

## ASPECTOS FÍSICOS E MORFOLÓGICOS DO SÊMEN DE BUBALINOS DA RAÇA MURRAH EM MATURIDADE SEXUAL

Mariana Furtado Zorzetto<sup>1</sup>  
Yamê Fabres Robaina Sancler da Silva<sup>1</sup>  
Saulo Zocca<sup>2</sup>  
Gabriel Augusto Monteiro<sup>1</sup>  
Stephane Cássia Vexenat<sup>1</sup>  
Ian Martin<sup>1</sup>  
Eunice Oba<sup>3</sup>

### RESUMO

A importância da espécie bubalina está ligada a sua dupla habilidade de produção (carne e leite) e sua força de tração, levando notoriedade à espécie no cenário econômico mundial e a investimentos em programas tecnológicos semelhantes aos aplicados em bovinos. Esses programas visam aumentar a incorporação de biotecnologias reprodutivas a fim de se obter um incremento genético dos rebanhos bubalinos existentes no país e aumento da produtividade dos mesmos. Portanto, o principal objetivo de todas as análises de sêmen é obter precisão, de forma objetiva, rápida e barata podendo prever a fertilidade da amostra. Assim sendo, o objetivo do presente estudo foi avaliar as características morfológicas, a concentração, aspecto, cor, densidade e a integridade da membrana plasmática dos ejaculados de touros de diferentes idades no momento a fresco. Foram utilizados 4 touros bubalinos para colheitas seminais utilizando vagina artificial. O sêmen fresco foi analisado quanto ao seu volume, aspecto, cor, concentração (câmara de Neubauer), morfologia realizada por microscopia de interferência diferencial (DIC) e a cinética espermática pelo sistema CASA. A idade dos animais entre 48 a 84 meses diferem em relação aos defeitos maiores e concentração espermática em búfalos. Em búfalos, o aspecto seminal está relacionado à concentração espermática, sendo que altas concentrações espermáticas estão relacionadas ao aspecto leitoso e baixas concentrações espermáticas ao aspecto aquoso.

**Palavras-chave:** sêmen, búfalos, morfologia espermática.

### PHYSICAL AND MORPHOLOGICAL ASPECTS OF THE SEMEN OF MURRAH BUFFALOES IN SEXUAL MATURITY

#### ABSTRACT

The importance of the bubaline species is tied to its dual ability of production of meat and milk and its traction capacity, taking notoriety in the global economy and investments in technology programs similar to those used in cattle. These programs aim to increase the incorporation of reproductive biotechnologies in order to obtain a genetic increment of buffalo herds to increase their productivity. Therefore, the main aim of all semen analysis is get accuracy, objectively, fast and affordable to predict the fertility of the sample. Thus, the

<sup>1</sup> Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu. Contato principal para correspondência: mary-zorze@hotmail.com

<sup>2</sup> Graduando em Medicina Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu.

<sup>3</sup> Docente do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu.

objective of this study was to evaluate the morphological characteristics, concentration, appearance, color, density and plasma membrane integrity of fresh ejaculates of bulls from different ages. They were used four buffalo bulls for semen collection using artificial vagina. The fresh semen was analyzed for volume, appearance, color, concentration (Neubauer chamber), morphology performed by differential interference microscopy (DIC) and sperm kinetics by CASA system. The age of the animals between 48 and 84 months differ in relation to major defects and sperm concentration in buffaloes. In the buffalo, seminal aspect is related to sperm concentration, and in higher sperm concentrations are related to milky aspect and lower sperm concentration to the watery aspect.

