

Avaliação reprodutiva de búfalas submetidas à programas de inseminação artificial em tempo fixo com sêmen fresco vs. congelado

Reproductive evaluation of buffaloes submitted to fixed-time artificial insemination programs with fresh vs. frozen

 Fabiana Hernández Costa¹

 Lauro Viana Domingos Maranha²

 Jaci de Almeida³

¹ Universidade Santa Úrsula – Botafogo (RJ)

² Universidade Federal de Lavras – Oliveira (MG)

³ Universidade de São Paulo – Piracicaba (SP)

Autor correspondente:

Jaci de Almeida
E-mail: jaciveterinariorj@gmail.com

Como citar este artigo:

COSTA, F.H.; MARANHA, L.V.D; ALMEIDA, J.; Avaliação reprodutiva de búfalas submetidas à programas de inseminação artificial em tempo fixo com sêmen fresco vs. congelado **Revista Saber Digital**, v. 16, n.2, e20231603, maio/agosto, 2023.

Data de Submissão: 10/07/23

Data de aprovação: 19/07/23

Data de publicação: 09/08/23



Esta obra está licenciada com uma licença
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

RESUMO

Introdução - As búfalas não exteriorizam os sinais clínicos do estro tão evidentemente como as fêmeas bovinas, muito embora ocorram sinais significativos. Neste contexto, a IATF permite a inseminação destas fêmeas sem a necessidade de observação de cio, promovendo menor custo com mão de obra e evitando possíveis falhas de observação dos sinais do estro. **Objetivo** - Comparar a taxa de prenhez obtida com IATF em búfalas de raça Murrah e Mediterrâneo utilizando o sêmen fresco vs. o congelado de um reprodutor da raça Murrah. **Material e métodos** - O experimento foi realizado entre os meses de maio e julho do ano de 2022. Ao todo, foram utilizadas 138 búfalas pluríparas, com bezerras. As búfalas foram induzidas em cio, utilizando dispositivo intravaginal com progestágenos. Sincronização: Na manhã D0, os animais receberam 2,0 mg i.m de benzoato de estradiol (BE, Estrogin[®]) e implante intravaginal (PRIMER[®] 0,5 g de P4), no D9 (8:00h) retirada do implante e aplicação de 400UI i.m eCG (Novormon[®] 5000UI) + 0,530 mg de PGF_{2α} Cloprostenol i.m (Estron[®]). No D11 (16:00h) aplicados 25 µg i.m de GnRH (Sincroforte[®], Acetato de Buserelina), na manhã D12 (8:00h) IA. Os resultados foram submetidos ao teste do qui-quadrado. **Resultados** - As taxas de prenhez totais obtidas foram de 55,1^a% (38/69) e 46,4^b% (32/69) para o sêmen fresco e congelado, respectivamente. **Conclusão** - O uso do sêmen fresco na IATF é uma alternativa para melhorar as taxas de prenhez nos protocolos de IATF.

Palavras-chave: *Bubalus bubalis*, sincronização do cio, taxa de gestação.

ABSTRACT

Introduction - Buffaloes do not express the clinical signs of estrus as clearly as bovine females, although significant signs do occur. In this context, TAI allows the insemination of these females without the need to observe estrus, promoting lower labor costs and avoiding possible errors in observing the signs of estrus. **Objective** - To compare the pregnancy rate obtained with TAI in Murrah and Mediterranean buffaloes using fresh semen vs. the frozen one of a sire of the Murrah breed. **Material and methods** - The experiment was carried out between the months of May and July of the year 2022. In all, 138 pluriparous buffaloes were used, with calves. The buffaloes were induced in heat using an intravaginal device with progestogens. Synchronization: In the morning D0, the animals received 2.0 mg i.m of estradiol benzoate (EB, Estrogin[®]) and intravaginal implant (PRIMER[®] 0.5 g of P4), on

D9 (8:00 am) withdrawal of the implantation and application of 400UI i.m eCG (Novormon® 5000UI) + 0.530 mg of PGF₂α Cloprostenol i.m (Estron®). On D11 (16:00h) 25 µg i.m of GnRH (Sincroforte®, Buserelin Acetate) were applied, on D12 morning (8:00h) AI. The results were submitted to the chi-square test. **Results** - The total pregnancy rates obtained were 55.1^a% (38/69) and 46.4^b% (32/69) for fresh and frozen semen, respectively. **Conclusion** - The use of fresh semen in TAI is an alternative to improve pregnancy rates in TAI protocols.

