

Manejo de Reprodutores Bubalinos: Colheita e Processamento de Sêmen

Buffalo Breeding Bulls Management: Semen Collection and Processing

Lílian Kátia Ximenes Silva^{1,2}, Aluizio Otávio Almeida da Silva^{1,2}, Alexandre Rossetto Garcia^{3,4}, José Silva de Sousa¹ (in memoriam), Otávio Mitio Ohashi (in memoriam)⁵

¹Central de Biotecnologia de Reprodução Animal, Universidade Federal do Pará, Castanhal, Pará, Brasil

²Programa de Pós-graduação em Reprodução Animal na Amazônia, Castanhal, Pará, Brasil

³Embrapa Pecuária Sudeste, CPPSE, São Carlos, São Paulo, Brasil

⁴Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Pará, Castanhal, Pará, Brasil

⁵Universidade Federal do Pará, Laboratório de Fertilização *in vitro* (LABFIV)

Belém, Pará, Brasil

E-mail: lilian.silva@ufpa.br

Resumo

O presente trabalho objetiva descrever, de forma sucinta, o manejo de reprodutores bubalinos (*Bubalus bubalis*) mantidos em centro de coleta e processamento de sêmen, discorrendo sobre suas particularidades fisiológicas, relacionando-as à colheita e ao processamento de sêmen, bem como apresentando curiosidades sobre a rotina reprodutiva da espécie.

Palavras-chave: andrologia animal; espermatozoide; avaliação; criopreservação; búfalo.

Abstract

This paper briefly describes the management of buffalo breeding bulls (Bubalus bubalis) in a semen collection and processing center. It discusses their physiological characteristics as they relate to semen collection and processing and presents interesting facts about the species' reproductive routine.

Keywords: animal andrology; sperm; evaluation; cryopreservation; buffalo.

Introdução

A bubalinocultura no Brasil encontra-se em forte expansão, e o país é detentor do maior rebanho do mundo ocidental. Segundo dados oficiais, o efetivo nacional de bubalinos estimado varia entre 1,5 e 1,8 milhões de animais, e o estado do Pará detém a liderança na criação, com aproximadamente 775 mil cabeças, seguido pelos estados do Amapá (340 mil cabeças), Amazonas (152 mil cabeças), São Paulo (118 mil cabeças), Maranhão (95 mil cabeças) e Minas Gerais (89 mil cabeças) (IBGE, 2024).

Na Amazônia, esses animais possuem alto potencial para a produção de carne e leite e representam uma excelente alternativa para o aproveitamento de áreas antropizadas. Ainda, a bubalinocultura é favorecida devido à adaptabilidade dos animais, ao espaço físico da região, ao clima, ao solo e à variabilidade genética das forragens resultante da diversidade de espécies, heterogeneidade de ecossistemas e sazonalidade climática. Essa variabilidade contribui para a adaptabilidade dos búfalos em sistemas intensivos, onde a flutuação anual na quantidade e qualidade dos pastos é compensada pela sua alta capacidade digestiva, com maior eficiência na degradação da fibra e melhor retenção de nitrogênio, permitindo desempenho produtivo mesmo sob dietas de qualidade inferior. Além disso, estudos na Amazônia Oriental demonstram que a dieta e a disponibilidade de forragem influenciam diretamente a composição do microbioma ruminal, evidenciando a plasticidade fisiológica dos búfalos frente a diferentes condições alimentares e sistemas produtivos (Noronha et al., 2023). Na Amazônia a criação ocorre por meio do manejo extensivo em pastagens nativas, com os animais permanecendo por um tempo em "terra firme" e, em outro, em terra inundada, ou em sistemas mais intensificados de pastagens cultivadas, onde se alcança maior produtividade.

A bubalinocultura na Amazônia possui um papel relevante ao conciliar produção animal e sustentabilidade ambiental, por meio da implantação de sistemas de integração lavoura-pecuária-floresta, e no contexto da agricultura familiar, contribuindo para geração de renda e uso mais eficiente dos recursos naturais. Além disso, possuem capacidade de uso de áreas de várzea e ambientes alagáveis, nos quais

apresentam vantagens em relação aos bovinos, reduzindo a pressão sobre áreas de terra firme e contribuindo para estratégias de conservação ambiental (Ribeiro, 2023; Silva et al., 2021). O desenvolvimento de programas de melhoramento genético, como o Promebull (Programa de Melhoramento Genético de Búfalos com Inovação para o Estado do Pará) e o Probovídeos (Programa de Melhoramento Genético Animal do Estado do Pará), executados pela Embrapa Amazônia Oriental e a Secretaria de Estado de Desenvolvimento Agropecuária e da Pesca, respectivamente, são iniciativas voltadas ao aprimoramento genético dos rebanhos e que necessitam para seu avanço do desenvolvimento de biotecnologias, como o processamento e a criopreservação de sêmen.