**Keywords:** semen, buffalos, sperm morphology.

## ASPECTOS FÍSICOS Y MORFOLÓGICOS DEL SEMEN DE LOS BÚFALOS MURRAH EN LA MADUREZ SEXUAL

### RESUMEN

La importancia del búfalo está ligado a su capacidad para duplicar la producción (carne y leche) y su resistencia a la tracción, con lo que la notoriedad de la especie en la economía mundial y las inversiones en programas de tecnología similares a los utilizados en el ganado. Estos programas destinados a aumentar la incorporación de la biotecnología reproductiva con el fin de obtener una mayor rebaño búfalo genética en el país y el aumento de la productividad de los mismos. Por lo tanto, el objetivo principal de todos los análisis de semen consiste en precisión, objetiva, rápida y de bajo costo y puede predecir la fertilidad de la muestra. Por consiguiente, el objetivo de este estudio fue evaluar las características morfológicas, la concentración, la apariencia, el color, la densidad y la integridad de la membrana plasmática de toro eyacula de diferentes edades en el momento que se enfría. En el presente estudio, hemos utilizado 4 toros búfalo seminales de los cultivos utilizando vagina artificial. El semen fresco se analizó para determinar el volumen, aspecto, color, concentración (cámara de Neubauer), morfología realizado por microscopía de interferencia diferencial (DIC) y la cinética de esperma por el sistema CASA. La edad de los animales entre 48 y 84 meses difiere en relación con los defectos y la concentración de espermatozoides en los búfalos. En el aspecto seminal búfalo está relacionado con la concentración de esperma, y el aumento de las concentraciones de espermatozoides está relacionado con las concentraciones de espermatozoides lechosas y bajar el aspecto acuoso.

**Palabras clave:** semen, búfalos, morfología de los espermatozoides.

### INTRODUÇÃO

A importância da espécie bubalina está ligada a sua dupla habilidade de produção (carne e leite) e sua força de tração, levando notoriedade à espécie no cenário econômico mundial e a investimentos em programas tecnológicos semelhantes aos aplicados em bovinos. Estes programas visam aumentar a incorporação de biotecnologias reprodutivas a fim de se obter um incremento genético dos rebanhos bubalinos existentes no país e aumento da produtividade dos mesmos.

Portanto, o principal objetivo de todas as análises de sêmen é obter precisão, de forma objetiva, rápida e barata podendo prever a fertilidade da amostra (1).

O volume de sêmen deve ser medido imediatamente após a coleta. Varia dependendo da raça, idade, tamanho, números de saltos, métodos de colheita, nutrição do animal, saúde e

ambiente (2). Vale (3) e Almaguer et al. (4) sugerem que em touros na puberdade o volume é de cerca 1 mL e de 3 mL após atingirem a maturidade.

Koonjaenak e Rodriguez-Martinez (5) encontraram o volume de 3-4 ml em ejaculados da raça Nili-Ravi, que é semelhante ao descrito por Sajjad et al. (6). O volume de ejaculado varia dependendo da idade do touro, encontrando-se um aumento de volume entre 4 a 12 anos (7). Corroborando para esses achados, Nordin et al. (8) encontraram um maior volume de ejaculado em touros adultos do que nos jovens. De forma oposta, Javed et al. (9) não encontraram diferenças significativas no volume de sêmen de touros em diferentes idades.

A cor do ejaculado pode variar caso haja urina, sangue ou pus presente, ou ainda, devido à dieta do animal. A coloração pode variar desde acinzentado até o amarelo citrino (10).

A densidade do sêmen depende das variações na concentração de espermatozoides. Sêmen geralmente varia do branco leitoso ao creme, com um tom claro de azul, com a densidade do sêmen variando de aquoso, leitoso, leitoso-cremoso, até cremoso (11).

Vale (3) encontrou diferenças significativas na densidade entre espermatozoides vivos ou mortos. Koonjaenak e Rodriguez-Martinez (5) encontraram diferenças significativas na cor e densidade no sêmen do reprodutor bubalino e estas foram afetadas pela idade dos touros.

O número de espermatozoides é expresso em milímetros cúbicos. Para se determinar tal número, são usados métodos tais como: contagem em câmara de Neubauer e espectrofotometria (7). A concentração espermática tem grande variação (600 - 1500 milhões de células por mL) e este parâmetro é afetado por condições sazonais, nutricionais e a idade dos búfalos reprodutores (12, 13).