Keywords: *Bubalus bubalis*, heat synchronization, pregnancy rate.

INTRODUÇÃO

A utilização da IATF na espécie bubalina tem crescido bastante nos últimos anos, inicialmente como uma solução para tentar solucionar a dificuldade de detecção de cio nessa espécie, e a determinação do melhor momento para a realização da inseminação.

As pesquisas indicam divergências quanto à duração do estro em búfalas, podendo variar de 16 e 33 dias, com maior concentração entre 21 e 24 dias (VALE e RIBEIRO, 2005). No entanto, em revisão feita por Almeida (2018), foi observado que esta variação pode ser de 15 a 66 dias dependendo do país, da estação do ano e da raça onde foi realizado o estudo. Esta variabilidade pode ainda segundo Baruselli (1992) estar relacionado a diferentes condições climáticas e de manejo.

Segundo dados da FAO (2020) o rebanho bubalino está constituído por cerca de 207 milhões de cabeças, distribuídas ao redor do mundo e responsáveis pelo fornecimento de 10 a 15% da produção mundial de leite. Matos *et al.* (2020) relataram que a maioria dos búfalos encontram-se no continente asiático, onde a Índia possui o maior rebanho, com aproximadamente 113.330.000 animais. Logo a seguir estão o Paquistão com 37.700.000 e a China com 23.469.000 (FAO, 2017). O Brasil alcançou mais de 1.300.000 cabeças em 2017 (MATOS *et al.*, 2020), distribuídas em todo o território nacional, destacando-se entre os países da América do Sul. Por aqui a espécie é dividida em quatro raças (Jafarabadi, Mediterrâneo, Murrah, Carabao) criados em 16.000

propriedades, envolvendo cerca de 80.000 pessoas no campo (BERNARDES, 2016).

Apesar da evolução constante que a atividade vem tendo no país, a espécie bubalina ainda apresenta uma série de problemas relacionados à reprodução, como a dificuldades de detecção de cio (BARUSELLI *et al.*, 2009), sazonalidade, pouca disponibilidade de sêmen comercial (ALMEIDA, 2018), falta de manejo adequado, uma vez que esta espécie é trabalhada baseada na espécie bovina, tanto no aspecto nutricional quanto sanitário, fatores estes que atrasam o desempenho da espécie.

Contudo, alguns fatores viabilizam o crescimento atual dessa espécie, dentre eles, as vantajosas características químicas do leite e da carne, maior resistência às infecções parasitárias, incluindo carrapatos da espécie *Rhipicephalus Boophilus microplus*, maior resistência às intoxicações por plantas tóxicas (OLIVEIRA *et al.*, 2004) e a infecções no trato reprodutivo, na glândula mamária e nos cascos, em comparação às fêmeas bovinas. Outra característica marcante dessa espécie é a rusticidade e a adaptabilidade, além da eficiência reprodutiva. As búfalas produzem e reproduzem até a idade entre 15 e 20 anos, apresentando taxa de natalidade acima de 80% e taxa de mortalidade abaixo de 3% ao ano (MOREIRA *et al.*, 1994).

Em relação ao tipo de sêmen, sabe-se que os espermatozoides criopreservados têm uma meia-vida menor no trato reprodutivo feminino, que o sêmen fresco e que a quantidade ou qualidade reduzida do esperma resulta em uma diminuição exponencial da fertilidade em animais inseminados (WATSON, 2000).

Bucher *et al.* (2009) obtiveram maiores resultados de taxa de concepção comparando o sêmen fresco de bovino por 24 horas com a concentração de 3×10^6 espermatozoides totais e sêmen congelado com 20×10^6 espermatozoides/palheta, demonstrando que mesmo com a redução de 85% na dose inseminante a IA foi eficiente devido a maior qualidade dos espermatozoides. Nesse sentido, pode-se presumir que a utilização do sêmen bubalino fresco desempenhará papel semelhante ao aumento da concentração

de espermatozoides no sêmen congelado, levando ao efeito compensatório que garante maior número de células viáveis ao processo de fertilização.

