



## Tecnologias de Reprodução Assistida (TRAs) aplicadas aos búfalos (*Bubalus bubalis*) no Brasil: Quatro décadas de ganhos genéticos e insights históricos

*Assisted Reproductive Technologies (ARTs) applied to buffalo (*Bubalus bubalis*) in Brazil: Four decades of genetic gains and historical Insights*

Vale WG<sup>1\*</sup>, Ribeiro HFL<sup>2</sup>, Barbosa LAL<sup>2</sup>, Filho STR<sup>2</sup>, Neves KAL<sup>3</sup>, Silva AOA<sup>4</sup>, Lima WJF<sup>2</sup>, Freitas VJF<sup>1</sup>, Silva AFB<sup>1</sup>, Melo LM<sup>1</sup>, Kumar S<sup>1</sup>, Baruselli PS<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza, Ceará, Brasil, <sup>2</sup>Laboratório de Reprodução Animal, Instituto de Saúde e Produção Animal, Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), Belém, Pará, Brasil, <sup>3</sup>Instituto de Biodiversidade e Florestas, Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA), Santarém, Pará, Brasil, <sup>4</sup>Central de Biotecnologia de Reprodução Animal (CEBRAN), Universidade Federal do Pará (UFPA), Campus de Castanhal, Pará, Brasil, <sup>5</sup>Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo (FMVZ/USP), Departamento de Reprodução Animal (VRA), São Paulo, Brasil

### Resumo

O congelamento do sêmen, a inseminação artificial em tempo fixo (IATF), a produção *in vitro* de embriões (PIVE) e tecnologias relacionadas em búfalos (*Bubalus bubalis*) avançaram significativamente nos últimos anos, resultado de uma maior compreensão do potencial dessas ferramentas pelos usuários finais. A combinação da PIVE com sêmen sexado (SS) de reprodutores selecionados, oriundos de rebanhos de elite de alta produção, tem sido bem-sucedida e amplamente utilizada no Brasil e em outros países da América do Sul. As principais vantagens dessas tecnologias incluem a obtenção de um maior número de bezerros com alto valor genético em menor intervalo de tempo. Atualmente, é possível utilizar como doadoras fêmeas cíclicas não gestantes, fêmeas com até três meses de gestação e novilhas pré-púberes para a recuperação de oócitos destinados à produção de descendentes geneticamente superiores. Além disso, a PIVE requer um número reduzido de espermatozoides por fertilização, com maiores chances de obtenção da prole com o sexo desejado. No entanto, aspectos ainda não totalmente solucionados da PIVE limitam sua aplicação em maior escala, como a fertilidade potencialmente reduzida pelo uso de SS, a qualidade inferior dos oócitos após a maturação *in vitro* e a menor criotolerância dos embriões produzidos, o que resulta em taxas de prenhez inferiores às observadas com embriões obtidos *in vivo*. Apesar dessas limitações, pesquisas têm apresentado resultados promissores, e esforços contínuos buscam superar tais desafios. A combinação de IATF, PIVE e SS tem demonstrado sucesso em contextos comerciais em diversos países, auxiliando profissionais e produtores a melhorar o desempenho reprodutivo, a eficiência dos sistemas de produção e o ganho genético dos rebanhos bubalinos, e em especial no combate a consanguinidade (**inbreeding**), limitado pela dificuldade da introdução de germoplasma para promoção da heterose entre as diferentes raças criadas no Brasil e América Latina.

**Palavras-chave:** ARTs, *Bubalus bubalis*, IATF, PIVE.

### Abstract

*The semen freezing, fixed-time artificial insemination (FTAI), in vitro embryo production (IVEP), and related technologies in buffaloes (*Bubalus bubalis*) have advanced significantly in recent years, driven by a greater understanding of the full potential of these tools by end users. The combination of IVEP with sex-sorted semen (SS) from elite high-producing breeding bulls has been successful and widely adopted in Brazil and other South American countries. The main advantages of these technologies include the ability to produce a larger number of genetically superior calves in a shorter time frame. Currently, potential oocyte donors include cyclic non-pregnant females, females up to three months pregnant, and prepubertal heifers, all of which can be used to produce genetically valuable offspring. Furthermore, IVEP requires fewer spermatozoa per fertilization, with increased chances of obtaining offspring of the desired sex. However, some unresolved issues still limit the broader application of IVEP, such as potentially reduced fertility when using SS, lower oocyte quality after in vitro maturation, and decreased cryotolerance of embryos. These factors contribute to lower pregnancy rates compared to embryos produced in vivo. Despite*



*these limitations, promising research results have been reported, and continuous efforts are underway to overcome these challenges. The combination of FTAI, IVEP, and SS has shown commercial success in several countries, helping professionals and buffalo producers improve reproductive performance, production efficiency, and genetic gain in buffalo herds, limited by the difficulty of introducing germplasm to promote heterosis among the different breeds bred in Brazil and Latin America.*

**Key words:** ARTs, *Bubalus bubalis*, FTAI, IVEP.

## Introdução

A população mundial de búfalos é de cerca de 205 milhões de cabeças, enquanto a população brasileira é de 1.598.268 cabeças (FAO/STAT, 2022). A região Norte apresenta a maior densidade populacional, com mais de 800.000 cabeças. O estado do Amapá detém 23,61% do rebanho bubalino nacional, mas é o estado do Pará que assume protagonismo na bubalinocultura regional, concentrando 33,83% do rebanho nacional, com 320.784 cabeças. A região Amazônica, por sua vez, abriga mais de 50% do rebanho nacional (IBGE, 2022). Entretanto, os dados oficiais referentes à população de bubalinos no Brasil parecem subestimados e têm sido contestados por diversas instituições e pesquisadores, inclusive pela ABCB (2025), que estima uma população de aproximadamente 3 milhões de cabeças.

Apenas a região Amazônica, com mais de 6 milhões de hectares de várzeas nativas e pastagens de terra firme, desde o médio Amazonas até sua foz no litoral norte da Ilha de Marajó, deve abrigar uma população superior a 1 milhão de cabeças. Essa região é reconhecida pela FAO como o “paraíso dos búfalos”, conforme descrito pelo eminente cientista William Ross Cockrill. O búfalo doméstico (*Bubalus bubalis*), originário da Ásia, passou pela África e Europa antes de ser introduzido no continente americano. Alguns relatos indicam que os primeiros búfalos chegaram à Amazônia brasileira na década de 1890, trazidos por fugitivos da Guiana Francesa ou como sobreviventes de um naufrágio na costa da Ilha de Marajó. Oficialmente, contudo, a introdução da espécie foi registrada em 1902, com a importação de búfalos da raça Mediterrânea da Itália, promovida por Bertino Lobato de Miranda para a Fazenda São Joaquim, às margens do Rio Arari, na Ilha de Marajó. Atualmente, os búfalos estão distribuídos por todo o território nacional, empregados na tração animal e na produção de carne e leite. As raças mais comuns são: Mediterrânea, Murrah, Jafarabadi e Carabao (Vale, 1996; Vale et al., 2013).

A criação de búfalos se destaca pela rusticidade, longevidade e adaptabilidade, sendo uma importante fonte alternativa de proteína animal. Além da capacidade de produzir carne e leite mais saudáveis, esses animais apresentam excelente conversão alimentar, aproveitando pastagens nativas de baixo valor nutricional em áreas de difícil exploração por outras espécies (Napolitano et al., 2023). Sua alta adaptabilidade às condições edafoclimáticas da região Amazônica os torna uma alternativa viável, sendo capazes de produzir e se reproduzir em áreas adversas e ociosas, como várzeas e margens de rios, com oferta permanente de pastagens e forragens a custo zero. Em outras regiões do Brasil, especialmente em estados como São Paulo, Minas Gerais, Rio Grande do Sul e Bahia, as tecnologias de reprodução assistida (ARTs) têm permitido a aplicação da inseminação artificial em tempo fixo (IATF), promovendo a disseminação de genes superiores e aumentando o ganho genético de características desejáveis, com melhores resultados produtivos e reprodutivos (Baruselli et al., 2023). De modo geral, a adaptação das ARTs aos búfalos está relacionada a desafios próprios da espécie, como a sazonalidade em regiões próximas ao Trópico de Capricórnio, dificuldades na detecção de estro, anestro prolongado e anovulação, que causam prejuízos significativos (Vale; Ribeiro, 2005). Fatores como alimentação e protocolos hormonais para indução e sincronização do estro também são determinantes, permitindo programar a IATF em um período definido (Couto, 2007). Esses entraves vêm sendo superados com o aprimoramento do manejo (Kumar et al., 2023).

Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo realizar uma revisão que construa uma visão retrospectiva e diacrônica do desenvolvimento e aplicação das ARTs em bubalinos no Brasil. Parte-se da congelamento de sêmen e dos primeiros estudos sobre o comportamento reprodutivo das fêmeas ao longo do ciclo estral, detectando restrições no manejo da IATF em diferentes sistemas de criação (extensivo e intensivo), além de apresentar uma revisão da literatura nacional e internacional sobre o tema, com destaque para novas perspectivas e futuras investigações. Inicia-se com uma narrativa sobre os primórdios da IA na região, os estudos que fundamentaram sua história, o desenvolvimento da ultracongelamento de sêmen, a utilização do estro natural em búfalas, o uso experimental de diferentes protocolos hormonais e a busca por terapias específicas, fruto de inúmeros testes com o objetivo de estabelecer protocolos ideais para fêmeas criadas na Amazônia brasileira. A inseminação artificial em bubalinos visa à melhoria qualitativa e quantitativa da produção de carne e leite. Ao contrário dos bovinos, os búfalos têm sido pouco submetidos



à IA como rotina para melhoramento genético. Poucos países adotam a técnica com frequência, e os conhecimentos científicos sobre as metodologias são relativamente recentes. No Brasil, os primeiros estudos sobre reprodução em búfalos foram realizados na região Norte pela equipe do Prof. William Gomes Vale, da Universidade Federal do Pará (Vale et al., 1984), seguidos pelo trabalho do Prof. Pietro Sampaio Baruselli, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

### **A era primordial da IA na América Latina**

Na América Latina, várias tentativas foram realizadas para a utilização da IA em búfalos, mas enfrentaram dificuldades principalmente relacionadas à congelação do sêmen. No Brasil, os primeiros resultados exitosos ocorreram no final da década de 1980, quando o Prof. William Gomes Vale e sua equipe da Universidade Federal do Pará, com a orientação do Prof. Dr. Hans Merkt e da Profa. Dra. Anne-Rose Guenzel, da Clínica de Andrologia e Inseminação Artificial da Escola de Medicina Veterinária de Hannover, Alemanha, iniciaram um “programa piloto” voltado à congelação do sêmen de touros bubalinos regionais. Utilizando diluentes à base de TRIS (hidroximetil) metilaminometano e TES (hidroximetil) etilaminoetano, Vale et al. (1984) obtiveram sucesso na congelação de sêmen e nas primeiras inseminações artificiais, alcançando índices de fertilidade de 50%, com base na taxa de não retorno aos 60 dias pós-inseminação. Posteriormente, os mesmos autores obtiveram taxas de parto superiores a 70%. Esses avanços impulsionaram a disseminação da técnica por todo o Brasil e em outros países, consolidando a IA como uma ferramenta essencial para o melhoramento genético dos bubalinos no continente americano.

### **Requisitos básicos necessários para o sucesso da IA em búfalos**

Antes de programar quaisquer eventos reprodutivos em búfalos, é necessário o conhecimento das características reprodutivas específicas desta espécie.

### **Puberdade e ciclo estral**

Os búfalos atingem a puberdade e maturidade sexual mais tardiamente que os bovinos, com variação entre 24 e 30 meses para as raças Murrah, Mediterrânea, Jafarabadi e seus cruzamentos. No entanto, em boas condições de manejo, as novilhas podem atingir a puberdade entre 13 e 15 meses de idade, sendo recomendada a inseminação artificial a partir dos 320 kg de peso corporal. Já a raça Carabao e seus cruzamentos podem atingir a puberdade até os 36 meses (Vale, 2000).

Do ponto de vista fisiológico, os búfalos são animais poliéstricos sazonais de dias curtos, comportamento semelhante ao observado em ovinos e caprinos. Na região centro-sul do Brasil, onde há variações sazonais no fotoperíodo, observa-se maior frequência de manifestações de estro no outono, (Baruselli, 1993) Por outro lado, nas zonas equatoriais, como na Amazônia, as búfalas demonstram comportamento poliéstrico contínuo, com a atividade reprodutiva influenciada principalmente pela nutrição – incluindo suplementação mineral – e manejo, especialmente no que se refere à proteção contra o estresse térmico (Vale; Ribeiro, 2005; Harun-Or-Rashid et al., 2019;).

Nesse contexto, em clima tropical equatorial úmido ou seco, o ciclo estral das búfalas varia entre 18 e 32 dias, com média de 21 dias. A duração do estro oscila entre 5 e 27 horas, com média de 20 horas, e a ovulação ocorre entre 24 e 48 horas após o início do cio (Vale, 1984). Relatos sobre a duração do ciclo estral, o período de estro e a época da ovulação em diferentes países estão sumarizados na **Tabela 1**.

### **Manejo**

Normalmente, um dos pontos importantes no sistema de produção de búfalos que começa a usar IA é fornecer um sistema de manejo sustentável vinculado à produção de forragem e valor nutritivo, taxas de lotação, métodos de lotação e oportunidades para combinar forragens com as necessidades dos animais para produção (Sarwar et al., 2009). No entanto, na maioria dos sistemas de criação de búfalos no Brasil, isso não ocorre, pois o sistema de produção de capim nativo é quase ideal para a época de parto dos búfalos, como geralmente ocorre nas áreas de várzea do rio Amazonas e seus afluentes (Vale et al., 2013). Quando inunda, deposita uma camada de solo fino, sais minerais ricos, silte rico em nutrientes, sedimento e os distribui por uma ampla área (Tourinho, 1996). Esses sedimentos tornam o solo muito fértil e levam à formação de uma planície de inundação muito plana e fértil. Na estação das águas, que coincide com as cheias dos rios, o G1 (mata ripária e tensa) é o mais importante para o pastoreio dos búfalos, enquanto na estação seca (vazante dos rios) o G2 (serra de transição) e o G3 (campos baixos) também são pastoreados



pelos bubalinos (Ribeiro et al., 2003).

As gramíneas da família *Poaceae sp.* são os principais membros do estrato vegetal herbáceo das pastagens nativas de solo aluvial. É neste estrato que os rebanhos bovinos e bubalinos pastam com maior intensidade, quando o nível das águas permite. A maioria são espécies hidrófitas (“anfíbios”) que vegetam flutuando ou mesmo submersas na água, durante as cheias dos rios, por mais de quatro meses; essas espécies pertencem aos gêneros *Echinochloa sp.*, *Oryza sp.*, *Leersia sp.*, *Luziola sp.* e *Hymenachne sp.* (Camarão; Filho, 2001). Atualmente muitas fazendas estão produzindo alimentos, como as variedades *Pennisetum purpureum* (capim-elefante) e cupiaçú, cana-de-açúcar *Saccharum officinarum*, mandioca *Manihot sculenta*, *Sorghum sp.* e milho *Zea mays*. Entretanto, maiores níveis de produtividade são alcançados com a suplementação alimentar de subprodutos com macro e microminerais, conforme as deficiências locais (Teixeira et al., 2020).

### Nutrição

Existem inúmeros relatos de que búfalas submetidas a alimentação inadequada não entram em cio ou, quando o fazem, apresentam taxa de concepção reduzida, devido à incapacidade de manter uma gestação saudável (Vale, 1996). A percepção equivocada de muitos criadores sobre a rusticidade da espécie leva à expectativa de declínio na produção de carne e leite e na fertilidade quando o fornecimento de alimentos é insuficiente (Bertoni et al., 2021). Embora originalmente explorados nas várzeas da Amazônia, os búfalos conquistaram melhor aceitação como alternativa econômica em relação aos bovinos, apresentando desempenho favorável tanto na produção de carne quanto de leite. Os produtores valorizam sua resistência a doenças comuns em bovinos, maior desenvolvimento e ganho de peso, elevada qualidade de carne e leite e capacidade de engorda em diferentes tipos de gramíneas (da Silva et al., 2021). Além disso, os búfalos atingem a precocidade e a lucratividade, sendo frequentemente chamados de “dinheiro que anda sozinho”. Essas características contribuíram para o crescimento anual de quase 13% dos rebanhos bubalinos na Amazônia brasileira (Vale et al., 2013).