Nesse contexto, serão apontadas particularidades, curiosidades e/ou fragilidades detectadas no manejo de reprodutores bubalinos destinados à colheita de sêmen em centro de coleta e processamento de sêmen, de modo a trazer esclarecimentos e apontamentos práticos que contribuam para a expansão da produção e da qualidade dos bancos de germoplasma, e conseqüentemente para a conservação genética e o desenvolvimento sustentável da bubalinocultura.

Recepção dos Reprodutores

O ingresso do touro para estadia no centro de coleta se inicia com a recepção dos animais que devem chegar à central previamente negativos para os exames de brucelose e tuberculose. Ao longo de 30 anos de atividade no processamento de sêmen bubalino, a Central de Biotecnologia de Reprodução Animal da Universidade Federal do Pará (CEBRAN) recepcionou 62 animais, principalmente das raças Murrah (60%), Mediterrâneo (30%) e Carabao (10%) (Figura 1).



Figura 1. (a) Fotografias de touros bubalinos (*Bubalus bubalis*) das raças Murrah (a), Mediterrânea (b) e Carabao (c). [Fotos: (a) Silva, A.O.A. 1996, (b) Silva, A.O.A., 2018, (c) Silva, A.O.A., 2019]

Após a recepção, os touros vão ao quarentenário para avaliação clínico-andrológica e colheita de material (sangue, lavado e swab prepucial, pelo e sêmen) para realização de exames de brucelose e diarreia viral bovina, tricomonose e campilobacteriose, genotipagem e de espermograma, respectivamente. Após os exames, os animais aptos são direcionados para baias individuais, inserindo-se no rebanho residente da central e iniciando a rotina de condicionamento para a colheita de sêmen. Nesse processo, é importante que se considere o critério das hierarquias, de modo a manejar sempre os animais mais jovens como prioridade, em detrimento dos mais velhos. A mesma observação deve ser aplicada à distribuição dos animais nas baias, dando-se preferência à alocação dos touros jovens nas baias mais próximas ao local de colheita, e dos mais velhos o mais longe possível, evitando-se o contato direto e reduzindo o contato indireto entre animais de diferentes categorias. Aconselha-se também, o mesmo procedimento para outras rotinas dos reprodutores, como banhos, pesagens, vacinações etc. Sabe-se que animais mais velhos podem exercer dominância sobre os mais novos tanto pelo tamanho quanto pela imposição física (Polli e Restle, 1995), bem como pela produção de feromônios inibitórios que desencadeiam comportamentos de repulsa, submissão, afastamento e até mesmo o bloqueio das atividades reprodutivas. Vale (2011) recomenda que o treinamento se inicie em torno de 14 a 15 meses, por ser o período em que os animais apresentam marcante atividade homossexual. Entretanto, ressalta-se que raramente chegam à central animais dessa idade, pois, em geral, os enviados são mais velhos.

Nesse período, é importante avaliar a capacidade física do animal de realizar a cópula, bem como sua libido, considerando suas particularidades fisiológicas. Segundo Vale (2011), os bubalinos apresentam menor libido em comparação aos bovinos, provavelmente devido à menor concentração de andrógenos. Por esse motivo, observa-se tempo de reação entre 10 e 15 minutos, portanto, ligeiramente maior do que nos bovinos. Entretanto, há variações acentuadas tanto para mais quanto para menos, existindo animais que, em torno de 5 minutos, saltam e ejaculam. Por possuírem pele e pelagem escuras e menor capacidade de

dissipação de calor, os bubalinos naturalmente ajustaram sua atividade sexual aos períodos mais amenos, que, nos trópicos, correspondem às primeiras horas noturnas até a alvorada. Assim, Ohashi et al. (1988) observaram total desinteresse dos touros bubalinos pela cópula nas horas mais quentes do dia.

É interessante considerar que touros bubalinos são bastante longevos, sendo não raro o registro de atividade sexual por mais de duas décadas. Na Central de Biotecnologia de Reprodução Animal da Universidade Federal do Pará (CEBRAN), já foi observado touro Murrah de 28 anos que, apesar do comprometimento articular, possuía libido elevada e intensa atividade sexual, com disponibilidade para a colheita em qualquer horário do dia e características seminais acima do padrão, principalmente quanto ao volume, que muitas vezes se aproximava de 10 mL. Com relação às fêmeas, a situação é semelhante, havendo vários registros de parições dessa espécie, com mais de 20 anos de idade.