Segundo Almeida *et al.* (2018; 2020; 2021) nos últimos anos estes entraves reprodutivos vêm sendo minimizados com a utilização da sincronização de cio e o uso de diversos tipos de sêmen (fresco, refrigerado e congelado), o que tem permitido alcançar maiores índices de fertilidade. Neste contexto, o incremento que o sêmen fresco pode ofertar na taxa de concepção de búfalas justificaria seu uso na IATF. Diante do exposto, é objetivo desse estudo comparar a taxa de prenhez obtida com IATF em búfalas de raça Murrah e Mediterrâneo, quando utilizado o sêmen fresco vs. o congelado.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado na Fazenda Bom Destino, no município de Oliveira/MG, Brasil (Latitude 20°41'45" Sul e Longitude 44°49'37" Oeste). O estudo foi realizado após aprovação de todos os procedimentos pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Santa Úrsula (USU), segundo o protocolo 00019/2022, segundo os princípios éticos de experimentação animal.

O sêmen utilizado foi coletado de 1 touro Murrah (*Bubalus bubalis*), com média de 15 anos de idade; ECC = 4 (1-5) e peso médio de 900 kg. O reprodutor apresentava histórico de fertilidade conhecida e era mantido separado das fêmeas, sendo selecionado a partir de exame andrológico e coleta de ejaculados que atendessem as características físicas e morfológicas de acordo com as recomendações do Manual de Andrologia (CBRA, 2013).

Para a coleta utilizou-se uma vagina artificial, com temperatura interna de 42 °C (ALMEIDA *et al.*, 2021; 2023). Acoplado a vagina utilizando-se um copo coletor (tubo plástico 15 mL), graduado e estéril, previamente aquecido e protegido com uma camisa isotérmica para evitar contato com os raios ultravioleta e as mudanças bruscas de temperatura que pudessem afetar o sêmen.

Após a coleta, o ejaculado foi imediatamente direcionado para o laboratório, colocado em banho-maria a 37 °C, para as análises de motilidade e vigor espermático, usando microscopia de luz.

A concentração espermática foi estimada utilizando uma câmara de Neubauer, para obtenção de 40×10^6 SPTZ/mL totais pós diluição final. A amostra de sêmen foi diluída em extensor comercial Botu-Bov[®] (Botupharma, Botucatu/SP, Brasil). Posteriormente foi realizado o envase em palhetas de 0,5 mL (IMV[®] Technologies, L'Aigle Cedex, França). As normas mínimas de qualidade para inclusão no experimento foram: sêmen fresco (motilidade total > 70% e total de defeitos de espermatozoides \leq 30%), conforme recomendação do CBRA (2013).

Na IATF foram utilizadas 138 fêmeas da raça Murrah e Mediterâneas com idades médias de 5,2 anos; ECC = 3,1 (escala de 1-5); peso médio de 442,7 kg, múltiparas (> 2 partos) e lactantes (> 65,4 dias pós-parto), mantidas a pasto sob pastagem de tifton (*Cynodon spp*) e suplementadas com silagem de milho 1 vez por dia durante todo o experimento, com livre acesso à sal mineral e água *ad libitum*.

As búfalas foram distribuídas aleatoriamente em dois grupos: G1 (n = 69) e G2 (n = 69). Cada grupo foi inseminado com sêmen fresco e congelado aleatoriamente, de acordo com a entrada no tronco, sendo que as doses de sêmen foram avaliadas antes do início das IAs e possuíam motilidade média de 75,5% e 35,2% para o sêmen fresco e congelado, respectivamente.

A dinâmica folicular foi avaliada, mas será apresentada em outro estudo. O protocolo de sincronização foi idealizado na seguinte forma: na manhã D0 (8:00h), os animais receberam 2,0 mg i.m de Benzoato de Estradiol (BE, Estrogin[®], Biofarm, SP, Brasil) e implante intravaginal (PRIMER[®] 0,5 g de P4, Agener União Saúde Animal, SP, Brasil), no D9 (8:00h) retirada do implante e aplicação de 400UI i.m eCG (Novormon[®] 5000UI, Zoetis, SP, Brasil) + 0,530 mg de PGF₂ α Cloprostenol i.m (Estron[®], Agener União Saúde Animal, SP, Brasil). No D11 (16:00h) aplicados 25 μ g i.m de GnRH (Sincroforte[®], Acetato de Buserelina, Ouro Fino Saúde Animal, SP, Brasil), na manhã D12 (8:00h) IA.