Tabela 1. Relatos em diferentes países sobre a duração do ciclo estral, período estral e época da ovulação.

País	Duração do ciclo estral (dias)	Duração do cio estro (horas)	Ovulação após o final do estro (horas)	Referências
Brasil	24 (16-33)	24 (12-31)	20 (9-30)	Vale (1983)
Brasil	21 (18-26)	15 (6-24)	17 (6-30)	Baruselli (1993)
Bulgária	21	24-36	--	Ivanov e Zachariev (1996)
China	26 (12-30)	--	11 (0-41)	Wang et al. (1965)
China	24	43	--	Wang (1979)
Índia	23 (20-27)	24 (15-27)	11 (4-23)	Rao e Kodagali (1983)
Índia	21 (17-26)	12-72	12-24	
Índia	22	24	11 (4-23)	Pradyumna Rao et al. (1982)
Indonésia	21 (19-25)	41 (24-66)	--	Toelihere (1977)
Itália	21 (15-29)	20 (4-64)	24 (5-40)	Seren e Parmeggiani (1997)
Malásia	22 (17-24)	12-24	12-18	Jainudeen (1986)
Japão	22 (11-35)	20 (9-27)	14 (6-21)	Kanai e Shimizu (1983)
Tailândia	22	17-27	--	Kamonpatana et al. (1979)

### Condição de pontuação corporal no parto e na inseminação

O escore de condição corporal (ECC) no parto e durante a inseminação artificial subsequente

influencia tanto o intervalo parto–primeiro estro (ICFE) quanto a taxa de concepção (TC), sendo, portanto, um parâmetro essencial no manejo reprodutivo de bubalinos. Ao aplicar quaisquer técnicas de reprodução assistida (ARTs), recomenda-se avaliar o ECC em uma escala de 1 a 5 e monitorar a variação desse escore entre o parto e a inseminação (Vale, 2007).

Pesquisadores indianos (Bhalaru et al., 1987) observaram que o estado corporal das búfalas interferiu no início do cio e nos índices de fertilidade obtidos com a IA. Búfalas que estavam magras no momento do parto demoraram muito para manifestar o cio e tiveram fertilidade reduzida quando comparadas a outras em boa condição de escore corporal (BSC). Animais que perdem muito peso após o parto também apresentam queda na fertilidade. Conseqüentemente, o bom estado nutricional do rebanho é fundamental para o sucesso do manejo reprodutivo em búfalas. Portanto, parece óbvio que búfalas que estão muito gordas no parto provavelmente terão dificuldades no parto e são mais propensas à morte fetal precoce, assim como fêmeas que estão muito magras, especialmente se estiverem perdendo condição corporal, terão estro atrasado e RC ruim, (Figura 1).

Outro fator crítico antes da IA é a completa involução uterina. Normalmente, a involução ocorre entre 20 e 30 dias após um parto normal e sem traumas. Portanto, recomenda-se exame clínico do útero antes de nova IA. Em búfalas de alto rendimento cujo ECC esteja abaixo de 2,5, pode ser necessário prolongar o intervalo pós-parto para melhorar as taxas de concepção e reduzir perdas embrionárias ou fetais precoces (Vale et al., 1986). Além disso, a fêmea deve estar em boas condições de saúde e livre de infecções do trato reprodutivo. Atenção especial deve ser dada a fêmeas que sofreram distocia, retenção de placenta ou prolapso uterino, pois elas podem exigir período adicional para involução uterina e retorno à fertilidade. Quando se utiliza estro natural, o técnico de IA deve confirmar, preferencialmente por exame veterinário, que a búfala está em estro e não prenhe; em caso de suspeita de gestação, a inseminação deve ser adiada.

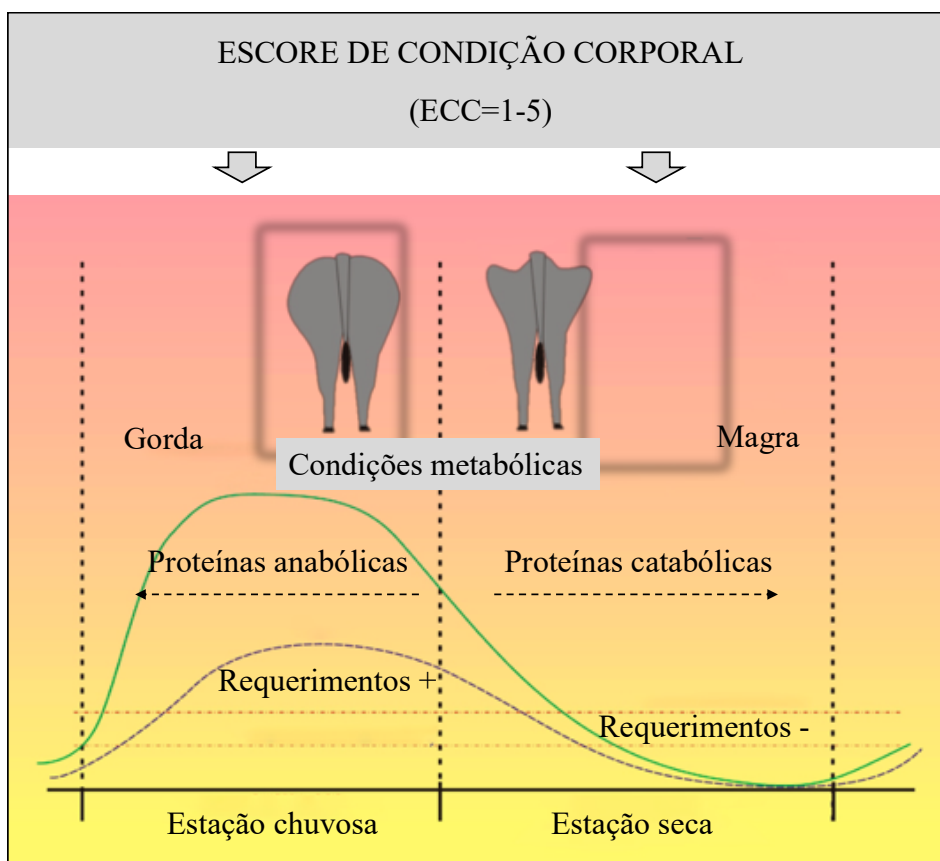


Figura 1. Apresentação do estado nutricional e escore de condição corporal (ECC) de búfalas criadas na estação chuvosa – condição anabólica devido maior oferta de forragem e, na estação seca – condição catabólica devido à escassez de oferta de forragem, segundo Vale (2007).

### Congelação do sêmen do búfalo

A inseminação artificial convencional teve seus primeiros testes na Amazônia no início de 1979,



por meio de pesquisas realizadas pelo Laboratório de Reprodução Animal da Faculdade de Ciências Agrárias do Pará (FCAP), atualmente Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), em Belém, no estado do Pará. As pesquisas foram realizadas em parceria com o Instituto de Andrologia e Inseminação Artificial da Escola de Medicina Veterinária de Hannover, na República Federal da Alemanha, e com os criadores locais, que disponibilizaram sua infraestrutura de fazendas e seus animais para os experimentos de campo.

Inicialmente, devido à indisponibilidade de sêmen congelado de búfalo, foi iniciado um "plano piloto" no campus da FCAP, que envolvia a colheita e criopreservação de sêmen de touros búfalos selecionados regionalmente. O experimento foi conduzido incansavelmente até que a criopreservação bem-sucedida do sêmen fosse alcançada, permitindo seu uso em campo. Utilizando um touro Murrah na Fazenda Itaquí, localizada a 60 km de Belém, e um diluente à base de TRIS (hidroximetil) metilaminometano e TES (hidroximetil) etilaminoetano (Tabelas 2 e 3), fornecido pelo Instituto de Andrologia e Inseminação Artificial da Escola de Medicina Veterinária de Hannover, o diluidor foi composto ainda por gema de ovo, ácido cítrico, frutose e 7% de glicerol.