Período de Pré-Colheita de Sêmen

Algumas horas antes da colheita, os touros são direcionados para a área de higienização, onde são submetidos a banho com água fria por cerca de 15 minutos, para limpeza, escovação, interação com o ambiente e higienização prepucial, constituindo parte do processo de condicionamento dos animais à rotina da central.

Os bubalinos, quando comparados aos bovinos, apresentam epiderme mais espessa, menor número de glândulas sudoríparas e menor densidade pilosa (Vilela et al., 2022). Além disso, a alta concentração de melanina na pele e nos pelos favorece maior absorção de radiação solar (Garcia, 2006; Garcia, 2013; Silva et al., 2015). Nesse sentido, o banho permite a perda de calor por evaporação, condução e convecção, contribuindo para a manutenção da homeotermia e o bem-estar dos reprodutores.

A lavagem prepucial visa à remoção de sujidades e partículas sólidas, bem como à redução de micro-organismos, minimizando a contaminação seminal. Nesse processo, pode-se utilizar amônia quaternária ou outro composto destinado a essa finalidade, retirando-se o excesso e secando a região prepucial. Essa rotina faz parte do condicionamento, pois os animais passam a associá-la à subsequente colheita de sêmen.

Colheita de Sêmen

O horário mais indicado para a colheita de sêmen de touros bubalinos é o de menor desafio térmico, ou seja, quando a temperatura ambiente é mais amena e, conseqüentemente, a libido não está diminuída (Vale, 1994; Vale, 1997). Esse momento coincide com o amanhecer e, principalmente, após o pôr do sol, sendo este último padronizado na CEBRAN, período no qual se concentram mais de 90% de todas as colheitas. Recomenda-se também que no momento da colheita sejam evitados ao máximo ruídos, sons, presença de pessoas estranhas e animais de outras espécies, e alterações na rotina, como mudança nas cores dos uniformes dos tratadores e uso de produtos que exalem odores fortes e estranhos no ambiente, visto que os bubalinos são muito curiosos e bastante dispersos, facilmente desviam sua atenção para fatores alheios.

Para a colheita de sêmen em bubalinos, recomenda-se o emprego de vagina artificial, com 30 a 35 cm de comprimento, ligeiramente mais curta do que a habitualmente usada em bovinos (Figura 2a), devido ao menor tamanho do pênis dos bubalinos. A lubrificação natural peniana é suficiente, o que dispensa o uso de lubrificantes artificiais, como gel de carboximetilcelulose, óleo mineral ou vaselina. Cuidado especial deve ser direcionado para a pressão e a temperatura interna da vagina artificial, visto que devem mimetizar uma vagina natural. Nesse sentido, receptores de pressão e temperatura localizados na glândula do pênis são acionados de forma semelhante ao que ocorre naturalmente na cópula. A temperatura interna da vagina artificial, mensurada na superfície da mucosa de látex, deve variar de 42 a 45 °C (Sansone et al., 2000; Ohashi et al., 2011; Vale, 2011). Destaca-se que, em temperaturas abaixo desta faixa, é comum haver monta, entretanto, sem ejaculação. O uso de vaginas artificiais muito quentes sujeita os reprodutores a danos, como irritações, inflamações e queimaduras no corpo do pênis ou na glândula. Ressalta-se que existe uma variabilidade e preferência individual; dessa forma, é rotina na CEBRAN a anotação da temperatura da vagina artificial “requerida” por cada reprodutor, tendo alguns casos de animais que ejaculam com temperaturas superiores a 45°C.



Figura 2. (a) Fotografia de vagina artificial usada para a colheita de sêmen em touros adultos bubalinos. (b) Técnica de colheita de sêmen em touro bubalino utilizando vagina artificial e manequim em tronco de contenção. [Fotos: (a) Silva, L.K.X., 2012, (b) Silva, A.O.A., 2006]

É imprescindível, para a colheita de sêmen por meio de vagina artificial, o uso de fêmeas consideradas manequins, com o objetivo de estimular a monta (Figura 2b). Entretanto, pode ocorrer que o reprodutor tenha preferência por outro macho como manequim, principalmente quando o condicionamento para monta ocorreu, por alguma circunstância, com outros machos. Por isso, não deve ser desconsiderada a questão dos registros de reprodutores que somente se excitam e saltam em manequins machos. Portanto, diferentes fatores podem estar envolvidos no estímulo sexual para a realização da monta.

É interessante mencionar que a área destinada a colheita disponha de bretes individuais, que acomodem os animais, principalmente os menos experientes, permitindo que estes visualizem e “aprendam” com os mais velhos, sempre que possível, respeitando o princípio da hierarquia. Além disso, o acompanhamento da monta pode estimular sexualmente os machos que a observam.