No D32 foi utilizado a ultrassonografia (US - Aloka-SSD 500, transdutor de 5 MHz, Tokyo, Japan), para verificar a prenhez. Sendo considerado como positivo quando visualizada a vesícula embrionária e/ou confirmado com a visualização dos batimentos cardíacos do embrião. Os touros foram colocados nos lotes somente 15 dias depois da IA para não gerar confundimento na hora do diagnóstico de gestação com a ultrassonografia.

Para a análise estatística, variável diagnóstico de prenhez, foi utilizada como variável dependente. As variáveis idade, peso, dias pós-parto e ECC foram utilizadas como variáveis independentes buscando uma associação entre essas e a dependente. Foi verificada a existência de associação através de tabelas de contingência utilizando o teste qui-quadrado (SAMPAIO, 2007). No caso de verificação de associação entre o diagnóstico de prenhez e alguma variável com mais de duas categorias (nominal) foi utilizado a regressão logística para verificar quais das categorias tinham associação e a força da associação medida pela razão de chances (odds ratio) (DOHOO, 2010).

RESULTADOS

As taxas de concepção total por tipo de sêmen utilizado (fresco vs. congelado), encontram-se sumarizados na tabela 1.

Tabela 1 - Taxas de concepção com sêmen fresco vs. congelado em búfalas submetidas ao protocolo de IATF durante o período reprodutivo favorável (março a maio) de 2022.

Tipo de sêmen	Gestantes %(n/N)	Não-gestantes %(n/N)
Sêmen fresco	55,1 ^a (38/69)	44,9 ^a (31/69)
Sêmen congelado	46,4 ^b (32/69)	53,6 ^b (37/69)
Total	50,7(70/138)	49,3(68/138)

Médias com letras distintas nas colunas diferem entre si ($P < 0,05$); % = Percentagem de concepção; n = número de fêmeas gestantes ou não gestantes e N = número total de fêmeas.

DISCUSSÃO

A bubalinocultura na atualidade frente a situação econômica mundial, requer práticas de gestão eficientes, para aumentar a rentabilidade dos produtores e mantê-los competitivos no mercado. Neste contexto, a eficiência reprodutiva tem sido melhorada com o uso de protocolos hormonais para a inseminação artificial, colaborando para a disseminação da IA, o que está acelerando o ganho genético e, conseqüentemente, aumentando a produção de leite e de carne.

Quando se comparam as taxas de concepção por tipo de sêmen utilizado (fresco vs. congelado), verificou-se que houve diferença estatística significativa ($P < 0,05$) em prol do sêmen fresco, conforme tabela 1.

Pode-se congecturar que o sêmen fresco por ter uma vida útil mais prolongada no tracto reprodutor da fêmea, têm possibilidade de fertilizar mais oócitos (pois esperaria pelos oócitos que demoraram mais a serem liberados ou mesmo aqueles que foram liberados mais precocemente), levando-se em conta os diferentes momentos de ovulação que ocorrem nas búfalas de acordo com os fármacos utilizados (BARUSELLI *et al.*, 2004). O que não ocorre com o sêmen congelado, que possui uma vida útil menor no sistema reprodutor da fêmea (BORCHARDTH *et al.*, 2018).

Sabendo-se que os protocolos de sincronização para IATF não permitem um controle preciso do momento da ovulação (BARUSELLI *et al.*, 2004), a utilização do sêmen fresco, que praticamente não causa danos às células espermáticas, prolonga sua sobrevivência, aumenta a fertilização e, por conseguinte, a gestação, como encontrado neste estudo.

O total de búfalas gestantes considerando-se os dois grupos (sêmen fresco vs. congelado) foi de 50,7% conforme tabela 1. Porém na literatura consultada não foram encontrados trabalhos em búfalos comparando estes dois tipos de sêmen em protocolos de IATF. Mas quando se compara o uso do sêmen refrigerado vs. congelado para a espécie bubalina, existem diversos trabalhos

com resultados favoráveis ao sêmen refrigerado (ALMEIDA *et al.*, 2015; 2016; 2017; 2020; 2021; 2022).

Face aos percentuais de taxa de concepção encontrados neste estudo, somados aos relatos de literatura, fica evidente que a sincronização da ovulação apresenta bons resultados quando se trabalha com animais com ECC entre 3 e 4 numa escala de 1-5.