As coletas de sêmen foram realizadas no início da manhã, duas vezes por semana, sendo o primeiro e o segundo ejaculado utilizados. O sêmen foi diluído com TES e carregado em Minitubs alemães de 0,3 mL, sendo congelado pelo método rápido e mantido em um recipiente a  $-196^{\circ}\text{C}$ . Um total de 500 doses de sêmen foram congeladas, com uma concentração de  $20 \times 10^6$  espermatozoides por dose, alcançando uma motilidade pós-descongelamento superior a 50% e um vigor espermático individual maior que 3. Em seguida, um teste de campo foi realizado utilizando 10 vacas búfalas multíparas, com idades entre 5 e 9 anos, livres de brucelose e tuberculose, criadas em uma fazenda localizada em áreas de várzea da ilha de Marajó. Dentre as 10 fêmeas, 7 ficaram prenhes, conforme diagnóstico de gestação aos 60 dias. No entanto, apenas quatro bezerros nasceram (Vale et al., 1984).

Tabela 2. Composição do diluidor TRIS (hidroxi-metil-amino-metano), conforme Vale et al. (1991).

Solução estoque A (1000mL)	Solução estoque B - final
TRIS (hidroxi-metil-amino-metano) 38,1g	Solução estoque A (1000 mL) 73,0 mL
Ácido cítrico 19,7 g	Glicerol 7,0 mL
D (-) Frutose 15,5 g	Gema de ovo 20,0 mL
Diidroestreptomicina-sulfato $1 \times 10^5$ UI	
Penicilina-G-Potássio 1,5 g	
Água bidestilada q.s.p. 1000 mL	

Tabela 3. Composição do diluidor TES (hidroxi-metil-amino-etano), segundo Vale et al. (1991).

Solução estoque A (1000mL)	Solução B - FINAL
TES (hidroxi-metil-amino-etano) 48,3 g	Solução estoque A (1000 mL) 73,0 mL
TRIS (hidroxi-metil-amino-metano) 11,6 g	Glicerol 7,0 mL
D (-) Frutose 2,0 g	Gema de ovo 20,0 mL
Diidroestreptomicina-sulfato $1 \times 10^5$ UI	
Penicilina-G-Potássio 1,5 g	
Água bidestilada q.s.p. 1000 mL	

### Inseminação Artificial (IA)

Até o presente momento, nenhuma biotecnologia reprodutiva teve um impacto tão significativo no progresso genético e na transformação tecnológica dos rebanhos quanto a Inseminação Artificial (IA). O avanço genético e os níveis de produção alcançados na indústria de laticínios por meio da IA parecem não ter limites, mas essa tecnologia ainda não foi amplamente adotada pela indústria de búfalos de água em todo o mundo. Embora a biologia reprodutiva dos búfalos seja provavelmente semelhante à do gado bovino,



existem características únicas e diferenças significativas na aplicação dessa biotecnologia para melhorar efetivamente a produtividade dos búfalos (Neglia et al., 2020).

Na pecuária, o acompanhamento das atividades no Projeto Jari, um megaprojeto agroindustrial desenvolvido pelo bilionário americano Daniel Keith Ludwig em meados da década de 60 na região amazônica, ilustra um exemplo significativo. O projeto foi desenvolvido em uma área de 1,6 milhões de hectares no estado do Amapá, às margens do Rio Jari, e tinha uma área comparável ao estado de Sergipe ou ao país da Bélgica. O Projeto Jari foi implantado em uma área composta por várzeas e floresta densa. Dentro das múltiplas atividades agroflorestais do projeto, havia um rebanho de 12.000 búfalos criados nas áreas de várzea da margem do rio Jari, que possuíam uma rica biomassa composta por gramíneas e leguminosas nativas durante todo o ano. Com o aumento da mão de obra para sustentar as diferentes atividades do projeto, o consumo de carne bovina e leite também aumentou. Assim, a administração central do Projeto Jari decidiu utilizar os búfalos para a produção de alimentos. Foi assinado um acordo técnico entre a Jari, a FCAP e a Universidade Federal do Pará (UFPA), visando o melhoramento genético do rebanho local para a produção de leite.

Em 1986, utilizando sêmen coletado de um reprodutor Murrah POI com boa história genética, processado em um laboratório regional instalado no campus da FCAP, nosso grupo de pesquisa iniciou o programa de inseminação artificial (IA), selecionando búfalas fêmeas de alta produtividade leiteira. Essas búfalas foram escolhidas entre as melhores da região, provenientes de fazendas localizadas ao longo do rio Jari, pertencentes ao MEGAPROJETO AGROFLRESTAL JARI, chamadas localmente de “retiros”, nas margens e áreas de várzea do rio Jari, no estado do Pará. O leite produzido já era enviado para os restaurantes dentro da área do projeto. Além da produção diária de leite, as búfalas foram submetidas a exames clínicos gerais, com ênfase no trato genital, seguidos por testes de brucelose e tuberculose. Após a verificação da saúde normal, os animais foram transportados para uma fazenda equipada com todas as condições necessárias para o manejo adequado do rebanho. Devido à presença de uma fábrica de beneficiamento de arroz no projeto, foi possível utilizar farelo de arroz na ração dos búfalos durante a fase inicial do trabalho. A pastagem cultivada com diferentes tipos de *Brachiaria sp.*, incluindo *Brachiaria humidicola*, e a pastagem nativa rica em várzea foram complementadas com capim-elefante picado (*Pennisetum purpureum*) e uma mistura mineral comercial oferecida ad libitum em múltiplas doses. Esses recursos melhoraram a qualidade da alimentação fornecida ao rebanho.

Um grupo de búfalas fêmeas foi selecionado com base no fenótipo, registro de produção de leite e a condição de saúde, livre de brucelose e tuberculose. O escore corporal (BSC) das fêmeas foi avaliado em uma escala de 1 a 5, sendo 1 magro e 5 tendendo à obesidade. As fêmeas selecionadas foram submetidas a manejo melhorado, com uma rotina de trabalho programada e um sistema de alimentação aprimorado, incluindo suplementação mineral. Os resultados da inseminação artificial entre 1986 e 1985 estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Resultados da inseminação artificial de 1986 a 1985.

Ano	No de Búfalas inseminadas	No de inseminação realizadas				Doses por concepção	Taxa de concepção (%)	
		1	2	3	Total		n.	%
1986-87	42	42	27	10	79	1.88	25	59.0
1987-88	64	64	47	37	148	2.31	29	43.3
1988-89	70	70	21	6	97	1.38	47	67.1
1990-91	95	95	44	15	154	2.44	64	67.3
1991-92	105	105	58	21	184	1.44	73	69.3
1992-93	98	98	24	11	133	1.92	69	70.4
1993-94	94	94	35	07	136	1.97	69	73.4
1994-95	156	156	78	24	258	2.03	127	81.4
Total	724	724	334	131	1189	1.92	503	64.4

### Produção *in vivo/vitro* de embriões em búfalos Produção de embriões *in vivo* em búfalos Visão geral da MOET em búfalos

A Ovulação Múltipla e Transferência de Embriões (MOET) é uma biotecnologia reprodutiva significativa utilizada para aumentar a produção de embriões *in vivo*, especialmente na reprodução animal. Nos Estados Unidos, onde não há tradição na criação de búfalos domésticos, o primeiro bezerro bubalino nascido por transferência de embrião clássica (TE) ocorreu em 1983. O bezerro, nomeado Herman, foi produzido na Escola de Veterinária da Universidade da Flórida, por meio de uma transferência não cirúrgica de um blastocisto de 7 dias de idade para uma receptora bubalina, realizada pela equipe do Professor Maarten Drost (Drost; Elsdén, 1985). No Brasil, o primeiro búfalo nascido por TE foi produzido pelo Professor Baruselli na Faculdade de Medicina Veterinária da USP, em 1994 (Baruselli et al., 1994).