Nas centrais tem-se preconizado o uso de uma falsa monta antes da colheita propriamente dita. Este procedimento consiste em permitir o salto do touro sobre o manequim, sem, contudo, lhe oferecer a vagina artificial, fazendo-o apenas na segunda tentativa. Tem sido comprovado que esta prática melhora substancialmente a qualidade seminal, tanto em termos de volume quanto das demais características macro e microscópicas. Ressalta-se que podem ser obtidos de dois a três ejaculados por dia, de cada reprodutor, dando-se intervalo de 20 a 30 minutos entre as colheitas. Além disso, na rotina da central, as colheitas são realizadas em dias alternados, de duas a três vezes por semana.

Em búfalos, em circunstâncias específicas, também é possível a colheita de sêmen por meio da eletroejaculação e da massagem das ampolas dos ductos deferentes. Contudo, em relação ao emprego do eletroejaculador, tem-se altíssima restrição em bubalinos. Barbosa et al. (2006) e Ohashi et al. (2011) afirmam que os mesmos são muito sensíveis e reativos aos estímulos elétricos e, dessa forma, seu emprego é recomendado somente em animais ainda jovens e adequadamente contidos, o que evita acidentes e traumas. Neste particular, registra-se que, apesar da alta restrição do uso eletroejaculador em búfalos, deve-se considerar uma exceção à raça Carabao, que experimentalmente apresenta sucesso em colheitas com esse método e cujas reações foram muito mais discretas comparadas a outras raças bubalinas, permitindo, inclusive, o processamento para posterior criopreservação e inseminação artificial, com resultado bastante satisfatório. Esse resultado confirma que o uso da eletroejaculação nessa raça é promissor, mas ao mesmo tempo demonstra que mais pesquisas precisam ser realizadas para se determinar os motivos de tal fato (AOA da Silva, comunicação pessoal, 09 de janeiro de 2026).

Quanto ao sêmen obtido por massagem das ampolas dos ductos deferentes, deve-se ressaltar que este pode não representar a realidade do ejaculado. Nesse sentido, deve ser direcionado apenas para fins de espermograma, mas nunca para o processamento e congelamento. Com isso, conclui-se que a colheita de sêmen pela técnica de vagina artificial é o método que deve ser preconizado para a espécie bubalina, pois, além de ser de fácil execução em centrais, é o que mais se aproxima da monta natural.

Avaliação Seminal

Após a colheita, o ejaculado deve ser rapidamente encaminhado para o laboratório, mantido em banho-maria (37 °C) e submetido à avaliação imediata. Inicialmente, parâmetros macroscópicos são analisados, como volume, que varia principalmente em relação à idade (de animais jovens obtêm-se de 1 a 3 mL, e adultos de 4 a 8 mL); coloração (sendo branco ou marfim) e aspecto (dependente da concentração

espermática e variando de aquoso a leitoso). O sêmen ainda é submetido à avaliação química, por meio de medidor de pH digital ou fita indicadora, podendo o pH variar de 6,4 a 7,8 (CBRA, 2013). É interessante ressaltar, que o pH do sêmen bubalino deve ser avaliado imediatamente após a colheita. Vale (2011) afirma que a maior concentração de açúcar relaciona-se ao aumento na produção de ácido láctico, o que reduz o pH, e possibilita alterações espermáticas irreversíveis. Por esse motivo, é imprescindível que a pré-diluição, na proporção mínima de 2:1, seja realizada o mais rapidamente possível, visando à imediata proteção de fatores químicos que se alteram ao longo do tempo, bem como à prevenção da exaustão do espermatozoide pelo consumo rápido de substratos para a manutenção de seu metabolismo, principalmente os açúcares.

As características microscópicas avaliadas incluem o movimento de massa (turbilhonamento), analisado em escala de 0 a 5, em que se objetiva que o ejaculado possua valor a partir de 3 (Vale, 2011; Ohashi et al., 2011; CBRA, 2013). É importante destacar que o turbilhonamento possui relação direta com a motilidade espermática e a concentração do ejaculado. A motilidade espermática pode ser avaliada subjetivamente, por meio da microscopia, ou objetivamente, por meio do CASA (Computer-Assisted Sperm Analysis). Vale (2011) afirma que bons ejaculados devem apresentar pelo menos 80% de espermatozoides móveis em progressão e direção retilínea; ejaculados pobres apresentam motilidade abaixo de 40%. Segundo o CBRA (2013), o padrão de normalidade de um ejaculado bubalino é ter, no mínimo, 70% de motilidade espermática progressiva. De forma associada, avalia-se o vigor, que corresponde à intensidade do movimento espermático; este varia em escala de 1 a 5, sendo considerada de interesse amostras com valores a partir de 3. Ressalta-se que para a realização dessas análises o microscópio deve obrigatoriamente estar acoplado a uma platina aquecedora, para a manutenção da temperatura entre 38 e 39°C (Ohashi, 2002), devido à alta sensibilidade do espermatozoide bubalino a variações térmicas, quando comparado a outras espécies. Nos casos em que as mesas de microscópio não são previamente aquecidas, essa sensibilidade se torna bastante evidente, com redução drástica da motilidade e até a completa necrospermia.