Estudos anteriores já demonstravam o efeito touro na espécie bubalina, sendo relatada a diferença na capacidade de produzir descendentes nos diferentes sistemas de criação “natural e artificial” (SAACKE *et al.*, 1994). Ward *et al.* (2001) reportaram que os espermatozoides de diferentes touros diferem em sua capacidade de fertilizar o oócito *in vitro*. Segundo o autor, a cinética da clivagem precoce poderia ser usada para diferenciar touros de alta e baixa fertilidade. Nos trabalhos de campo é de fundamental importância a realização de exames andrológicos antes de iniciar a estação de monta ou mesmo antes de iniciar um programa de reprodução com o uso da IATF. Isto porque, o simples exame andrológico, quando bem feito, já é suficiente para retirar os piores touros da reprodução (ALMEIDA, 2023).

A hipótese de que o uso de sêmen fresco poderia melhorar a fertilidade em búfalas sobre o uso de sêmen congelado, foi suportada pelo aumento relativo de 8,7%, na taxa de concepção (tabela 1). Este resultado obtido através do teste de comparação de proporções evidencia que, apesar do sêmen congelado ter vantagens em relação à seu período de armazenamento, ele tem a desvantagem de causar injúrias celulares e perda de espermatozoides viáveis durante a criopreservação.

Em suma, se pode dizer que a taxa de concepção depende, portanto, da probabilidade de os espermatozoides ejaculados passarem por completa modificação morfológica, bioquímica e biofísica, capacitando-se e permitindo a reação acrossômica quando em contato com a zona pelúcida do ovócito (YANAGIMACHI, 1989). Assim, independente do tipo de sêmen utilizado, este deve ter boa qualidade e posteriormente usar fêmeas com bom ECC, com ausência de problemas sanitários, suficiente alimentação nos primeiros meses

de gestação e presença mínima de estresse durante esse período, para se obter boas taxas de concepção.

Neste trabalho não foi realizado um levantamento de custo e benefício para verificar os valores reais entre a utilização do sêmen fresco e congelado. No entanto, o sêmen fresco de búfalos além das vantagens já mencionadas, permite utilizar material genético de reprodutores que possuem qualidade superior após as avaliações morfo-fisiológicas de acordo com o CBRA (2013), mas que não resistem ao processo de criopreservação. Apesar de possuir um menor tempo de armazenamento comparado ao sêmen congelado, na espécie bubalina é possível reduzir o tempo gasto com as IAs. Isto se explica particularmente porque as búfalas aceitam a contenção em tronco coletivo (lado a lado) otimizando o serviço de IATF (figuras 1 e 2), diferentemente dos bovinos que tem de ser contidos individualmente no tronco para a realização das IAs.

Figura 1 - Fêmeas bubalinas contidas em tronco coletivo para a inseminação artificial em tempo fixo.



Fonte: Almeida, J. (2022).

Figura 2 - Inseminação artificial em tempo fixo de vacas bubalinas contidas em tronco coletivo.



Fonte: Almeida, J. (2022).

Característica interessante, uma vez que o sêmen fresco mantém uma motilidade superior ao sêmen congelado num período maior de tempo, comparado ao sêmen pós-descongelamento (VISHWANATH e SHANNON, 2000), tornando possível conjecturar até mesmo a redução na concentração espermática por dose inseminante o que otimizaria o uso de um único ejaculado.

No presente estudo foi usada uma dose de 40×10^6 SPTZ/mL, sendo realizada uma avaliação da motilidade pré-IA, para corrigir as concentrações e evitar que houvesse diferença entre os tipos de sêmen utilizados (fresco vs. congelado) o que poderia beneficiar o sêmen fresco que não sofreu as injúrias do processo de congelamento. Mas certamente essa concentração da dose de sêmen fresco, poderia ser reduzida, otimizando ainda mais o número de fêmeas inseminadas por um mesmo ejaculado, corroborando com Andrabi. (2006), que reportaram em estudo utilizando dose inseminante para búfalos reduzindo de 30 para 15×10^6 SPTZ/mL, não haver redução na fertilidade para o sêmen congelado. Isto permite especular, que para o sêmen congelado a redução da concentração da dose inseminante, não ocasionou redução na taxa de prenhez, certamente a redução na concentração da dose de sêmen fresco poderia ser ainda maior, uma vez que este sofre menos injúrias que o sêmen congelado,

permitindo otimizar ainda mais os touros da fazenda durante os programas de IATF.

Nesse caso, a preservação da viabilidade dos espermatozoides durante algumas horas seria suficiente para o uso dos espermatozoides em fazendas onde os touros são mantidos. Outra vantagem importante do uso do sêmen fresco na IATF, é que dependendo do número de animais trabalhados, o aumento no número de gestações por estação com o uso do sêmen fresco certamente pagaria os protocolos de sincronização.