Essa técnica otimiza a contribuição genética das fêmeas, resultando em um ganho genético impressionante de 63-70% ao ano em búfalas, quando comparada aos métodos tradicionais de teste de progênie (Gandhi, 1994). Embora a MOET tenha demonstrado potencial em búfalas, ela enfrenta vários desafios reprodutivos, como puberdade tardia, idade avançada ao primeiro parto, anestro pós-parto prolongado e taxas desfavoráveis de detecção de cio e concepção (Misra; Tyagi, 2007).

Notavelmente, a taxa média de recuperação de embriões em búfalas é de 2,5 a 3,0 embriões viáveis por lavagem, com a taxa de prenhez por transferência de embriões variando de 30% a 40%. Embora parte da literatura indique respostas satisfatórias aos tratamentos superovulatórios (Baruselli, 1997), os resultados inconsistentes destacam as dificuldades atuais enfrentadas na aplicação da MOET nesta espécie. O processo de produção de embriões *in vivo* envolve uma sequência de etapas, como ilustrado na Figura 2.

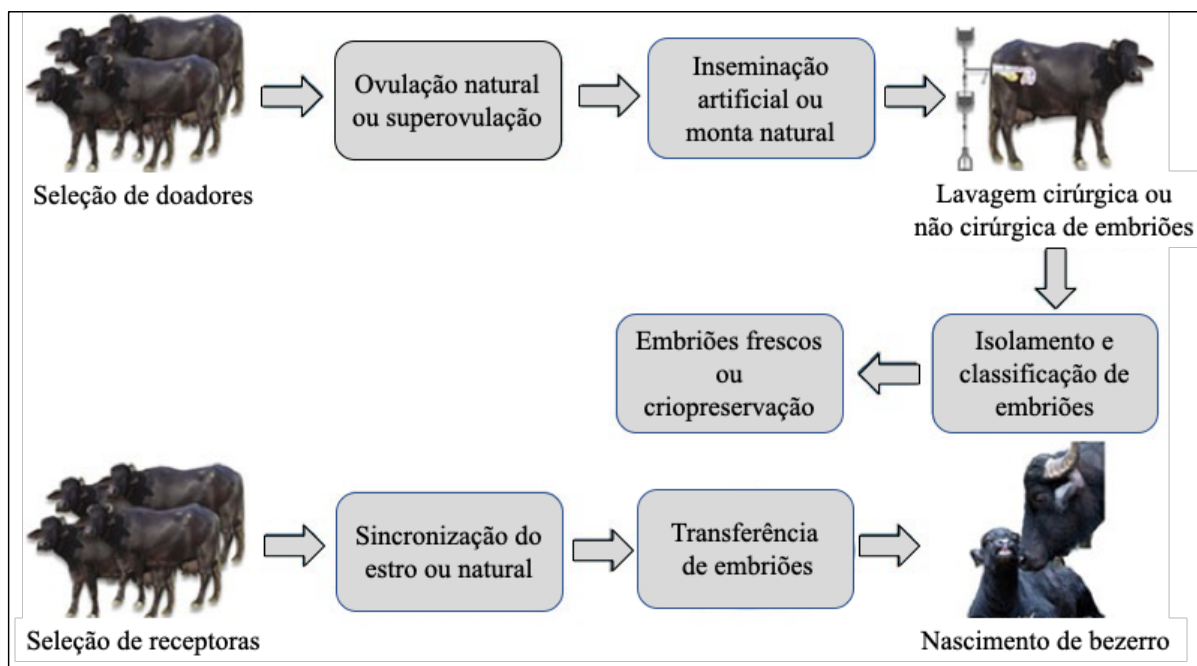


Figura 2. Representação esquemática da produção de embriões *in vivo* em búfalos

#### Seleção de animais e protocolos de superovulação e Inseminação Artificial

As búfalas doadoras devem ser saudáveis, geneticamente superiores e estar entre a segunda e a sexta lactação, apresentando mais de 10 folículos antrais por ovário, a fim de aumentar a eficiência na produção de embriões (Ohashi et al., 2017). Já os animais receptores podem ter um mérito genético inferior, mas devem apresentar ciclicidade normal e boas características maternas.

Os protocolos de superovulação são realizados durante o meio do ciclo estral (dias 9 a 14), e envolvem doses decrescentes de FSH ao longo de quatro dias, seguidas de prostaglandina F2 $\alpha$  e doses adicionais de FSH (Seidel e Seidel, 1991; Figura 3). Além disso, um alto mérito genético é essencial para os touros reprodutores ou o sêmen utilizado na inseminação artificial.



		Implante P4									
		BE (2mg)	Manhã	FSH	FSH	FSH + PGF2 $\alpha$	FSH	--	IA		
Dia	0			4	5	6	7	8	9		
			Tarde	FSH	FSH	FSH + PGF2 $\alpha$	FSH	LH (25mg)	IA	Coleta de embriões	

Figura 3. Diferentes etapas para a sincronização do estro e os procedimentos de superovulação em búfalas

### Colheita, classificação e transferência de embriões

Os embriões de búfalas são coletados no 5<sup>o</sup> ou 6<sup>o</sup> dia pós-ovulação por método não cirúrgico (Drost, 1991). Após a colheita, os embriões são classificados com base na qualidade, sendo os Graus 1 e 2 considerados adequados para transferência ou criopreservação, dependendo da disponibilidade da receptora. A classificação dos embriões segue uma escala de 1 a 4, com base na integridade morfológica (Bó; Mapletoft, 2013).

- Grau 1: Embriões de excelente qualidade, com forma simétrica, densidade uniforme de blastômeros e altas taxas de sobrevivência pós-congelamento.
- Grau 2: Embriões viáveis, porém com irregularidades moderadas, considerados "transferíveis, mas não congeláveis".
- Grau 3 e 4: Embriões com qualidades morfológicas deficientes, geralmente descartados devido à baixa viabilidade.

### Produção de embriões *in vitro* em búfalos

Em búfalos, a baixa eficiência da Ovulação Múltipla e Transferência de Embriões (MOET) torna a combinação da coleta de oócitos (OPU) e da produção *in vitro* de embriões (PIVE) uma alternativa mais viável para o melhoramento genético e aumento da produtividade (Kumar et al., 2020). A PIVE inclui uma série de etapas: coleta de oócitos de ovários de matadouro ou via OPU de doadoras vivas; seleção e maturação de oócitos competentes; capacitação espermática e fertilização *in vitro* (FIV); e cultivo *in vitro* (CIV) ou criopreservação (Figura 4).

### Ovum Pick-Up (OPU)

Oócitos colhidos de ovários de matadouro são mais abundantes e econômicos, mas fêmeas vivas geneticamente superiores são preferidas para melhoramento genético comercial. Os dois principais desafios biológicos dessa técnica são: menos folículos ovarianos acessíveis e a fragilidade dos oócitos de búfala, que possuem uma zona pelúcida mais delicada (Mondadori et al. 2010; Gasparrini 2002; Kumar et al., 2023). A OPU transvaginal (OPUTV; Figura 5) em fêmeas adultas e a OPU laparoscópica (OPULO) em bezerras pré-púberes são comuns na indústria de PIVE em búfalos (Baldassarre et al., 2017). Os folículos aspirados e as taxas de recuperação de oócitos por OPUTV em diferentes estudos são apresentados na Tabela 5.