A concentração espermática é obtida pela contagem das células espermáticas em câmara de Neubauer ou em espectrofotômetro, sendo recomendada a diluição prévia em solução de formalina tamponada, água destilada ou solução fisiológica na proporção de 1:200. O padrão aceitável de normalidade é de 350-2000x10⁶ spz/mL (CBRA, 2013). É interessante observar que esse parâmetro se reduz, invariavelmente, entre a primeira e as subsequentes ejaculações (Ohashi, 1988; Vale, 1994). A avaliação da percentagem de espermatozoides vivos e mortos faz parte da rotina de processamento de sêmen. Sansone et al. (2000) afirmam que amostras com mais de 30% de espermatozoides mortos não são viáveis para a criopreservação. Uma forma simples e direta de avaliar a viabilidade espermática é por meio da coloração com eosina/nigrosina, na qual células vivas permanecem claras ou não coradas, e as mortas apresentam tonalidade rósea devido à alteração na seletividade da membrana espermática (Vale, 2011).

A análise da morfologia espermática pode ser realizada através da técnica da câmara úmida sob microscopia de contraste de interferência diferencial ou esfregaço corado, utilizando corantes como: eosina-nigrosina, Karras, Giemsa, entre outros, sob microscopia óptica de campo claro, sendo avaliadas no mínimo 200 células (Arruda et al., 2015; CBRA, 2013; Celeghini, 2005; Freneau et al., 2010). A avaliação automatizada da morfometria espermática (Automated Sperm Morphometry Analyses - ASMA) retira a subjetividade e é realizada por esfregaços corados, sob aumento de 1.000 vezes, e com auxílio de um software para avaliação das imagens (Arruda, 2000; Hirai et al., 2001; Arruda et al., 2002).

O teste hiposmótico (HOST) é um exame prático e confiável, em que é avaliada a integridade funcional da membrana plasmática. Os espermatozoides são incubados em solução hiposmótica, o que provoca o influxo de água e a torção helicoidal do flagelo, indicando uma membrana íntegra e funcionalmente ativa (Arruda et al., 2011; Jeyedran et al., 1984). Outra análise de rotina, principalmente na avaliação prévia à liberação das doses de sêmen, é o teste de termo-resistência (TTR). Este teste induz as células espermáticas ao estresse térmico, mimetizando as condições a que estas ficam expostas no trato genital feminino, permanecendo o sêmen em banho-maria, a 45 °C/1 hora ou a 38 °C/4 horas (Arruda et al., 1992). Amostra considerada de boa qualidade deve apresentar o valor mínimo de 15% de espermatozoides com motilidade progressiva após o teste (CBRA, 1998). Na CEBRAN, tem sido empregado com bons resultados o TTR a 40 °C por 4 horas, avaliando-se a motilidade e o vigor em intervalos de 30 minutos, sendo consideradas aceitáveis amostras com o mínimo de 15% e 3, respectivamente.

Com o avançar dos anos, têm-se desenvolvido técnicas que avaliam a integridade e a função de compartimentos espermáticos, como a membrana plasmática, o núcleo, o acrossoma e a peça intermediária. As sondas fluorescentes ou fluorocromos podem ser utilizados de forma isolada ou combinada, por meio da microscopia de epifluorescência ou citometria de fluxo, avaliando-se 200 ou até 30.000 espermatozoides, respectivamente (Arruda, 2000; Celeghini et al., 2010). Silva et al. (2020) obtiveram avaliação exitosa ao

submeterem o sêmen criopreservado de touros bubalinos a análise da integridade da membrana espermática e acromossomal, além do potencial mitocondrial através da associação de sondas fluorescentes, utilizando Iodeto de Propídio, Isotiocionato de Fluoresceína e *Pisum sativum*, e o Iodeto de Tetracloro, respectivamente. Entretanto, é válido lembrar que o emprego de fluorocromos ainda não é rotina na avaliação seminal devido ao seu elevado custo.

