

# EFEITO DE DIFERENTES DILUIDORES NA CONGELAÇÃO E PÓS-DESCONGELAÇÃO DE SÊMEN BUBALINO, SUBMETIDO AO TESTE DE TERMO-RESISTÊNCIA<sup>1</sup>

GERALDO MOOSE<sup>2</sup>, JOÃO BATISTA PEREIRA DE CARVALHO<sup>3</sup>, BENEDICTO DO ESPÍRITO SANTO DE CAMPOS<sup>2</sup>, JOSÉ RAMOS NOGUEIRA<sup>4</sup>, ROBERTO HAUCK REICHERT<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Recebido para publicação em 24/11/06. Aceito para publicação em 18/07/07.

<sup>2</sup>Centro de Pesquisa e Desenvolvimento em Genética e Reprodução Animal, Instituto de Zootecnia, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, Rua Heitor Penteado, 56, Centro, CEP 13460-000, Nova Odessa, SP, Brasil.

<sup>3</sup>Pólo Regional de Desenvolvimento Tecnológico dos Agronegócios Vale do Paraíba, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, Av. Professor Manoel César Ribeiro, 320, Bairro Santa Cecília, Caixa postal 07, CEP 12400-000, Pindamonhangaba, SP, Brasil.

<sup>4</sup>Pólo Regional de Desenvolvimento Tecnológico dos Agronegócios Centro Leste, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, Anel viário Km 321, Caixa postal 271, CEP 14001-970, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

<sup>5</sup>Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Registro, Pólo Regional de Desenvolvimento Tecnológico dos Agronegócios Vale do Ribeira, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, Rod. Regis Bittencourt, Km 435, Bairro Ribeirão Vermelho, Caixa postal 134, CEP 11900-000, Registro, SP, Brasil.

RESUMO: Foram analisadas 139 amostras de sêmen congelado, obtidas de quatro touros bubalinos mestiços Jafarabadi x Murrah, com três anos de idade, durante os meses de janeiro a novembro de 1990. O sêmen foi colhido semanalmente e avaliado microscopicamente, quanto às características físicas de turbilhonamento, concentração, motilidade e vigor. Os ejaculados foram diluídos a fresco em combinações preparadas com sete diluidores: Lactose-gema, TRIS-I, TRIS-II, TRIS-III, Citrato-gema, TES-TRIS e Meio de Mem-Eagle. As concentrações de glicerol (7%), gema de ovo (20%) e água destilada (veículo), foram constantes em todos os diluidores. O Teste de Termo-Resistência (TTR) foi utilizado para a avaliação pós-descongelamento das características motilidade e vigor, às zero e 5 horas de incubação. Não houve diferença ( $P > 0,01$ ) das características motilidade e vigor pós-descongelamento entre os diluidores à zero hora, porém houve diferença ( $P < 0,01$ ) às 5 horas de incubação, entre os diluidores Lactose-gema, TRIS-I e TES-TRIS, sendo que o TES-TRIS superou o TRIS-I nas duas características avaliadas. Com base nos resultados do presente estudo, é possível a congelamento de sêmen de búfalos com estes diluidores, sendo que concentrações adequadas de açúcares nas soluções tampões, podem melhorar a motilidade pós-descongelamento.

Palavras-chave: bubalino, congelamento, diluidores, sêmen, teste de termo-resistência.

## EFFECT OF SEVERAL EXTENDERS IN FROZEN-THAWED BUFFALO SEMEN, SUBMITTED TO THERMO-RESISTENCE TEST

ABSTRACT: Samples of frozen semen (N = 139) from four water buffaloes (Jafarabadi and Murrah crossbred), with three years of age, were collected from January to November of 1990, were used. Semen was collected weekly and evaluated by microscope for physical characteristics of turbulence; concentration; motility and vigor. Fresh semen was diluted in solution prepared with seven extenders: yolk-lactose; TRIS-I; TRIS-II; TRIS-III; yolk-cytrate; TES-TRIS and MEN-Eagle medium. Concentrations of glycerol (7%); egg-yolk (20%) and distilled water to complete 100ml were constant for all extenders. The Thermo-Resistance Test (TRT) was used to achieve motility and vigor in

frozen-thawed semen at zero and five hours of incubation. There was no difference among extenders ( $P > 0.01$ ) for motility and vigor at zero hour of incubation; but at five hours there were differences ( $P < 0.01$ ) among semen frozen with yolk-lactose; TRIS-I and TES-TRIS. TES-TRIS showed higher motility and vigor than the TRIS-I. Based on these results it is possible to freeze-thaw buffalo semen with these extenders. An appropriate concentration of sugar in the solution could improve motility of thawed buffalo semen.