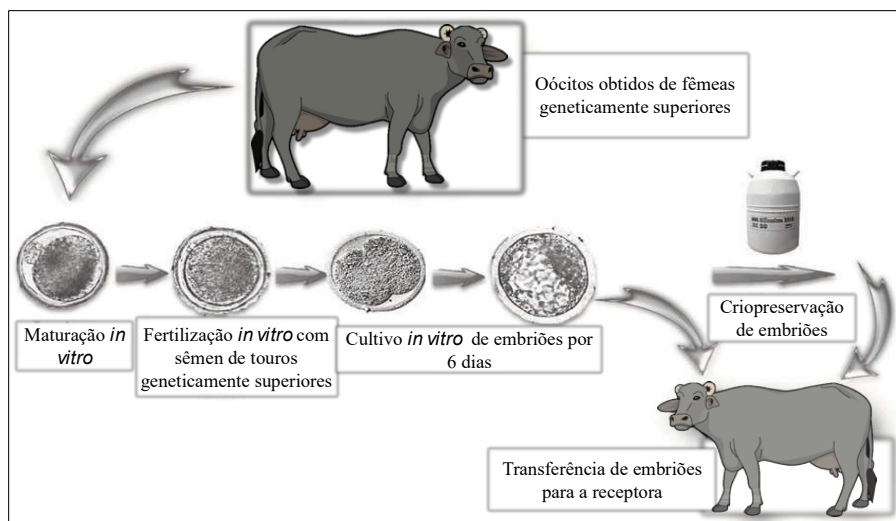


Figura 4. Apresentação esquemática da produção de embriões *in vitro* em búfalos, (adaptado de Kumar et al. 2020).



Figura 5. Método TVOPU: equipamentos necessários para TVOPU (1), A-Equipamento de ultrassom; B-Sonda vaginal; C-Suportes de sonda; D-Bomba de sucção; E-Sistema de tubo OPU; F-Agulha OPU. Aspiração de foliculos (2). Imagem ultrassonográfica do ovário superestimulado (3).

### Maturação *in vitro* (MIV)

A maturação *in vitro* (MIV) envolve a retomada da meiose, alterações na morfologia nuclear, crescimento do espaço perivitelino e expansão das células do *cumulus*, processo que leva de 18 a 24 horas (Gasparrini et al., 2008; Mondadori et al., 2010). A taxa de sucesso da MIV em búfalos é de cerca de 80% (Santos et al., 2002; Hammam et al., 2010). No entanto, em búfalas, bezerras com idade entre 2 e 6 meses apresentam uma taxa de maturação e clivagem de 40–50% (Baldassarre et al., 2017). Fatores como o meio de cultivo, suplementos proteicos e hormônios influenciam tanto a maturação quanto o desenvolvimento embrionário (Mahmoud; El-Naby, 2013).

### Fertilização *in vitro* (FIV)

As técnicas de FIV em búfalos podem utilizar sêmen previamente congelado, o que facilita a padronização e viabilidade comercial do processo. Os complexos *cumulus* oócito (CCOs) maturados *in vitro* são então incubados por 18 horas com uma concentração de  $2 \times 10^6$  espermatozoides/mL. Entretanto, as taxas médias de clivagem em búfalos (aproximadamente 45–50%) são inferiores às observadas em bovinos (cerca de 70%; Suresh et al., 2009; Sales et al., 2015). Essa diferença pode decorrer de variações na qualidade do sêmen congelado de diferentes touros (Aoyagi et al., 1988; Shi et al., 1990), embora alguns pesquisadores não tenham identificado diferenças significativas entre indivíduos (Marin et al., 2019a). As taxas de clivagem após FIV reportadas em diferentes estudos estão sumarizadas na Tabela 5.



### Cultivo *in vitro* (CIV)

O cultivo *in vitro* (CIV) de embriões de búfala tem sido amplamente investigado, com uma taxa média de blastocistos de 22%, inferior aos cerca de 40% observados em bovinos (Baruselli et al., 2018). Vários meios de cultivo foram testados, incluindo o oviduto ovino, sistemas de co-cultivo com células somáticas e fluido ovidutal sintético enriquecido com soro fetal bovino (Dantas, 2002; Kumar et al., 2024). As taxas de blastocistos em estudos de produção de embriões *in vitro* (PIVE) são apresentadas na Tabela 5. Um desafio importante permanece na falta de um entendimento completo sobre as necessidades metabólicas e bioquímicas dos embriões de búfala, o que dificulta o desenvolvimento de meios de cultivo otimizados (Galli et al., 2001). Embriões de búfala apresentam desenvolvimento acelerado, exigindo concentrações específicas de glicose de aproximadamente 1,5 mM no 4º dia de cultivo para garantir o crescimento adequado. Além disso, altas concentrações (até 5,6 mM) são benéficas durante a MIV e a vitrificação de células, enquanto níveis reduzidos de glicose em estágios posteriores não afetam negativamente o seu desenvolvimento (Gasparrini, 2013).

Tabela 5. Taxas de recuperação de oócitos por aspiração transvaginal de oócitos (OVUM PICK-UP) e as taxas subsequentes de clivagem/blastocistos obtidas pela produção *in vitro* de embriões em búfalas.

Folículos aspirados*	Oócitos recuperados*	Porcentagem	Frequência de aspiração	Taxas de clivagem (%)	Taxas de BL (%)	BL*	Referências
6,8 ± 0,3	4,1 ± 0,5	57,7	Duas vezes por semana (Controle)	41,7	26,0	1,2 ± 0,2	Sá Filho et al. (2009)
9,1 ± 0,6	5,2 ± 0,5	54,5	Duas vezes por semana (BST)	46,2	19,7	1,3 ± 0,6	
4,8 ± 0,3	2,3 ± 0,1	53,6	Meio do inverno (duas vezes por semana)	52,7	8,6	----	Di Francesco et al. (2012)
4,7 ± 0,2	2,2 ± 0,1	49,3	Primavera-verão (Duas vezes por semana)	59,8	6,4	----	
4,2 ± 0,2	2,2 ± 0,2	57,4	Outono (duas vezes por semana)	65,6	23,2	----	
5,3 ± 0,2	2,7 ± 0,2	50,0	—	53,5	11,5	0,3 ± 0,1	Gasparrini et al. (2014)
14,8 ± 0,8	9,9 ± 0,6	73,6 <sup>b</sup>	Intervalos de 14 dias	32,7	19,5	1,7 ± 0,4	Ferraz et al. (2015)
11,3 ± 0,5	7,6 ± 0,4	69,3 <sup>b</sup>	Intervalos de 7 dias	33,4	18,6	1,3 ± 0,2	
17,3 ± 1,0	10,1 ± 0,7	58,5 <sup>b</sup>	Intervalos de 14 dias + BST	26,0	13,4	0,8 ± 0,2	
14,3 ± 0,6	9,3 ± 0,4	67,4 <sup>b</sup>	Intervalos de 7 dias + BST	35,1	9,6	0,7 ± 0,1	Konrad et al. (2017)
273 (Total)	<b>4,5 ± 0,5<sup>b</sup></b>	51,0 <sup>b</sup>	Intervalos de 14 dias	64,0 <sup>b</sup>	28,0 <sup>a</sup>	----	
266	<b>2,8 ± 0,5<sup>b</sup></b>	31,5 <sup>b</sup>	Intervalos de 7 dias	44,0 <sup>b</sup>	6,0 <sup>b</sup>	----	
13,5 ± 5,6	10,2 ± 6,5	0	Intervalos de 7 dias	----	21,8** 23,0** 17,0		Marin et al. (2019)

\* Sessão por búfala

BST-Somatotropina bovina

\*\* Sêmen utilizado de diferentes touros

BL, blastocisto



### Considerações finais

A aplicação das ARTs em búfalos (*Bubalus bubalis*) no Brasil tem apresentado avanços significativos nas últimas quatro décadas. A integração dessas tecnologias não apenas facilitou o ganho genético, mas também contribuiu para o melhoramento das populações de búfalos, elevando sua produtividade e adaptabilidade em diferentes ambientes e fundamentalmente vem contribuindo para o combate a consanguinidade (**inbreeding**) na espécie. A evolução das ARTs ao longo da história reflete a transformação da estrutura agrícola do país, evidenciando o papel crucial da pesquisa e da inovação na otimização de estratégias de melhoramento genético. À medida que o Brasil avança nesse campo, é necessário que os esforços futuros se concentrem no aprimoramento dessas tecnologias, enfrentando desafios como a diversidade genética e assegurando práticas sustentáveis que beneficiem tanto os produtores quanto os criadores. A colaboração contínua entre pesquisadores, profissionais do setor e formuladores de políticas será fundamental para maximizar o potencial das ARTs e moldar o futuro da criação de búfalos no Brasil.