Medições mais rotineiras da concentração são feitas em espectrofotômetro. Em búfalos criados na Bahia (Brasil), foram observadas concentrações de  $1166,3 \pm 17,5 \times 10^6$  espermatozoides/mL (14). Em búfalos da raça Murrah criados na Índia, Kumar et al. (15) encontraram concentrações de  $524,1 \pm 20,7$ - $1031,4 \pm 28,7 \times 10^6$  espermatozoides/mL. Resultados semelhantes foram observados por Rattan (16) na raça Nili-Ravi, Koonjaenak e Rodriguez-Martinez (5).

Javed et al. (9) observaram menores concentrações de espermatozoides em búfalos mais velhos comparados com animais mais jovens. No entanto, Younis (17) não encontrou nenhuma diferença significativa na concentração de espermatozoides entre búfalos jovens e velhos.

O teste de viabilidade avalia a percentagem de espermatozoides vivos ou mortos em um ejaculado, bem como a integridade da membrana plasmática do espermatozoide. O corante preferivelmente usado é eosina-nigrosina. Em um eppendorf previamente aquecido a 37-38 °C, mistura-se 5 µL de sêmen com 15 µL de corante (eosina-nigrosina) e deixa-se em repouso durante 30 segundos. Faz-se um esfregão e deixa-se secar ao calor, observando em microscopia óptica de luz com ampliação de 40x. Os espermatozoides vivos e com membrana plasmática intacta não permitem a passagem de eosina para dentro da célula e ficarão de cor transparente à microscopia, enquanto que os espermatozoides mortos, com a perda funcional da região da membrana, permitem a passagem do corante, sendo observados de cor roxa (5).

A morfologia espermática avalia a percentagem de espermatozoides normais e anormais em uma dada amostra. Palacios (18) observou que a morfologia dos espermatozoides é um fator determinante na capacidade de fertilização do espermatozoide, uma vez que existe uma correlação entre os defeitos do esperma e a infertilidade.

Os espermatozoides podem apresentar alguns defeitos de conformação. Estas alterações são devidas à espermiogênese defeituosa, sendo por herança, enfermidade, estresse por calor ou frio, exposição a condições ambientais adversas, repouso sexual prolongado (mais de 60 dias), e técnicas inadequadas de manipulação do sêmen (19).

A maioria dos estudos que avaliaram anormalidades acrossomais foi realizada utilizando a coloração de Giemsa (20). Mais de 90% dos espermatozoides foram observados

com acrossoma intacto em touros da raça Murrah, em que o sêmen foi avaliado com o corante Giemsa (14,15). Talevi et al. (21) reportaram resultados semelhantes utilizando a fluorescência lectina.

Em estudos de Saeed et al. (19) em touros da raça Murrah, a maior parte das alterações foi encontrada na cabeça do espermatozoide ( $5,78 \pm 2,1\%$ ), enquanto que as anormalidades de peça intermediária foram menor que 1% e outras anormalidades variaram de  $3,92 \pm 1,0\%$  a  $5,7 \pm 0,4\%$ . O aparecimento de gota citoplasmática foi inferior a 1%. Proporções semelhantes de anormalidades foram observadas no sêmen de búfalos da raça Murrah do Brasil (14,15).

Sajjad et al. (6) em touros da raça Nili-Ravi com idade entre 12 a 15 anos mostrou alterações de  $11,67 \pm 0,90\%$  e semelhantes resultados foram encontrados por Saeed et al. (19).

Koonjaenak e Rodriguez-Martinez (5) encontraram menos de 15% de anormalidades em espermatozoides de búfalos, onde a anormalidade mais comum foi a cabeça piriforme, seguida de acrossomas Knobbed, que é a presença de um grânulo no acrossomo, sendo de origem hereditária e está ligado diretamente com a infertilidade do animal quando encontrado em grande quantidade. A terceira anormalidade mais encontrada foi a gota citoplasmática proximal e em seguida caudas dobradas. Esses resultados foram detectados por contraste de fase em microscopia de luz. Além disso, determinaram que a idade do búfalo reprodutor teve efeito significativo sobre a incidência geral de anormalidades de cabeça, defeitos do acrossoma, gota citoplasmática proximal e defeitos de cauda totais.

Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar as características morfológicas, a concentração, aspecto, cor, densidade e a integridade da membrana plasmática dos ejaculados de touros de diferentes idades no momento a fresco.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Local do experimento

O experimento foi conduzido na Universidade Estadual Paulista, Fazenda Experimental Lageado, FMVZ – UNESP/Botucatu. Os animais permaneceram confinados em piquete coberto com sombrite, cercado com cerca elétrica, contendo bebedouro com fornecimento de água *ad libitum* e comedouro.

### Animais

Dois meses antes do início do experimento, sete animais mestiços da raça Murrah foram condicionados à condução por cabresto, estimulação do salto e colheita de sêmen com vagina artificial modelo Botucatu. Foi utilizada uma fêmea da mesma espécie e raça como manequim para o momento da colheita; e a estimulação do estro foi induzida com a administração de 2,0 ml via intramuscular de Cipionato de Estradiol - ECP<sup>®</sup>. O cio foi observado 48h após a aplicação do hormônio.

Para o experimento, apenas quatro animais dos setes condicionados inicialmente foram coletados, pois três animais não apresentaram libido e se recusavam a montar. Os animais utilizados no experimento apresentavam idades de 48 (1 animal), 72 (2 animais) e 84 (1 animal) meses.

### Alimentação

Os sete machos ficaram confinados em baia coletiva e receberam a mesma dieta composta por concentrado comercial (18% PB), sal mineral *ad libitum* e feno (Tifton tipo A). A dieta foi fornecida duas vezes ao dia, pela manhã (8h) e tarde (16h), mantendo sobra diária referente a 5% do fornecido.

### **Colheita de sêmen**

Previamente ao início do experimento, os animais foram submetidos a um período de adaptação de 30 dias onde foram condicionados à colheita de sêmen (duas vezes por semana) e ao cabresto, sendo que, após esse período, deu-se início ao experimento. Nesse período, também foram realizadas duas colheitas semanais durante um mês com a finalidade de melhorar a qualidade do sêmen. A colheita de sêmen foi realizada com vagina artificial modelo Botucatu com temperatura entre 42 a 46 °C, preconizada por Vale (3). Durante o período experimental, as colheitas foram realizadas entre os meses de agosto e setembro, sendo 9 colheitas para o animal de 48 meses, 6 e 9 colheitas para os animais de 72 meses e 8 colheitas para o animal de 84 meses.

### **Análises do Ejaculado**

Na avaliação dos ejaculados foram consideradas as características macro e microscópicas, sendo, portanto, realizadas as seguintes análises:

- Mensuração do volume em tubo de ensaio graduado;
- Avaliação visual do aspecto e cor;
- Contagem da concentração espermática utilizando a câmara hematocitométrica de Neubauer, em diluição de 1:200.
- Amostras de sêmen (10µl de sêmen) foram conservadas em eppendorfs contendo 1,0 mL de formol salina em geladeira (4°C) para realização da porcentagem de patologias espermáticas (cauda, cabeça, acrossoma e peça intermediária) em microscopia de interferência diferencial (DIC), observado com lâmina e lamínula na objetiva de 100X.

### **Análise Estatística**

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo procedimento GLM descrito no SAS 9.2, 2011. E as diferenças entre médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ), sendo consideradas as seguintes causas de variações: idade (48, 72 e 84 meses), aspecto (aquoso e leitoso) e cor (amarela e marfim).

## **RESULTADOS**

O volume médio variou entre 3,14 e 4,46 mL, em que o animal de idade de 48 meses apresentou maior volume seminal em relação aos animais de 72 meses (Tabela 1).

Quanto aos defeitos maiores, os mais encontrados no presente estudo foram cauda fortemente dobrada ou enrolada, seguido dos defeitos de acrossoma; já para os defeitos menores, os mais frequentes foram cauda dobrada ou enrolada e gota citoplasmática distal.

O animal com 48 meses apresentou diferença estatística em relação aos animais com idade de 72 meses, porém, não foi diferente para o animal de 84 meses com relação a defeitos maiores (Tabela 1).