Destaca-se que o padrão seminal dos touros bubalinos sofre influência ao longo do ano. Diversas pesquisas relatam que o aumento da temperatura ambiente associado ou não à elevação da umidade relativa do ar exerce efeitos negativos sobre a termorregulação testicular, espermatogênese e qualidade espermática (Garcia, 2013; Santos et al., 2014). De fato, se a dissipação da energia térmica for reduzida e a temperatura testicular se elevar, os efeitos deletérios na espermatogênese do touro bubalino tornam-se evidentes (Garcia et al., 2010; Gonçalves et al., 2021).

Contudo, o bubalino é um animal altamente adaptável a diversas situações ambientais desafiadoras (Marai e Haeeb, 2010). Em estudo realizado na CEBRAN, na região Norte do Brasil, nos diferentes períodos do ano (mais chuvoso: abril a maio; de transição: junho a agosto; e, menos chuvoso: setembro a dezembro), observou-se que, mesmo sob alta temperatura e umidade, os touros bubalinos não demonstraram estresse térmico calórico, sendo capazes de manter a normalidade da espermatogênese e a qualidade seminal. Portanto, os búfalos foram eficientes na dissipação de energia térmica, mesmo em níveis elevados de temperatura e umidade, típicos do clima tropical úmido. Essa condição provavelmente está relacionada à exposição dos animais a um manejo reprodutivo, nutricional, sanitário e ambiental adequado (Silva et al., 2017). Barros et al. (2015) observaram que búfalos criados em região de clima tropical úmido apresentam variações no conforto térmico nos períodos mais quentes, entretanto, ativam os mecanismos termorregulatórios, mantendo a homeotermia e a normalidade seminal.

Diluição e Criopreservação Seminal

Os ejaculados submetidos à avaliação e considerados aptos seguem para a fase de diluição, envase e criopreservação. A diluição deve ser feita em temperatura ambiente (25 a 32 °C) e pode ser realizada em etapas, sendo que o seu cálculo depende diretamente do volume, concentração e motilidade espermática inicial. São inúmeros os líquidos diluidores disponíveis para o sêmen bubalino, como TES-TRIS[®], BotuBov[®], Ringer-Lactato e Phosphate Buffered Saline (PBS), desenvolvidos na CEBRAN. Após a diluição, a amostra é envasada em palhetas de PVC estéreis (0,25 ou 0,5 mL) devidamente identificadas, cuja concentração por dose deve ser de 10 a 20 milhões de espermatozoides/mL.

Na sequência, as doses são submetidas ao processo de criopreservação, podendo-se empregar o método convencional ou automatizado. Na técnica convencional, as doses são refrigeradas (4 a 5 °C) por 3 horas, correspondendo ao tempo de equilíbrio, com o objetivo de redução gradual da temperatura e perda de água intracelular. Cabe destacar um ponto observado quanto à desidratação mais rápida nos espermatozoides de búfalos, quando comparados aos bovinos, o que muito provavelmente está atrelado a características peculiares de sua membrana plasmática. Silva et al. (2020) estudaram o perfil lipídico da membrana plasmática do espermatozoide bubalino e observaram que os ácidos graxos saturados predominantes são o ácido pelargônico (8,7±7,9%), o ácido undecanóico (3,4±2,5%) e o ácido palmítico (5,4±1,7%), e os ácidos graxos insaturados predominantes são o ácido oléico (4,3±1,2%) e o ácido erúico (2,0±2,3%).

Decorrido o tempo de equilíbrio, as doses são mantidas no vapor de nitrogênio líquido (-120 a -150 °C) por 20 minutos e, em seguida, imersas no nitrogênio líquido (-196 °C). No sistema automatizado, a curva de refrigeração é controlada eletronicamente e seguem-se as recomendações do fabricante, geralmente adotando-se a redução da temperatura de 0,25 °C/min, por aproximadamente 1 hora e 20 minutos, permanecendo a 5 °C por mais 2 horas. A curva de congelamento é de -20 °C/min até atingir -120 °C, quando, em seguida, as palhetas são imersas em nitrogênio líquido (-196 °C).