Key words: buffalo, freeze-thaw, extenders, semen, thermo-resistance test.

## INTRODUÇÃO

A população mundial de búfalos é estimada em 174 milhões de animais responsáveis pela produção anual de 77 milhões de toneladas de leite. A taxa de crescimento do rebanho nos últimos dez anos foi de 9,1% e a produção de leite aumentou 70,6% nesse período (FAO, 2005). O Brasil possui aproximadamente 3,5 milhões de animais e tem registrado, dentro do contexto mundial, uma taxa de crescimento anual superior a 12% nas últimas décadas (SILVA *et al.*, 2002).

O interesse que o búfalo doméstico vem despertando no continente Asiático, Europa e América do Sul, está diretamente associado com as vantagens relativas às características de alta fertilidade, longevidade, eficiência na conversão alimentar e adaptabilidade a diferentes ecossistemas, que traduzem em exploração econômica rentável de leite e carne aos produtores (VALE, 2002). Com a possibilidade do uso da inseminação artificial aplicada ao melhoramento genético dos animais de interesse zootécnico, a avaliação e os procedimentos envolvidos na tecnologia de sêmen, vêm despertando interesse econômico. No entanto, a utilização dos métodos de criopreservação aplicados ao sêmen de búfalos, requer conhecimento adicional da ultra-estrutura das células espermáticas, bem como do mecanismo de ação dos diferentes compostos químicos envolvidos no processo de criopreservação (SANSONE *et al.*, 2000).

A composição do diluidor utilizado na congelação de sêmen de búfalo, constitui-se num dos principais fatores que influenciam os resultados (DHAMI *et al.*, 1994). O conteúdo de lipídeos, açúcares e aminoácidos dos diluidores, exerce efeito estabilizador na membrana plasmática, necessário para manter a integridade fisiológica desta membrana após a descongelação (GOODRICH e BALDESCHWEILER, 1991; KUMAR *et al.*, 1994b). Neste

sentido, vários diluidores têm sido testados para melhorar a baixa sobrevivência do espermatozóide de touros bubalinos e para Kumar *apud* PAMPAPATHI *et al.*, 1997, ainda não existe concordância entre os autores quanto ao melhor diluidor para o processo de criopreservação; visto que, os métodos utilizados para bovinos não apresentam resultados satisfatórios quando aplicados para sêmen bubalino.

Está bem documentado que durante as diferentes fases do processo de criopreservação, os espermatozoides sofrem danos físicos no acrossomo e membrana plasmática, o que compromete a sobrevivência e o transporte do espermatozóide até o sítio de fecundação (HOLT, 2000). O diluidor e seus componentes, também afetam a integridade do complexo membrana plasmática/acrossomo durante a congelação. Assim, a escolha de um diluidor, deve se basear na capacidade deste em manter a função celular durante o processo de congelação e descongelação (BALRAM *et al.*, 1997).

A proteção contra os danos durante o processo de congelação é conferida principalmente pelo glicerol e pela gema de ovo (crioprotetores); enquanto os açúcares, têm a função de fornecer um substrato com alta fonte de energia após a descongelação. O glicerol, considerado o agente crioprotetor universal na congelação de espermatozoides, penetra no interior do citoplasma e, devido à propriedades coligativas, modifica a formação de cristais, reduz o ponto de congelação intracelular e conseqüentemente previne a concentração eletrolítica do meio crioprotetor (FABBROCINI *et al.*, 2000). Também é evidenciado que, a presença do glicerol durante a descongelação, produz efeito deletério na fertilidade (KUMAR *et al.*, 1994b). Em combinação com o glicerol, a gema de ovo já está incluída na rotina dos protocolos de criopreservação de sêmen dos animais domésticos (HOLT, 2000). As evidências dos estudos criomicroscópicos em sêmen de carneiro demonstram que a gema de ovo contri-

bui na proteção da membrana plasmática contra o choque térmico (HOLT *et al.*, 1992) e estimula também as vias de sinalização do sistema enzimático na fecundação (KUMAR *et al.*, 1992).