### Referências

- Aoyagi Y, Fujii K, Iwazumi Y, Furudate M, Fukui Y, Ono H.** Effects of two treatments on semen from different bulls on in vitro fertilization results of bovine oocytes. *Theriogenology*. 1988;30(5):973-85.
- Baldassarre H, Martin L, Luke C, Mariana PM, Karina G, Vilceu B, Werner G, Vitor B.** Efficient shortening of generation interval by applying laparoscopic ovum pickup and in vitro embryo production technologies in Mediterranean Buffalo of 2-6 months of age. In: *Proc IX Symp Int Buffalo Fed*; 2017; Campeche, Mexico.
- Baruselli BP.** Manejo reprodutivo em bubalinos. Nova Odessa, SP: Instituto de Zootecnia, 1993; 46.
- Baruselli PS, Abreu LÂ, Paula VR, Albertini S, Santos GFF, Rebeis LM, et al.** Breeding for sustainability: how reproductive biotechnologies can help buffalo farmers combat climate change. Maracaibo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo; 2023.
- Baruselli PS, de Carvalho NAT, Gasparrini B, Campanile G, D'Occhio MJ.** Review: Development, adoption, and impact of assisted reproduction in domestic buffaloes. *Animal*. 2023;17:100764.
- Baruselli PS, Mucciolo RG, Visintin JA, Viana WG, Arruda RP, Madureira EH, Molero-Filho JR.** Transferência de embriões em bubalinos (*Bubalus bubalis*). *Dados preliminares. Zootecnia*. 1994;32:22.
- Baruselli PS, Soares JG, Bayeux BM, Silva JCB, Mingoti RD, Carvalho NAT.** Assisted reproductive technologies (ART) in water buffaloes. *Anim Reprod*. 2018;15:971-983.
- Baruselli PS, Soares JG, Bayeux BM, Silva JCB, Mingoti RD, Carvalho NAT.** *Anim Reprod*. 2018;15:971-983.
- Bertoni A, Álvarez-Macías A, Mota-Rojas D, Dávalos JL, Minervino AHH.** Dual-purpose water buffalo production systems in tropical Latin America: bases for a sustainable model. *Animals*. 2021;11(10):2910.
- Bhalaru SS, Tiwana MS, Singh N.** Effect of body condition at calving on subsequent reproductive performance in buffaloes. *Indian J Anim Sci*. 1987;57:33-36.
- Bó GA, Mapletoft RJ.** Evaluation and classification of bovine embryos. *Anim Reprod*. 2013;10:344-348.
- Camarão AP, Rodrigues Filho JA.** Botanical composition of the available forage and the diet of water buffalo grazing native pastures of the medium Amazon region, Brazil. *Buffalo J*. 2001;17(3):307-316.
- Couto GB.** Reutilização de dispositivo intravaginal de progesterona na inseminação artificial em tempo fixo em búfalas criadas na região nordeste do estado do Pará [Dissertation]. Belém, Brazil: Universidade Federal do Pará; 2007.
- da Silva JAR, Garcia AR, de Almeida AM, Bezerra AS, de Brito Lourenço Junior J.** Water buffalo production in the Brazilian Amazon Basin: a review. *Trop Anim Health Prod*. 2021;53(3):343.
- Dantas JK.** Desenvolvimento de embriões bubalinos (*Bubalus bubalis*) cultivados in vitro em diferentes meios [Thesis]. Belém, Brazil: Universidade Federal do Pará; 2002.
- Di Francesco S, Novoa MVS, Vecchio D, et al.** Ovum pick-up and in vitro embryo production (OPU-IVEP) in Mediterranean Italian buffalo performed in different seasons. *Theriogenology*. 2012;77:148-154.
- Drost M, Elsdén R.** Blastocyst development in water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*. 1985;23:191.
- Drost M.** Training manual for embryo transfer in water buffaloes. *FAO Anim Prod Health Pap*. 1991;84:13. *FAO. World Food and Agriculture – Statistical Yearbook 2022*. Rome: FAO; 2022.



- Ferraz ML, Sá Filho MF, Batista EOS, Santos JEP, Baruselli PS.** Paradoxical effects of bovine somatotropin treatment on the ovarian follicular population and *in vitro* embryo production of lactating buffalo donors submitted to ovum pick-up. *Anim Reprod Sci.* 2015;154:1-7.
- Galli C, Crotti G, Notari C, Turini P, Duchi R, Lazzari G.** Embryo production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology.* 2001;55:1341-1357.
- Gandhi RS.** Enhanced rates of genetic improvement in Murrah buffaloes through MOET. *Buffalo J.* 1994;3:279-287.
- Gasparrini B, De Rosa A, Attanasio L, Boccia L, Di Palo R, Campanile G, Zicarelli L.** Influence of the duration of *in vitro* maturation and gamete co-incubation on the efficiency of *in vitro* embryo development in Italian Mediterranean buffalo (*Bubalus bubalis*). *Anim Reprod Sci.* 2008;105:354-364.
- Gasparrini B, Elkhawagah AR, Longobardi V, Albrizio M, Marzano G, Abdoon ASS.** Effect of methyl- $\beta$ -cyclodextrin (MBCD) on *in vitro* capacitation of buffalo frozen/thawed sperm. *J Buff Sci.* 2014;3:12-17.
- Gasparrini B.** *In vitro* embryo production in buffalo species: state of the art. *Theriogenology.* 2002;57:237-256.
- Gasparrini B.** *In vitro* embryo production in buffalo: yesterday, today and tomorrow. *Buffalo Bull.* 2013;32:188-195.
- Hammam AM, Whisnant CS, Elias A, Abdel-Raouf M, El-Naby A.** Effect of media, sera and hormones on *in vitro* maturation and fertilization of water buffaloes (*Bubalus bubalis*). *J Anim Vet Adv.* 2010;9:27-31.
- Harun-Or-Rashid M, Sarkar AK, Hasan MMI, Hasan M, Juyena NS.** Productive, reproductive, and estrus characteristics of different breeds of buffalo cows in Bangladesh. *J Adv Vet Anim Res.* 2019;6(4):553-560.
- Ivanov P, Zachariev SJ.** Biologische Eigenschaften und Wirtschaftlichkeit der Büffel in Bulgarien. *Z Tierz Züchtungsbiol.* 1960;74:340-360.
- Jainudeen MR.** Reproduction in water buffalo. In: Morrow DA, editor. *Current therapy in theriogenology: diagnosis, treatment and prevention of reproduction diseases in animals.* Philadelphia: Saunders; 1986. p.443-449.
- Kamonpatana M, Schams D, Van Der Wiel DFM.** Problems of reproduction in female swamp buffalo. In: Buffalo reproduction and AI. Proceedings of the Seminar sponsored by FAO/SIDA/Govt of India; 1978; Karnal, India. Rome: FAO; 1979. p.226-234.
- Kanai Y, Shimizu H.** Characteristics of the estrous cycles in the swamp buffalo under temperate conditions. *Theriogenology.* 1983;19:593-601.
- Konrad J, Clérico G, Garrido MJ, Mattioli GA, Sansinanea A, Salamone D.** Ovum pick-up interval in buffalo (*Bubalus bubalis*) managed under wetland conditions in Argentina: effect on follicular population, oocyte recovery, and *in vitro* embryo development. *Anim Reprod Sci.* 2017;183:39-45.
- Kumar S, Chaves MS, da Silva AFB, Vale WG, Filho STR, Ferreira-Silva JC, Melo LM, de Figueiredo Freitas VJ.** Factors affecting the *in vitro* embryo production in buffalo (*Bubalus bubalis*): a review. *Vet Med (Praha).* 2023;68(2):45-56.
- Kumar S, Chaves MS, Ferreira ACA, Bezerra da Silva AF, Pereira LMC, Vale WG, Filho STR, Watanabe YF, Melo LM, Figueirêdo Freitas VJ.** Oocyte competence and gene expression in parthenogenetic produced embryos from repeat breeder and normally fertile buffaloes (*Bubalus bubalis*) raised in sub-humid tropical climate. *Anim Reprod Sci.* 2024;262:107426.
- Kumar S, Ohashi O, Vale WG, Filho STR, Melo LM, Figueirêdo Freitas VJ.** State-of-the-art and emerging technologies for *in vitro* embryo production in buffaloes. *J Adv Vet Res.* 2020;10(3):186-192.
- Mahmoud KGM, El-Naby AHH.** Factors affecting buffalo oocyte maturation. *Glob Vet.* 2013;11:497-510.
- Manik RS, Palta P, Singla SK, Sharma V.** Folliculogenesis in buffalo (*Bubalus bubalis*): a review. *Reprod Fertil Dev.* 2002;14(5-6):315-25.
- Marin DFD, Souza EB, Brito VC, Basso AC, Seneda MM.** *In vitro* embryo production in buffaloes: from the laboratory to the farm. *Anim Reprod.* 2019;16:260-266.
- Misra AK, Tyagi S.** *In vivo* embryo production in buffalo: present and perspectives. *Ital J Anim Sci.* 2007;6:74-91.
- Mondadori RG, Santin TR, Fidelis AAG, Vaninni AF, Lopes RNVR, Silva-Santos KC, Silveira JC, Oliveira JF, Seneda MM.** Buffalo (*Bubalus bubalis*) pre-antral follicle population and ultrastructural characterization of antral follicle oocyte. *Reprod Domest Anim.* 2010;45:33-37.
- Napolitano F, De Rosa G, Chay-Canul A, Álvarez-Macías A, Pereira AMF, Bragaglio A, Mora-Medina P, Rodríguez-González D, García-Herrera R, Hernández-Avalos I, Domínguez-Oliva A, Pacelli C, Sabia E, Casas-Alvarado A, Reyes-Sotelo B, Braghieri A.** The challenge of global warming



