In: SIPAR FOLLOW-UP SEMINAR ON ANIMAL REPRODUCTION AND BIOTECHNOLOGY FOR LATIN AMERICA, 4., v.2, 1998, Castanhal, **Proceedings...**Castanhal, 1998. p.82-87.

SQUIRES, E. L. et al. **Cooled and frozen stallion semen**. Fort Collins: Colorado State University. Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, 1999. 80p. Bulletin. n.9.

SWELUM, A. A. et al. Comparing ethylene glycol with glycerol for cryopreservation of buffalo bull semen in egg-yolk containing extenders. **Theriogenology**, v.76, p. 833-842, 2011.

TALEVI, R. et al. Effects of different pre-freezing rates on buffalo sperm. Motility and ultrastructure preservation. In: INTERNATIONAL BUFFALO CONGRESS, 4., v.3, 1994, São Paulo, **Proceedings...**São Paulo, 1994. p.537-539.

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.

VALE, W. G. et al. Inseminação artificial em búfalos (*Bubalus bubalis*) na região Amazônica. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 21., 1984. Belém. **Anais...** Belém: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 1984. p.91.

VALE, W. G. et al. Semen freezing and artificial insemination in water buffalo in the Amazon Valley. **Buffalo Journal**, v.7, n.2, p.137-144, 1991.

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

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

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

VALE, W. G.; Biología de la reproducción y congelación de sêmen del macho bufalino. In: PALMA, G. A. **Biotecnología de la reproducción**. 2° Ed., Mar Del Plata: Repro Biotec, 2008, p.149-162.

VALE, W. G. Deep freezing buffalo semen - state of art. In; WORLD BUFFALO CONGRESS, 9., 2010, Buenos Aires, **Proceedings...**Buenos Aires, 2010, p.844-855.

VISHWANATH, R.; SHANNON, P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. **Animal Reproduction Science**, 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. **Journal of Dairy Science**, v.82, p.817-821, 1999.

WATSON, P. F. The preservation of semen in mammals. **Oxford Reviews of Reproductive Biology**, v.1, p.283-350, 1979.

WATSON, P. F. The effects of cold shock on sperm cell membranes. In: MORRIS, E. J.; CLARK, A. **Effects of Low Temperatures on Biological Membranes**. London: Academic Press, 1981, p.189-218.

WATSON, P. F. et al. A comparison of critical osmolality and hydraulic conductivity and its activation energy in fowl and bull spermatozoa. **Journal Andrology**, v.13, p.131-138, 1992.

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

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

WEITZE, K. F.; PETZOLDT, R. Preservation of semen. **Animal Reproduction Science**, v.28, p.229-235, 1992.

WEITZE, K. F. Spermatologische untersuchung. In: BUCH, W.; HOLZMANN, A. **Veterinärmedizinische Andrologie**. Stuttgart, New York: Schattauer, 2001, p.99.

WIGGIN, H. B.; ALMQUIST, J. O. Combinations of glycerol percent, glycerol equilibrium time, and thawing rate upon freezability of bull spermatozoa in plastic straws. **Journal of Dairy Science**, v. 58, n.3, p.416-419, 1974.

WILHELM, K. M.; GRAHAM, J. K.; SQUIRES, E. L. Effects of phosphatidylserine and cholesterol liposomes on the viability, motility and acrosomal integrity of stallion spermatozoa prior and after cryopreservation. **Cryobiology**, v.33, p.320-329, 1996.

WOLFE, C. A. et al. Regionalized lipid diffusion in the plasma membrane spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v.59, p.1506-1514, 1998.

YOSHIDA, M. Conservation of sperms: current status and new trends **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.349-355, 2000.

ZAFIAN, P. T. **Plasma membrane alterations induced in bovine spermatozoa by cryopreservation**. 1984. Tese (M. S. Thesis). Colorado State University, Colorado, 1984.

ANEXOS

ANEXO A - COMPOSIÇÃO DOS DILUIDORES

1) COMPOSIÇÃO DO DILUIDOR TRIS-GLICEROL

SOLUÇÃO A (500mL)	QUANTIDADE
TRIS (hidroxi-metil-amino-methan)-----	19,05g
Ácido cítrico-----	9,85g
D(-) Frutose-----	7,75g
Sulfato de estreptomicina-----	0,50g
Penicilina-G-Potássica-----	250.000U.I.
Água Ultrapura q.s.p-----	500mL
SOLUÇÃO FINAL	
Solução A-----	73,00mL
Glicerol-----	7,00mL
Gema de ovo-----	20,00mL
pH a 6,8 a 7,0	
Osmolaridade a 290±5mOsm	

2) COMPOSIÇÃO DO DILUIDOR A BASE DE LACTOSE/TRIS

SOLUÇÃO A (100mL)	QUANTIDADE
TRIS (hidroxi-metil-amino-methan)-----	19,05g
Estreptomicina-----	0,10g
Penicilina-----	50.000U.I.
Lactose 11%	
SOLUÇÃO FINAL	
Solução A-----	73,00mL
Glicerol-----	7,00mL
Gema de ovo-----	20,00mL
pH a 6,8 a 7,0	
Osmolaridade a 290±5mOsm	

3) COMPOSIÇÃO DO DILUIDOR A BASE DE LEITE DESNATADO

SOLUÇÃO A	QUANTIDADE
Leite desnatado 11% diluído em água a 80°C	
SOLUÇÃO FINAL	
Solução A-----	73,00mL
Gema de ovo-----	20,00mL
Glicerol-----	7,00mL
Estreptomicina-----	70,00mg ou 1000U.I.
Penicilina-----	700,00mg ou 1.000.000U.I.
pH a 6,8 a 7,0	
Osmolaridade a 290±5mOsm	