Quando analisados dados do Brasil em relação ao percentual de IA realizado, verifica-se que o País insemina apenas 23% de seu rebanho bovino com sêmen congelado e, que atualmente a IATF responde por 97,7% (25 milhões) das inseminações realizadas, ganhando cada vez mais espaço no mercado de reprodução (BARUSELLI, 2023). No entanto, apenas 1% das fêmeas bubalinas em idade reprodutiva são inseminadas com sêmen congelado (IBGE, 2013). Frente a estes dados, e aos superiores resultados obtidos com o uso do sêmen fresco em relação ao sêmen congelado, vislumbra-se um enorme mercado a ser explorado e com grande potencial para melhorar os índices reprodutivos tendo em vista o crescimento dos rebanhos bubalinos no Brasil e em outros Países.

CONCLUSÕES

O sêmen fresco aumenta as taxas de concepção comparado ao sêmen congelado e descongelado, em búfalas multíparas no pós-parto submetidas a IATF no período reprodutivo favorável.

O sêmen fresco de búfalos representa uma alternativa promissora ao sêmen congelado, principalmete devido a falta de sêmen congelado da espécie no mercado nacional.

AGRADECIMENTOS

Nossos agradecimentos ao Sr. Marcelo Vargas Leão e ao Sr. João Batista de Souza, proprietários da Fazenda Pedreiras e da Laticínios Bom Destino pelo fornecimento dos animais e das instalações para os procedimentos de campo.

CONFLITO DE INTERESSES

Não houve conflitos de interesses para a confecção deste trabalho.

SUPORTE FINANCEIRO

Não houve suporte financeiro para a realização deste trabalho, sendo o financiamento da pesquisa realizado pelos próprios autores.

CONTIBUIÇÃO DOS AUTORES

Fabiana Hernández Costa: Conceitualização, Revisão de literatura, Metodologia da Pesquisa, Redação inicial; **Lauro Viana Domingos Maranhã:** Conceitualização, Metodologia da Pesquisa Levantamento dos dados da pesquisa; **Jaci de Almeida:** Conceitualização, Revisão de literatura, Metodologia da Pesquisa, Análise estatística dos dados, Redação inicial, Redação final do artigo e correção, Formatação nas normas da Revista, Submissão no site e autor para correspondência.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, J. Exame clínico andrológico em búfalos: particularidades e mercado. Anais da VII Reunião Anual da Associação Brasileira de Andrologia Animal Salvador, BA, 15 a 17 de junho de 2023. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 47, n. 3, p. 564-573, jul./set. 2023.

ALMEIDA, J. **Sêmen refrigerado e seu potencial de uso na inseminação artificial de búfalas (*Bubalus bubalis*)**. 2018. 195p. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária, 2018. Disponível em: <http://hdl.handle.net/1843/SMOC-B2CH5S>. Acesso em: 12 de abr. de 2023.

ALMEIDA, J.; BRITO, M. F.; AULER, P. A.; MORAIS, C. M. L.; ANDRADE, G. O.; NEVES, B. P.; BARUSSELLI, P. S.; HENRY, M. Avaliação das taxas de prenhez em búfalas com o uso de sêmen refrigerado vs. congelado em programas de IATF durante a estação reprodutiva desfavorável. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL**, 21, p. 99, 2015, Belo Horizonte, MG. Anais...Belo Horizonte: CBRA, 2015. Disponível em: CD.

ALMEIDA, J.; BRITO, M. F.; BECERRA, V. A. B.; AULER, P. A.; DUTRA, P.; SILVA, D. F.; CUNHA, L. B.; PÂNUELA, P. A. O.; BARUSSELLI, P. S.; HENRY, M. Avaliação das taxas de prenhez em búfalas primíparas submetidas a IATF com sêmen refrigerado vs. congelado durante a estação reprodutiva desfavorável. Reunião da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Recife, PB, **Animal Reproduction**, v. 14, n. 3, p. 666, Jul./Sept. 2017. Disponível em: Anais da **XXXI Reunião Anual da SBTE 2017**. Acesso em: 10 de abr. de 2023.