Considerações finais

O correto manejo de reprodutores bubalinos melhoradores é uma necessidade real para a produção regular de sêmen de alta qualidade e, conseqüentemente, para favorecer a disseminação de material genético superior e a otimização da bubalinocultura. O conhecimento das particularidades do touro búfalo facilita a rotina e torna possível a aplicação de biotecnologias reprodutivas, como a colheita, o processamento e a criopreservação do sêmen, o que favorece programas de melhoramento genético no Brasil e no exterior. Além disso, esse processo contribui para o aumento da vida útil dos animais, uma vez que o manejo diferenciado do touro evita desgastes e maximiza o seu potencial reprodutivo. Apesar da criopreservação

do sêmen bubalino ser uma biotécnica relativamente bem dominada, o desenvolvimento de outras ferramentas de reprodução assistida na espécie, como a produção *in vitro* de embriões e a injeção intracitoplasmática de espermatozoides, vem requerendo estudos mais específicos sobre a conservação do gameta masculino. Assim, observa-se que, na andrologia animal, especialmente nos bubalinos, ainda existem desafios a serem superados e questões a serem esclarecidas, o que valoriza o desenvolvimento de mais pesquisas na área.

Referências

- Arruda RP, Ball BA, Gravance CG, Garcia, AR, Liu IKM.** Effects of extenders and cryoprotectants on stallion sperm head morphometry. *Theriogenology*, v.58, p.253-256, 2002.
- Arruda RP, Barnabe VH, Alencar MM, Barnabe RC.** Avaliação de sêmen congelado de bovinos. Provas lenta e rápida de termo-resistência: efeitos sobre a fertilidade. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v.29, n.1, p.131-7, 1992.
- Arruda RP, Celeghini ECC, Alonso MA, Carvalho HF, Oliveira LZ, Nascimento J, Silva DF, Affonso FJ, Lemes KM, Jaimes JD.** Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.35, p.145-151, 2011.
- Arruda RP, Celeghini ECC, Garcia AR, Santos GC, Leite TG, Zocco L.** Morfologia espermática de touros: interpretação e impacto na fertilidade Bull sperm morphology: interpretation and impact on fertility. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.39, n.1, p.47-60, 2015.
- Arruda RP.** Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozoide equino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA). Tese - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2000, 121p.
- Barbosa EM, Ribeiro HFL, Rolim Filho ST, Freitas MR, Esteves AS, Conceição JCS, Garcia AR.** Uso da ocitocina e do cloprostenol na coleta de sêmen bubalino (*Bubalus bubalis*). In: Anais do III Congresso Norte-Nordeste de Reprodução Animal. Belém-PA: Universidade Federal Rural da Amazônia, 2006.
- Barros DV, Silva LKX, Lourenço Jr. JB, Silva AOA, Maciel e Silva AG, Franco IM, Oliveira CMC, Tholon P, Martorano LG, Garcia AR.** Evaluation of thermal comfort, physiological, hematological, and seminal features of buffalo bulls in an artificial insemination station in a tropical environment. *Trop Anim Health Prod.*, v.47, p.805-813, 2015.
- CBRA - Colégio Brasileiro de Reprodução Animal.** Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal. Belo Horizonte, 1998, 2ª Ed., 52p.
- CBRA - Colégio Brasileiro de Reprodução Animal.** Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal. Belo Horizonte, 2013, 3ª Ed., 104p.
- Celeghini ECC, Andrade AFC, Fernandes C, Nascimento J, Ticianelli JS, Arruda RP.** Damage assessment of the equine sperm membranes by fluorimetric technique. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, v.53, p.1285-1292, 2010.
- Celeghini ECC.** Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes. Tese - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, SP, 2005, 186p.
- Freneau GE, Chenoweth PJ, Ellis R, Rupp G.** Sperm morphology of beef bulls evaluated by two different methods. *Anim Reprod Sci*, v.118, p.176-181, 2010.
- Garcia AR.** Conforto térmico na reprodução de bubalinos criados em condições tropicais. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.37, p.121-130, 2013.
- Garcia AR.** Influence of environmental factors on reproductive characteristics of the river buffalo (*Bubalus bubalis*). *Rev. Ciênc. Agrár.*, v.45, p.1-15, 2006.
- Garcia OS, Vale WG, Garcia AR, Ribeiro HFL, Ferro RS, Rolim Filho ST, Sousa EM.** Experimental study of testicular insulation in buffalo. *Rev. Vet.*, v.21, p.889-891, 2010.
- Gonçalves AA, Garcia AR, Rolim Filho ST, Silva JAR, Melo DN, Guimaraes TC, Tavares HR, Silva TVG, Souza EB, Santos SSD, Ohashi OM.** Scrotal thermoregulation and sequential sperm abnormalities in buffalo bulls (*Bubalus bubalis*) under short-term heat stress. *J. Therm. Biol.*, v.96, p.102842, 2021.
- Hirai M, Boersma A, Hoefflich A, Wolf E, Foll J, Aumuller R, Braum J.** Objectively measured sperm motility and sperm head morphometry in boars (*Sus scrofa*): relation to fertility and seminal plasma growth factors. *J. Androl.*, v.22, p.104-110, 2001.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.** Rebanho de Bubalinos (Búfalos). Rio de Janeiro: IBGE, 2024. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/bubalinos/br>>.