Além do glicerol e outros crioprotetores penetrantes, os açúcares não permeáveis como a rafinose, sacarose e lactose, têm sido identificados como substâncias que também fornecem crioproteção às células espermáticas durante a congelação (HOLT, 2000). Os açúcares de alto peso molecular exercem importante papel crioprotetor na permeabilidade da membrana celular e manutenção do balanço eletrolítico (SANSONE *et al.*, 2000). Os efeitos crioprotetores de seis açúcares (glicose, xilose, frutose, rafinose, sacarose e cheeni) em diferentes concentrações foram examinados por KUMAR *et al.* (1994a). Os resultados evidenciaram que, os açúcares comportam-se independentemente em diferentes tampões e, a concentração ideal, é um critério para decidir sobre o papel crioprotetor e possíveis efeitos na motilidade espermática após a descongelação. Existe portanto, uma interação entre a composição do diluidor, o papel crioprotetor dos açúcares e, a quantidade de glicerol e de gema de ovo nos diferentes diluidores (PAMPAPATHI *et al.*, 1997).

A principal influência na sobrevivência espermática refere-se ao meio crioprotetor e ao sistema tampão. Os tampões íon zwitter são relatados por produzir boa recuperação após a descongelação e manutenção da motilidade do espermatozóide (GRAHAM *et al.*, 1972). Esta superioridade dos tampões zwitter ácido iônico sobre a motilidade espermática, em comparação aos tampões citrato e fosfato, pode ser explicada pelo fato de que ambos, tendem a precipitar ou ligar aos cátions polivalentes e participar do processo metabólico ou agir como inibidores no sistema. BALRAM *et al.* (1997), avaliaram o efeito de alguns tampões zwitteriônicos e citrato sobre a motilidade, viabilidade e a integridade acrossômica do espermatozóide de búfalo e concluíram que os tampões Tris e Mes são mais eficientes em termos de estocagem, bem como na congelação quando comparados ao tampão gema-citrato. Estes resultados confirmam os relatos de VALE *et al.* (1991), na região amazônica, os quais o tampão Tris, Tes-leite com 7% de glicerol apresentaram excelente resultado na congelação e fertilidade do sêmen de búfalo. Estudos recentes, também corroboram com as afirmações anteriores nas quais os tampões zwitterônicos, quando titulados em pH fisiológico apresentam os melhores resulta-

dos quanto à motilidade espermática após a descongelação (RASUL *et al.*, 2000).

Considerando as várias interações entre os componentes individuais do processo de criopreservação, VALE (2002) sugeriu que o processo de criopreservação de espermatozóides bubalinos deve ser aprimorado, sendo que sejam adotados critérios de viabilidade espermática aceitáveis e condizentes com os padrões normais de fertilidade.

O objetivo deste trabalho, portanto é avaliar pelo teste de termo-resistência, o efeito de diferentes diluidores na criopreservação de espermatozóides bubalinos .

## MATERIAL E MÉTODOS

Um total de 139 amostras de sêmen congelado foram obtidas de 4 touros com 3 anos de idade, das raças Jafarabadi e Murrah, no período de janeiro a novembro de 1990. Os animais previamente submetidos a uma avaliação clínica-andrológica, foram condicionados para a colheita de sêmen, manejados em sistema de piquetes individuais com água e sal mineralizado "ad libitum", alimentados com 30kg de silagem de milho e 2kg de concentrado/animal/dia.

O sêmen foi colhido semanalmente com vagina artificial e temperatura interna variando entre 42-46°C, no período da manhã. Utilizou-se a técnica de falsas montas, com o fim de melhorar a qualidade do ejaculado. Imediatamente após a colheita, as amostras foram avaliadas microscopicamente quanto ao movimento em massa (turbilhonamento), percentagem de elementos móveis (motilidade), vigor e concentração; segundo as recomendações de VALE *et al.* (1984).