- in water buffalo farming: physiological and behavioral aspects and strategies to face heat stress. *Animals*. 2023;13(19):3103.
- Neglia G, de Nicola D, Esposito L, Salzano A, D'Occhio MJ, Fatone G.** Reproductive management in buffalo by artificial insemination. *Theriogenology*. 2020;150:166-172.
- Ohashi OM, Kumar S, Rolim Filho ST, Ribeiro HFL, Freitas VJF, Vale WG.** Advances in embryo production in buffaloes: *In vivo* versus *in vitro* procedures. In: Chauhan MS, Selokar N, editors. *Biotechnological Applications in Buffalo Research*. Singapore: Springer; 2022. p. 247-266.
- Ohashi OM, Nogueira N, Cordeiro S, Mota Filho AC, Vale WG.** Produção *in vitro* de embrião (PIVE) na espécie bubalina. *Rev Bras Reprod Anim*. 2017;14(1):195-200.
- Ohashi OM, Souza JS, Vale WG.** The use of assisted reproduction technology (ART) in buffalo and zebu. In: *Proceedings of the 4th Follow-up Seminar on Animal Reproduction and Biotechnology for Latin America*; 1998; Belém, Brazil. Belém: EMBRAPA; 1998. p.71-79.
- Pradyumna Rao VD, Bhaim Reddy D, Gopalakrishna T.** Note on estrous cycle and time of ovulation in Murrah buffaloes. *Indian J Anim Sci*. 1982;52:534-535.
- Rao NM, Kodagali SB.** Onset of oestrus, oestrus signs and optimum time of artificial insemination in Surti buffaloes. *Indian J Anim Sci*. 1983;53:553-555.
- Ribeiro HFL, Souza JS, Marques JRF, Lourenço Júnior JB, Conceição JCS.** Inseminação artificial em tempo fixo de búfalas com sincronização da ovulação através do Ovsynch e progesterona. *Rev Bras Reprod Anim*. 2003;27:469-470.
- Sá Filho MF, Carvalho NAT, Gimenes LU, et al.** Effect of recombinant bovine somatotropin (bST) on follicular population and on *in vitro* buffalo embryo production. *Anim Reprod Sci*. 2009;113:51-59.
- Sales JNS, Iguma LT, Batista RITP, et al.** Effects of a high-energy diet on oocyte quality and *in vitro* embryo production in *Bos indicus* and *Bos taurus* cows. *J Dairy Sci*. 2015;98:3086-3099.
- Santos SSD, Costa SHF, Dantas JK, et al.** Maturação *in vitro* de oócitos bubalinos. *Rev Bras Reprod Anim*. 2002;26:37-42.
- Sarwar M, Khan MA, Nisa M, Bhatti SA, Shahzad MA.** Nutritional management for buffalo production. *Asian-Australasian J Anim Sci*. 2009;22(7):1060-1068.
- Seidel GE, Seidel SM.** Training manual for embryo transfer in cattle. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome; 1991.
- Seren E, Parmeggiani A.** Oestrous cycle in buffalo. *Bubalus bubalis* Suppl. 1997;4:21-28.
- Shi DS, Lu KH, Gordon I.** Effects of bulls on fertilization of bovine oocytes and their subsequent development *in vitro*. *Theriogenology*. 1990;33:324.
- Suresh KP, Nandi S, Mondal S.** Factors affecting laboratory production of buffalo embryos: a meta-analysis. *Theriogenology*. 2009;72:978-985.
- Teixeira CRV, Lana RDP, Gomes LHDS.** Sugarcane with Elephant grass replacing sugarcane with urea in the diet of crossbred dairy cows. *Acta Sci Anim Sci*. 2020;42:e48004.
- Toelihere MR.** Beitrage zur Biologie und Pathologie der Fortpflanzung beim weiblichen Sumpfbueffel in Indonesien. [Dissertation]. Giessen: Universitaet Giessen, Veterinaermedizin Fakultae; 1977. 118 p.
- Tourinho MM.** Fatores que interferem na formação e padrão do uso das várzeas. In: I Workshop sobre as potencialidades de uso do ecossistema de várzeas da Amazônia. Anais. Manaus: EMBRAPA – Conselho Assessor Regional Norte; 1996.
- Vale WG, Minervino A, Neves K, Morini A, Coelho J.** Buffalo on the thread in Amazon Valley, Brazil. *Buffalo Bull*. 2013;32:121-131.
- Vale WG, Ohashi OM, Ribeiro HFL, Sousa JS.** Semen freezing and artificial insemination in water buffalo in the Amazon valley. *Buffalo J*. 1991;7:137-144.
- Vale WG, Ribeiro HFL, Sousa JS, Ohashi OM.** Involução uterina e atividade ovariana pós-parto em búfalas. *Rev Bras Reprod Anim*. 1986;10:187-192.
- Vale WG, Ribeiro HFL.** Características reprodutivas dos bubalinos: puberdade, ciclo estral, involução uterina e atividade ovariana no pós-parto. *Rev Bras Reprod Anim*. 2005;29(2):63-73.
- Vale WG, Weitze KF, Grunert E.** Estrous behaviour and ovarian function in water buffalo cows (*Bubalus bubalis*) under Amazon conditions. In: International Congress on Animal Reproduction and AI, 10, 1984. Proceedings. Urbana, IL: ICAR; 1984. p.154-156.
- Vale WG.** Buffalo production in the Amazon Valley. In: International Symposium on Buffalo Products. Wageningen: EAAP Publication Wageningen Press; 1996. p.99-116.
- Vale WG.** Effects of environment on buffalo reproduction. *Ital J Anim Sci*. 2007;6(Suppl 2):130-142.
- Vale WG.** Enhancing puberty in buffalo heifers. In: International Congress on Animal Reproduction, 14, 2000, Stockholm. Stockholm: ICAR; 2000. v.1, p.271.



**Vale WG.** Zyklus, Dauer und Symptome der Brunst sowie Zeitpunkt der ovulation bei Wasserbueffelkuehen (*Bubalus bubalis*) auf der Marajó-Insel. [Dissertation]. Hannover: Tierärztlichen Hochschule Hannover; 1983. 99 p.

**Wang PC, Wei LC, Wu H.** A study on the oestrus and its related phenomena of the Naning buffalo cows. Acta Vet Zootec Sin. 1965;8:151-156.

**Wang PC.** The swamp buffalo and its improvement in the People's Republic of China. In: Seminar sponsored by FAO/SIDA/Govt of India, 1978, Karnal, India. Proceedings: Buffalo reproduction and AI. Rome: FAO; 1979. p.152-154

---