Tabela 1. Valores médios, desvio padrão e coeficiente de variância, das características: Volume (VOL), concentração (CONC), defeitos maiores (DMAI) e defeitos menores (DMEN) entre as idades dos touros.

IDADE (meses)	Variáveis			
	VOL (mL)	CONC ( $\times 10^9$ )	DMAI (%)	DMEN (%)
48	4,46 <sup>a</sup>	0,68	14,58 <sup>a</sup>	4,94
72	3,14 <sup>b</sup>	0,52	26,56 <sup>b</sup>	6,50
84	3,55 <sup>ab</sup>	0,43	21,53 <sup>ab</sup>	5,08
Média $\pm$ DP	3,16 $\pm$ 1,06	35,41 $\pm$ 76,11	20,28 $\pm$ 9,03	5,09 $\pm$ 3,83
CV%	33,74	214,96	44,54	75,12

\*Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ )

A Tabela 2 apresenta os valores médios, desvio padrão e coeficiente de variância do volume, concentração espermática e defeitos maiores e menores dos espermatozoides em relação ao aspecto.

O aspecto foi significativo apenas para concentração, sendo que a maior concentração de espermatozoides apresentou aspecto leitoso e a menor, aspecto aquoso, para volume, defeitos maiores e menores não houve significância (Tabela 2).

Tabela 2. Valores médios, desvio padrão e coeficiente de variância, das características: Volume (VOL), concentração (CONC), defeitos maiores (DMAI), defeitos menores (DMEN) em relação ao aspecto seminal.

ASPECTO	Variáveis			
	VOL (mL)	CONC ( $\times 10^9$ )	DMAI (%)	DMEN (%)
Aquoso	2,25	0,35 <sup>b</sup>	18,75	5,07
Leitoso	3,29	0,85 <sup>a</sup>	20,50	5,25
Média $\pm$ DP	3,16 $\pm$ 1,06	35,41 $\pm$ 76,11	20,28 $\pm$ 9,03	5,09 $\pm$ 3,83
CV%	33,74	214,96	44,54	75,12

\* Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ )

A Tabela 3 apresenta os valores médios, desvio padrão e coeficiente de variância do volume, concentração espermática e defeitos maiores e menores dos espermatozoides em relação à cor do ejaculado.

A cor foi significativa para volume e concentração espermática, sugerindo que o ejaculado de cor amarela tem relação com maior volume e concentração espermática, e a cor marfim com menores volume e concentração espermática (Tabela 3).

Tabela 3. Valores médios, desvio padrão e coeficiente de variância, das características: Volume (VOL), concentração (CONC), defeitos maiores (DMAI), defeitos menores (DMEN) em relação a cor do ejaculado.

COR	Variáveis			
	VOL (mL)	CONC ( $\times 10^9$ )	DMAI (%)	DMEN (%)
Marfim	2,96 <sup>b</sup>	0,70 <sup>b</sup>	20,59	5,00
Amarela	5,00 <sup>a</sup>	1,57 <sup>a</sup>	17,33	6,00
Média $\pm$ DP	3,16 $\pm$ 1,06	35,41 $\pm$ 76,11	20,28 $\pm$ 9,03	5,09 $\pm$ 3,83
CV%	33,74	214,96	44,54	75,12

\* Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ )

## DISCUSSÃO

O volume variou entre 3,55 a 4,46 mL, apresentando maior volume o animal mais jovem (48 meses). Vale (3) e Almaguer et al. (4) sugerem que touros na puberdade apresentam volume de cerca de 1 ml e após atingirem a maturidade de 3 mL. No presente estudo, todos os animais utilizados estavam maduros sexualmente, portanto, o volume está de acordo com o preconizado pelos autores acima citados.

Para corroborar com os resultados do presente estudo, Koonjaenak e Rodriguez-Martinez (5) e Sajjad et al. (6) relataram volumes entre 3 a 4 ml em ejaculados da raça Nili-Ravi. O volume do ejaculado varia dependendo da idade do touro, encontrando um maior volume em animais de 4 a 12 anos (7). Esses resultados condizem com os resultados obtidos nesse estudo, em que touros de 4, 6 e 7 anos apresentaram volumes entre 3,55 a 4,46 mL, como citado acima. Também corroborando com os achados, Nordin et al. (8) encontraram um maior volume de ejaculado em touros adultos do que nos jovens. Entretanto, Javed et al. (9) não encontraram diferenças no volume de sêmen de touros em diferentes idades.