Os ejaculados com mais de 60% de motilidade progressiva (0-100), vigor acima de 3,5 (0-5) e concentração final ajustada para 40 milhões de espermatozóides/dose, foram diluídos a fresco em combinações preparadas com 7 diluidores: Lactose-Gema (LG: 73,0ml de solução de lactose a 11%), TRIS-I (VALE *et al.*, 1991), TRIS-II (80% da solução estoque), TRIS-III (60% da solução estoque), Citrato-Gema (CG: 2,94g de citrato de sódio), TES-TRIS (VALE *et al.*, 1991) e Meio de Mem-Eagle (ME: 0,977g de sais de Eagle e 0,22g de bicarbonato de sódio). Todos os diluidores continham 7% de glicerol, 20%

de gema de ovo, adicionadas 500 U.I. de penicilina G-potássica e 500mg de estreptomicina por ml de diluidor. O pH final foi ajustado para 7,0, com solução de NaOH a 10% (PANDIT, 1984).

Após a avaliação, o sêmen foi diluído num total de 10ml de cada diluidor, em duas etapas: a etapa inicial consistiu na diluição de 0,2ml de sêmen, adicionado de 5,0ml de diluidor sem glicerol à temperatura ambiente e, após 2 horas, completou-se a etapa final adicionando os 5,0ml restantes de diluidor contendo glicerol à temperatura de 5°C, fracionados em 1,0ml; 1,5ml e 2,5ml. As amostras foram então envasadas em palhetas francesas de 0,5ml, utilizando-se equipamento automático (IMV - modelo MRS 1) à temperatura de 5° C e à temperatura ambiente (da sala) controlada a 20°C. Em seguida, as palhetas foram colocadas em vapor de nitrogênio líquido a 4cm da superfície (temperatura de aproximadamente -72°C) durante 7 minutos, seguindo a imersão rápida no nitrogênio líquido à temperatura de -196°C. Após 5 minutos, o sêmen foi transferido para um botijão de armazenagem, onde permaneceu congelado por 48 horas, para posterior avaliação. As amostras foram descongeladas em banho-maria a 35°C e submetidas ao teste laboratorial de termo resistência, para avaliar a eficiência dos diluidores, quanto às características de motilidade e vigor às zero e 5 horas de incubação.

As análises estatísticas dos dados foram efetuadas pela análise de variância em delineamento inteiramente ao acaso, usando-se o programa SANEST (ZONTA; MACHADO, 1987), considerando-se os efeitos de mês de colheita, touro e diluidores para as características de turbilhonamento, motilidade e vigor, sendo adotado o nível de 1% de probabilidade para a significância dos testes de F para as variâncias e de Tukey para as médias dos diluidores.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Várias abordagens técnicas têm sido desenvolvidas nos últimos anos, de modo a avaliar diferentes aspectos das funções morfológicas e fisiológicas do espermatozóide após a congelação e descongelação. O aspecto funcional basicamente examinado, inclui a integridade da membrana plasmática (FABBROCINI *et al.*, 1996), análise das enzimas envolvidas com a atividade metabólica (DHAMI; KODAGALI, 1990) e o teste de termo-resistência, utilizado para avaliar a motilidade espermática após o processo de criopreservação (RIBEIRO *et al.*,

1991; OBA *et al.*, 1994; VALE, 1997). Com efeito, apesar dos testes de laboratório indicarem a extensão dos danos espermáticos causados durante o processo de congelação e descongelação, os mesmos não são suficientemente seguros para prever a fertilidade a campo (SANSONE *et al.*, 2000).

No presente estudo, considerando-se que o sêmen foi congelado pelo método rápido e as concentrações de glicerol e gema de ovo mantiveram-se constantes em todos os tratamentos, a variação nos resultados de motilidade após a descongelação e no TTR poderia ser atribuída ao sistema tampão, tipo e concentração de açúcares na composição química dos diluidores. É provável que os efeitos das concentrações mais altas de AMPc nos tampões zwitterônicos (RASUL *et al.*, 2000) associadas com o efeito crioprotetor dos açúcares de alto peso molecular e a ação sinérgica da lactose, tenham sido os responsáveis pelos resultados satisfatórios da motilidade progressiva após a descongelação (SANSONE *et al.*, 2000).