4) COMPOSIÇÃO DO DILUENTE A BASE DE RINGER-LACTATO

SOLUÇÃO A	QUANTIDADE
D-frutose-----	1,08g
Penicilina G potássica-----	70,00mg ou 1000U.I.
Sulfato de estreptomicina-----	700,00mg ou 1.000.000U.I.
Ringer-Lactato q.s.p-----	500mL
SOLUÇÃO B	
Leite desnatado 11% diluído em água a 80°C	
SOLUÇÃO FINAL	
Solução A-----	36,50mL
Solução B-----	36,50mL
Glicerol-----	7,00mL
Gema de ovo-----	20,00mL
pH a 6,8 a 7,0	
Osmolaridade a 290±5mOsm	

ANEXO B: ANÁLISE DE CUSTO DE CADA DILUIDOR

1- ANÁLISE DE CUSTO DO DILUIDOR TRIS-GLICEROL

Solução A (500mL)	Empresa	Quantidade	Preço(R\$)	Protocolo	Preço do protocolo (R\$)*
Trizma base	SIGMA	1000g	628	19,05 g	11,96
Ácido Cítrico ANIDRO P.A.-A.C.S.	SYNTH	1000g	20,54	9,85 g	0,2
Frutose (D) P.A.	SYNTH	1000g	21,96	7,75 g	0,16
STREPTOMIC	VALLEE	6,95g	6,32	0,5 g	0,45
NOVAPEN	MARCOLAB	10.000.000U.I.	17,04	250.000U.I.	0,42
Solução final				Sub-Total	13,19/ 500mL
Solução A				73,0 mL	1,92
GLICERINA PA ACS	VE TEC	1000 mL	1.556,06	7,0 mL	10,89
Gema de ovo caipira	LABEL ROUGE	10 unidades	6,79	20,0 mL	0,67
				Total	13,48*/ 100mL de diluidor

*Cotação do dólar americano R\$1,97 e do Euro R\$2,61 (CAMBIOBR, 2012)

Fonte: http://www.cambiobr.com.br/?gclid=CPW1y97L3K8CFQkFnQodM2cb_A, 2012.

2- ANÁLISE DE CUSTO DO DILUIDOR A BASE DE LACTOSE/TRIS

Solução A (100mL)	Empresa	Quantidade	Preço(R\$)	Protocolo	Preço do protocolo (R\$)*
Trizma base	SIGMA	1000g	628,00	19,05 g	11,96
STREPTOMIC	VALLEE	6,95g	21,96	0,10g	0,09
NOVAPEN	MARCOLAB	10.000.000 U.I.	6,32	50.000 U.I.	0,08
D (+) LACTOSE MONOHIDRATADA P.A	VE TEC	500g	1224,08	11%	26,96
Solução final				Sub total	39,09*/100mL
Solução A				73,00 mL	18,68
GLICERINA PA ACS	VE TEC	1000 mL	1.556,06	7,00 mL	10,89
Gema de ovo caipira	LABEL ROUGE	10 unidades	6,79	20,00 mL	0,06
				Total	29,63*/ 100mL de diluidor

*Cotação do dólar americano R\$1,97 e Euro R\$2,61 (CAMBIOBR, 2012)

Fonte: http://www.cambiobr.com.br/?gclid=CPW1y97L3K8CFQkFnQodM2cb_A, 2012.

3- ANÁLISE DE CUSTO DO DILUIDOR A BASE DE LEITE DESNATADO

Solução A	Empresa	Quantidade	Preço(R\$)	Protocolo	Preço do protocolo (R\$)*
Leite desnatado Molico	NESTLE	300g	8,66	Leite desnatado 11%	0,31
Solução final				Sub total	0,31
Solução A				73,00mL	0,23
Gema de ovo caipira	LABEL ROUGE	10 unidades	6,79	20,00mL	0,67
GLICERINA PA ACS	VE TEC	1000 mL	1.556,06	7,00mL	10,89
STREPTOMIC	VALLEE	6,95g	21,96	0,07g	0,06
NOVAPEN	MARCOLAB	10.000.000 U.I.	6,32	0,02g	1,70
				Total	13,55*/100mL de diluidor

*Cotação do dólar americano R\$1,97 e Euro R\$2,61 (CAMBIOBR, 2012)

Fonte: http://www.cambiobr.com.br/?gclid=CPW1y97L3K8CFQkFnQodM2cb_A, 2012.

4- ANÁLISE DE CUSTO DO DILUIDOR A BASE DE RINGER-LACTATO

Solução A	Empresa	Quantidade	Preço (R\$)	Protocolo	Preço do protocolo (R\$)*
Frutose P.A.	SYNTH	1000g	21,96	1,08g	0,023
NOVAPEN	MARCOLAB	10.000.000U.I.	6,32	70mg ou 1000U.I.	0,60
STREPTOMIC	VALLEE	6,95g	21,96	700mg ou 1.000.000U.I.	1,70
Ringer-Lactato q.s.p	EQUIPLEX	500mL	2,29	500mL	2,29
Solução B				Sub total	4,61
Leite desnatado Molico	NESTLE	300g	8,66	Leite desnatado 11%	0,31
Solução final				Sub total	8,91
Solução A				36,50mL	0,33
Solução B				36,50mL	0,11
GLICERINA PA ACS	VETEC	1000mL	1.556,06	7,00mL	10,89
Gema de ovo caipira	LABEL ROUGE	10 unidades	6,79	20,00mL	0,67
				Total	12,00*/100 mL de diluidor

*Cotação do dólar americano R\$1,97 e Euro R\$2,61

Fonte: http://www.cambio.br.com.br/?gclid=CPW1y97L3K8CFQkFnQodM2cb_A, 2012.