Quanto aos defeitos maiores, observou-se, nesse estudo, um predomínio de cauda fortemente dobrada ou enrolada, seguido dos defeitos de acrossoma. Os defeitos menores mais encontrados foram de cauda dobrada ou enrolada e de gota citoplasmática distal. Esses resultados contradizem Saeed et al. (19), que relataram em touros da raça Murrah, maior incidência de patologias na cabeça do espermatozoide ( $5,78 \pm 2,1\%$ ), enquanto que as anormalidades de peça intermediária foram menor que 1%. Esses mesmos autores relataram que o aparecimento de gota citoplasmática foi inferior a 1%, o que difere do presente estudo onde a gota citoplasmática distal foi o segundo maior defeito encontrado entre os defeitos menores.

Isso pode ter ocorrido caso a idade, tratamento, protocolos, número de colheitas de sêmen e manejo usados pelos autores, sejam diferentes do utilizado no presente estudo, influenciando as alterações diferentes nos espermatozoides dos búfalos. Porém, ambos os trabalhos apresentam percentagens de defeitos morfológicos espermáticos dentro da faixa da normalidade (30%).

Corroborando para os dados obtidos nesse estudo, Koonjaenak e Rodriguez-Martinez (5) determinaram que a idade do búfalo reprodutor tem efeito significativo sobre a incidência geral de anormalidades de cabeça, defeitos do acrossoma, gota citoplasmática proximal e defeitos de cauda totais. Em nosso estudo, os animais de 72 e 84 meses apresentaram maior incidência de patologia espermática. Contudo, os animais mais velhos empregados nesse estudo tinham apenas 7 anos, o que é compatível com touros em reprodução normal (22), e o quadro espermático observado está dentro dos valores normais de patologia espermática.

O aspecto foi significativo apenas para concentração, sendo observado que a maior concentração de espermatozoides apresentou aspecto leitoso (10). A cor foi significativa para volume e concentração espermática, inferindo que o ejaculado de cor amarela tem relação

com volume e concentrações maiores, e a cor marfim com volume e concentrações menores. De forma similar ao presente estudo, Canizales (11) relatou que a densidade do sêmen depende das variações na concentração de espermatozoides. Esse mesmo autor relatou que o sêmen geralmente varia do branco leitoso ao creme, com um tom claro de azul, com a densidade do sêmen variando de um aquoso, leitoso, leitoso-cremoso, até cremoso. É sabido que a coloração do sêmen varia de acordo com a idade, alimentação e presença de outros elementos (10) e não foi encontrado na literatura nenhum trabalho que relacionasse a cor com o volume e a concentração seminal.

## CONCLUSÃO

A idade dos animais entre 48 a 84 meses diferem em relação aos defeitos maiores e concentração espermática em búfalos.

Em búfalos, o aspecto seminal está relacionado à concentração espermática, sendo que altas concentrações espermáticas estão relacionadas ao aspecto leitoso e baixas concentrações espermáticas ao aspecto aquoso.