Em um pré-experimento envolvendo sete diluidores, a análise geral dos dados da motilidade após a descongelação e do vigor à zero hora, não apresentou diferença ( $P > 0,01$ ) nas combinações preparadas com os diluidores Lactose-gema, TRIS-I, TRIS-II, TRIS-III, Citrato-gema, TES-TRIS e Meio de Mem-Eagle. Entretanto, após cinco horas de incubação (TTR), estas mesmas características seminais nos diluidores Lactose-gema, TRIS-I e TES-TRIS, diferiram ( $P < 0,01$ ) entre os diluidores TRIS-II, TRIS-III, Citrato-gema e Meio de Mem-Eagle. Os valores médios da motilidade progressiva após a descongelação nas várias combinações de diluidores, neste estudo, estão em concordância com as observações de KUMAR *et al.* (1994a), os quais consideram satisfatória a motilidade acima de 30%, porém não foram exequíveis com o TTR nos demais diluidores, com exceção do TES-TRIS, Lactose-gema e TRIS-I.

Os valores médios da motilidade e do vigor após a descongelação à zero hora foram similares ( $P > 0,01$ ) entre os diluidores Lactose-gema, TRIS-I e TES-TRIS (Tabela 1). Entretanto, após 5 horas de incubação (TTR), a análise dos dados revelou diferença ( $P < 0,01$ ) da motilidade e do vigor entre os diluidores TES-TRIS ( $9,55 \pm 2,13$  e  $1,18 \pm 0,26$ ), Lactose-gema ( $4,28 \pm 1,39$  e  $0,62 \pm 0,17$ ) e o diluidor TRIS-I ( $2,14 \pm 0,25$  e  $0,25 \pm 0,20$ ), respectivamente; mas não foi observado efeito ( $P > 0,01$ ) entre o diluidor TES-TRIS e

**Tabela 1. Médias e erros-padrão das características do sêmen de bubalinos com zero e cinco horas de incubação (TTR), nos diferentes diluidores utilizados**

Diluidor	Motilidade (%)		Vigor (O a 5)	
	Zero hora	5 horas	Zero hora	5 horas
Gema-Lactose	27,18 ± 2,45a	4,28 ± 1,39a	2,73 ± 0,19a	0,62 ± 0,17a
TRIS-I	34,27 ± 3,10a	2,14 ± 0,25b	3,06 ± 0,24a	0,25 ± 0,20b
TES	35,65 ± 3,80a	9,55 ± 2,13a	3,41 ± 0,29a	1,18 ± 0,26a

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de TUKEY, ao nível de 1% de probabilidade.

Lactose-gema (Tabela 1). Os resultados deste estudo estão em concordância com os relatos de BARNABÉ *et al.* (1994) e OBA *et al.* (1994); os quais descreveram resultados satisfatórios no TTR após a descongelação de sêmen de búfalo, congelado com o diluidor TES-TRIS.

Segundo KUMAR *et al.* (1994a), os açúcares quando presentes ao redor da membrana celular, parecem dar proteção à célula. Por isso, açúcares permeáveis como a frutose, manose, glicose e açúcares não-permeáveis como a rafinose, sacarose e lactose, têm sido selecionados para fornecer crioproteção às células espermáticas durante o congelamento; bem como açúcares de peso molecular mais alto, como por exemplo a rafinose, lactose e frutose (KUMAR *et al.*, 1994c). Os melhores resultados obtidos com o diluidor TES-TRIS, em relação aos diluidores Lactose-gema e TRIS-I, provavelmente, podem ser devidos à combinação de dois açúcares, a lactose já presente no leite e a frutose, agindo externamente na membrana celular e sendo preferencialmente utilizada pelo espermatozóide, por algum substrato naturalmente presente no plasma seminal (YASEEN IBRAHIM, 1975). Entretanto, os dados relativos ao diluidor Lactose-gema, podem ser explicados pelo clássico mecanismo de ação da gema de ovo exercendo o papel de revestimento externo na membrana celular espermática, que associada a um açúcar de alto peso molecular e não-permeável, impede a penetração do glicerol na célula evitando, desta forma a manifestação do efeito deletério de inibição da motilidade (NAGASE *et al.*, 1964; 1968). Além disso, as lecitinas e as lipoproteínas da gema de ovo são substâncias importantes que contribuem na preservação das células espermáticas contra o choque térmico, durante o processo de manipulação; assim explicado pelos baixos índices de congelabilidade do sêmen, correlacionado com o baixo conteúdo de fosfolípidos da membrana plasmática dos

espermatozóides, característica apresentada na espécie bubalina (SANSONE *et al.*, 2000).