Acesso em: 05.03.2026.

Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJ. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil.*, v.70, n.1, p.219-28, 1984.

Marai IFM, Haebe AAM. Buffalo's biological functions as affected by heat stress: a review. *Livest Sci.*, v.27, p.89-109, 2010.

Noronha GN, Hess MK, Dodds KG, Maciel e Silva AG, Souza SM, Silva JAR, Graças DA, Rodrigues TCGC, Silva WC, Silva EBR, Janssen PH, Henry HM, Rowe SJ, Castro VCG, Lourenço-Júnior JB. Characterization of the Ruminant Microbiome of Water Buffaloes (*Bubalus bubalis*) Kept in Different Ecosystems in the Eastern Amazon. *Animals*, v.13, p.3858, 2023.

Ohashi OM, Santos SSD, Miranda MS, Cordeiro MS, Costa NN, Silva TVG. Morfologia do sistema genital, distúrbio reprodutivo e manejo do macho bubalino (*Bubalus bubalis*). *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.35, p.88-94, 2011.

Ohashi OM. Inseminação artificial em bubalinos. In: *Biotécnicas aplicadas à Reprodução Animal*. São Paulo: Livraria Varela, 2002, p.97-110.

Ohashi OM, Sousa JS, Vale WG. Aspecto reprodutivo do macho bubalino. In: *Bubalinos: Fisiologia e patologia da reprodução*. Campinas. Fundação Cargill. 1988: p.69-86.

Polli VA, Restle A. Comportamento de bovinos e bubalinos em regime de confinamento - II. Hierarquia social. *Cienc. Rural*, v.25, n.1, p.133-137, 1995.

Ribeiro HFL. Uso de biotecnologias reprodutivas em bubalinos na Amazônia. *Cienc. Anim. Bras.*, v. 24, p.1-12, 2023.

Sansone G, Nastri MJF, Fabbrocini A. Storage of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. *Anim. Repr. Sci.*, v.62, p.55-76, 2000.

Santos AX, Kahwage PR, Faturi C, Quinzeiro Neto T, Lourenço Junior JB, Joele MRSP, Garcia AR. Feed supplementation with palm kernel cake-based concentrate increases the quality of water buffalo semen. *Anim Reprod.* v.11, p.85-95, 2014.

Silva JAR, Araújo AA, Lourenço Júnior JB, Santos, NFA; Garcia, AR, Oliveira RP. Thermal comfort indices of female Murrah buffaloes reared in the Eastern Amazon. *Int. J. Biometeorol.*, v.59, p.1261-1267, 2015.

Silva LKX, Lourenço Júnior JB, Silva AOA, Sousa JS, Maciel e Silva A, Reis AN, Miranda MS, Santos SSD, Ohashi OM, Martorano LG, Rocha Filho GN, Faturi C, Morais E, Mares ÉKL, Garcia AR. Increased quality of in natura and cryopreserved semen of water buffaloes supplemented with saturated and unsaturated fatty acids from the palm oil industry. *Anim. Reprod.*, v.17, n.4. e20200522, 2020.

Silva JAR, Garcia AR, Almeida AM, Bezerra AS, Lourenço Junior JB. Water buffalo production in the Brazilian Amazon Basin: a review. *Trop. Anim. Health Prod.*, v.53, p.1-21, 2021.

Silva LKX, Sousa JS, Silva AOA, Lourenço Junior JB, Faturi C, Martorano LG, Franco IM, Pantoja MHA, Barros DV, Garcia AR. Testicular thermoregulation, scrotal surface temperature patterns and semen quality of water buffalo bulls reared in a tropical climate. *Andrologia*, e12836, 2017.

Vale WG. Avances biotecnológicos em reproducción de búfalos. *Tecnología em Marcha*, v.24, n.5, p.89-90, 2011.

Vale WG. Collection, processing and deep freezing of buffalo semen. *Buffalo Journal*, Suppl.2, p.65-81, 1994.

Vale WG. Sperm cryopreservation. *Bubalus bubalis: J. Buffalo Sci. Tech.*, v.4, p.129-140, 1997.

Vilela RA, Lourenço Júnior JB, Jacinto MAC, Barbosa AVC, Pantoja MHA, Oliveira CMC, Garcia AR. Dynamics of thermolysis and skin microstructure in water buffaloes reared in humid tropical climate: a microscopic and thermographic study. *Front. Vet. Sci.*, v.9, p.871206, 2022.