## REFERÊNCIAS

1. Gillan L, Evans G, Maxwell WMC. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology*. 2005;63:445-7.
2. Nazir M. Semen evaluation and sperm morphology. Monograph on reproductive pattern of riverine Buffaloes and recommendations to improve their reproductive performance at small farmer level. Islamabad: Pakistan Agriculture Research Council; 1988.
3. Vale WG. Collection, processing and deep freezing of buffalo semen. *Buffalo J*. 1994;2:65-81.
4. Almaguer P. El búfalo una opción de la ganadería. *Rev Electron Vet*. 2007;8:1-8.
5. Koonjaenak S, Rodriguez-Martinez M. Assessment of semen quality in Swamp Buffalo AI Bulls in Thailand. *Ital J Anim Sci*. 2007;6 Suppl 2:S701-4.
6. Sajjad S, Ali S, Ullah N, Anwar M, Akhter S, Andrabi SMH. Blood serum testosterone level and its relationship with scrotal circumference and semen characteristics in Nili-Ravi buffalo bulls. *Pakistan Vet J*. 2007;27:63-6.
7. Pant HC, Sharma RK, Patel SH, Shukla HR, Mittal AK, Kasiraj R, et al. Testicular development and its relationship to semen production in Murrah buffalo bulls. *Theriogenology*. 2003;60:27-34.
8. Nordin W, Hilmi M, Bongso TA. Semen characteristics related to age in growing swamp buffalo (*Bubalus bubalis*). *Buffalo J*. 1990;2:6-161.
9. Javed MT, Khan JR, Kausar P. Effect of age and season on some semen parameters of Nili-Ravi buffalo (*Bubalus bubalis*) bulls. *Vet Arh*. 2000;70:83-94.
10. Hafez B, Hafez ESE. Reprodução animal. 7a ed. Barueri: Manole; 2004.
11. Canizales SA. Características seminales del Búfalo de água (*Bubalus bubalis*). *Rev Colomb Cienc Anim*. 2011;4:95-102.

12. Vale WG, Ribeiro HFL, Sousa JS, Ohashi OM. Inseminação artificial em búfalos (*Bubalus bubalis*) na região amazônica. In: Anais do 19o Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária; 1984; Belém. Belém: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária; 1984. p.91.
13. Lohachit C. Anatomy and clinical examination on female reproductive org of swamp buffalo reproduction. In: Chantaraprteep P, Virakul P, Lohachit C, Kunavongkrit A. Swamp buffalo reproduction. Bangkok: Chulalongkorn University Press; 1987. p.93-115.
14. Aguiar P, Andrade V, Abreu J, Gomez A. Physical and morphological semen characteristics of buffaloes aged from four to eight years old. In: Proceedings of the 4th International Buffalo Congress; 1994; São Paulo. São Paulo: International Buffalo Federation; 1994. p.486-8.
15. Kumar S, Sahni KL, Benjamin BN, Mohan G. Effect o various levels of yolk on deep freezing and storage of buffalo semen in different diluters without adding glycerol. Buffalo J. 1993;1:79-85.
16. Rattan PJS. Physico–chemical constituents of buffalo bull semen. In: Acharya RM, Lokeshwar RR, Kumar S. Recent advances in buffalo research. New Delhi: Indian Society of Buffalo Development; 1990. p.26-30.
17. Younis M. Studies on semen quality, freezability and fertility of buffalo bulls during low and peak breeding seasons [thesis]. Faisalabad: University of Agriculture Faisalabad; 1996.
18. Palacios C. Técnicas para la evaluación de la capacidad fecundante de espermatozoides. Memorias posgrado de reproducción bovina. CGR Colombia; 2005.
19. Saeed A, Chaudhry R, Khan IH, Khan NU. Morphology of semen buffalo bulls of different age groups. In: Acharya RM. Recent advances in buffalo research. New Delhi: Indian Society of Buffalo Development; 1990. p.17-9.
20. Ramakrishnan P, Ariff M. Effect of glycerol level and cooling rate on post-thaw semen quality of Malaysian swamp buffalo. In: Proceedings of the 4th International Buffalo Congress; 1994; São Paulo. São Paulo: International Buffalo Federation; 1994. p.540-2.
21. Talevi R, Pelosi S, Sansone G, Grasso F, Matassino D. Effects of different pre-freezing rates on buffalo sperm. Motility and ultrastructure preservation. In: Proceedings of the 4th International Buffalo Congress; 1994; São Paulo. São Paulo: International Buffalo Federation; 1994. p.537-9.
22. Oba E, Fuck EJ, Bicudo SD, Papa FO, Ohashi OM. Estudo preliminar de diferentes meios para congelação de sêmen de búfalos. In: Anais do 10o Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária; 1993; Belo Horizonte. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal; 1993. p.337.

**Recebido em: 04/03/2013**

**Aceito em: 12/09/2016**