A sobrevivência espermática no processo de congelamento é proporcionada principalmente pelo meio crioprotetor e o sistema tampão. Assim, GRAHAM *et al.* (1972) relataram que os tampões íons zwitterônicos produzem boa recuperação da motilidade dos espermatozóides após a descongelamento, em relação aos tampões convencionais. Os tampões íons zwitter têm diferentes propriedades de ligação aos metais pesados, que são tidos como inibidores da motilidade espermática. No presente estudo, o diluidor TES-TRIS mostrou superioridade na manutenção da motilidade do espermatozóide em relação aos diluidores Lactose-gema e TRIS-I. Estes resultados corroboram com os resultados obtidos por PAMPAPATHI *et al.* (1997), os quais observaram motilidade espermática mais alta com 20% de gema. Contrariamente, BALRAM *et al.* (1997) avaliaram o efeito de alguns tampões íon zwitter em que o TRIS foi mais eficiente em termos de congelamento e estocagem de espermatozóides, porém, atribuem a baixa motilidade apresentada nos demais tampões zwitterônicos, ao processo de centrifugação dos diluidores, no qual a sedimentação da gema de ovo interferiu com a disponibilidade deste agente durante o processo de crioproteção. Há evidências também que os altos níveis de energia disponíveis nos tampões zwitterônicos, possam induzir, através da ativação das suas vias dependentes, a exaustão precoce dos espermatozóides e, conseqüentemente, a diminuição da motilidade progressiva pós-descongelamento (RASUL *et al.*, 2000).

No diluidor TRIS-I, a melhor taxa de recuperação após a descongelamento foi obtida com a concentração intermediária de frutose de 1,25%. Similarmente, KUMAR *et al.* (1994c) relataram que a

motilidade e a viabilidade do sêmen de búfalo varia com o tipo e a concentração dos açúcares presentes no diluidor. Concentrações mais altas (2,0%) não produziram melhores resultados em comparação com as mais baixas (1,0%), indicando assim, a existência de alguma ação sinérgica entre a concentração de gema de ovo e os açúcares de alto peso molecular. Portanto, a exemplo de KUMAR *et al.* (1994b), os resultados sugerem que a adição de açúcares em concentração sinérgica com gema de ovo e glicerol, pode melhorar significativamente a motilidade e a viabilidade do sêmen de búfalo.

### CONCLUSÕES

Com base nos resultados do presente estudo é possível concluir que a congelção de sêmen de búfalo com os diluidores TES-TRIS, Lactose-gema, TRIS-I apresentou os melhores resultados e as concentrações adequadas dos açúcares nos tampões, podem melhorar a qualidade pós-descongelamento do sêmen de búfalo.

O TTR com 5 horas de incubação para o sêmen de búfalo, mostrou ser um período muito extenso e provavelmente interferiu na motilidade espermática pós-descongelção.

### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a oficial de apoio à pesquisa Maria Vandenira de Lima e Souza e a técnica de apoio à pesquisa científica e tecnológica Maria Inês de Aquino Barbosa Carvalho pela colaboração durante as diferentes etapas do experimento.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALRAM, D. E. *et al.* Effect of zwitter ion buffers on buffalo semen preservation. **Indian Journal Animal Science**, v. 67, n. 11, p. 984-986, 1997.
- BARNABÉ, V. H. *et al.* Artificial insemination of buffaloes using two different diluents. In: CONGRESSO MUNDIAL DE CRIADORES DE BÚFALOS, 3., 1994, São Paulo. **Proceedings..** São Paulo: 1994. p.546-548.
- 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**, Los Altos, v. 34, n. 5, p. 853-863, 1990.
- DHAMI, A. J. *et al.* Effect of extenders and additives on freezability, pos-thaw thermoresistance and fertility of frozen Murrah buffalo semen under tropical climate. **Buffalo Journal**, v. 1, p.35-45, 1994.
- FABBROCINI, A. *et al.* The use of MPA lectin to evaluate the functional integrity of frozen-thawed *Bubalus bubalis* spermatozoa. In: INTERNATIONAL CONGRESS ANIMAL REPRODUCTION, 3.,1996, Sydney. **Proceedings...** Sidney: 1996. p. 24.
- FABBROCINI, A. *et al.* Effect of differential addition of glycerol and pyruvate to extender on cryopreservation of mediterranean buffalo (*B. bubalis*) spermatozoa. **Theriogenology**, Los Altos, v. 54, p.193-207, 2000.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. *Agriculture data*. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/faostat/collections>>. Acesso em: 30 abr. 2005.
- GOODRICH, R. P.; BALDESCHWEILER, J. D. The cryoprotective action of synthetic glycolipids. **Cryobiology**, v. 28, p. 327-334, 1991.
- GRAHAM, E. F.; CRABO, B. G.; BROWN, K. I. Effect of some zwitter ion buffers on the freezing and storage of spermatozoa. I. Bull. **Journal Dairy Science**, v. 55, n. 3, p. 372-378, 1972.
- 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.
- 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.; SAHNI, K. L.; MOHAN, G. Freezing of buffalo semen in different dilutors with different concentration of glycerol and different sugars in absence of yolk. **Indian Journal Dairy Science**, New Delhi, v. 47, n. 8, p. 635-639, 1994a.
- KUMAR, S.; SAHNI, K. L.; MOHAN, G. Effect of yolk, glicerol and sugars on post-thaw survival of buffalo spermatozoa in TRIS dilutor. **Indian Journal Animal Science**, New Delhi, v. 64, n. 4, p. 362-364, 1994b.
- KUMAR, S.; SAHNI, K. L.; MOHAN, G. Freezing of buffalo semen in different dilutors with varying

- concentration of yolk and different sugars in absence of glycerol. **Indian Journal Animal Science**, New Delhi, v. 64, n. 6, p. 588-591, 1994c.
- NAGASE, H. N.; TAND, Y. S. Deep freezing bull semen in concentrated pellet form. III. Protective action, of sugars. **Animal Breeding Abstract**, v. 33, p. 1234, 1964.
- NAGASE, H.; YAMASHITA, S.; IRIC, S. Use of sugars as protection against freezing injury to bull spermatozoa. **Animal Breeding Abstract**, v. 37, p. 406, 1968.
- OBA, E. et al. Preliminary study on different mediums for deep freezing of buffalo semen. In: CONGRESSO MUNDIAL DE CRIADORES DE BÚFALOS, 3., 1994, São Paulo. **Proceedings...** São Paulo: 1994. p.579-581.
- PAMPAPATHI, J. et al. Effect of dilution rate and yolk levels on preservability of MURRAH buffalo semen. **Indian Journal Dairy Science**, New Delhi, v. 50, n. 5, p. 352- 358, 1997.
- PANDIT, R. K. Preservation of buffalo semen at ultra-low temperatures. **Indian Journal Animal Science**, New Delhi, v. 54, n. 1, p.115-116, 1984.
- RASUL, Z. et al. Effect of buffering systems on po-thaw 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 thermo/resistance test for water buffalo semen (preliminary report). In: WORLD VETERINARY CONGRESS, 2., 1991, Rio de Janeiro. **Proceedings...** Rio de Janeiro: 1991. p. 163.
- ANSONE, G.; NASTRI, M. J. F.; FABBROCINI, A. Storage of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 55-76, 2000.
- 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, Belém. **Proceedings...** Belém: 2002. p.467-470.
- VALE, W. G. et al. Inseminação artificial em búfalos (*Bubalus bubalis*) na região Amazônica. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 19., 1984, Belém. **Anais...** Belém: 1984. p. 91.
- VALE, W. G. et al. Semen freezing and artificial insemination in the amazon valley. **Buffalo Journal**, v. 7, n.2, p.137-144, 1991.
- VALE, W. G. Sperm cryopreservation. Third Course on Biotechnology of Reproduction in Buffaloes. In: *Bubalus bubalis* - **Journal Buffalo Science and Technique**, Caserta, suppl. 4, p. 129-140, 1997.
- VALE, W. G. Reproductive management of buffalo male aiming semen production for artificial insemination. In: BUFFALO SYMPOSIUM OF AMERICAS, 1., 2002, Belém. **Proceedings...** Belém: 2002. p.156-171.
- YASEEN, A. M.; IBRAHIM, M. A. Semen characteristic of first and second ejaculate of buffalo bull with and without sexual stimulation. **Animal Breeding Abstract**, v. 46, p. 5323, 1975.
- ZONTA, E. P.; MACHADO, A. A. SANEST - Sistema de análise estatística para microcomputadores. Pelotas: DMEC/IFM/UFPeL, 1987. 138 p.