ALMEIDA, J.; BRITO, M. F.; NEVES, B. P.; AULER, P. A.; HADDAD, J. P.; BARUSSELLI, P. S.; HENRY, M. Use of cooled buffalo semen as a strategy to increase conception rates in fixed-time artificial insemination programs during unfavorable reproductive periods. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 73, n. 3, p. 560-570, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1678-4162-12142>. Acesso em: 02 de abr. de 2023.

ALMEIDA, J.; BRITO, M. F.; NEVES, B. P.; BECERRA, V. A. B.; AULER, P. A.; BARUSSELLI, P. S.; HENRY, M. Evaluation of pregnancy rates in milk buffaloes submitted to FTAI with Ovsynch or P4/E2 and eCG based protocols with refrigerated or frozen semen during favorable and unfavorable breeding season. **Animal Reproduction**. p. 17, n. 3, 2020. Anais da **XXXIV Reunião Anual da SBTE 2020**. Acesso em: 11 de abr. de 2023.

ALMEIDA, J, BRITO, M. F., NEVES, B. P. AULER, P. A.; BARUSSELLI, P. S.; HENRY, M. Pregnancy rates of buffaloes (*Bubalus bubalis*) using cooled or frozen semen at fixed time artificial insemination: preliminary results. **Revista Medicina Veterinaria y Zootecnia**, v. 11, n. 3, p. 183- 495, 2016b. Disponível em: <https://animalreproduction.org/journal/animreprod/article/62fe7d22a9539579ec56a3d4>. Acesso em: 16 de abr. de 2023.

ALMEIDA, J.; HENRY, M.; RESENDE, O. A. Evaluation in the casa system of cryopreserved buffalo semen in farm for FTAI. 35th Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE). **Animal Reproduction**, v. 19, n. 2, p. 8, 2022. Disponível em: <https://animal-reproduction.org/journal/animreprod/article/62fe7d22a9539579ec56a3d4>. Acesso em: 11 de abr. de 2023.

ALMEIDA, J.; NEVES, B. P.; BRITO, M. F.; BECERRA, V. A. B.; AULER, P. A.; RESENDE, O. A.; HENRY, M.; Avaliação da longevidade espermática em sêmen refrigerado de Búfalos (*Bubalus bubalis*) à 5 °C. **PUBVET**, v. 17, n. 02, a1336, p. 1-14, 2023. Disponível em:

DOI: <https://doi.org/10.31533/pubvet.v17n02a1336>. Acesso em: 12 de abr. de 2023.

ANDRABI, S. M. H.; SIDDIQUE, M.; ULLAH, N.; KHAN, L. A. Effect of reducing sperm numbers per insemination dose on fertility of cryopreserved buffalo bull semen. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 26, n. 1, p. 17-9, 2006. Disponível em: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20063146233>. Acesso em: 14 de abr. 2023.

ASBIA - Associação Brasileira de Inseminação Artificial. **Index ASBIA Mercado, 2021**. Disponível em: <http://www.asbia.org.br/wp-content/uploads/2022/02/Index-Asbia-2021-M%C3%ADdia-3.pdf>. Acesso em: 05/05/2022.

BARUSELLI, P. S. Com desaceleração de 5% em 2022, mercado da IATF registra primeiro recuo em 20 anos. **Boletim Eletrônico do Departamento de Reprodução Animal-FMVZ/USP**, 7ª ed., 2023. Disponível em: <http://vra.fmvz.usp.br/boletim-eletronico-vra/>. Acesso em: 12 de mar. De 2023.

BARUSELLI, P. S.; CARVALHO, N. A. T.; JACOMINI, J. O. Eficiência uso da inseminação artificial em búfalos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Suplemento, Belo Horizonte, n. 6, p. 104-110, dez. 2009. Disponível em: <http://cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/p104-110.pdf>. Acesso em: 16 de abr. de 2023.

BARUSELLI, P. S.; REIS, E. L.; MARQUES, M. O.; NASSER, L. F.; BÓ, G. A. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrous beef cattle in tropical climates. **Animal Reproduction of Science**, v. 82/83, p. 479-486, 2004. Disponível em: doi: 10.1016/j.anireprosci.2004.04.025. Acesso em: 24 de mar. 2023.

BARUSELLI, P. S. Atividade ovariana e comportamento reprodutivo no período pós-parto em búfalos (*Bubalus bubalis*). 1992. 91f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, **Universidade de São Paulo**, São Paulo, 1992. Disponível em: <https://repositorio.usp.br/item/000735314>. Acesso em: 12 de abr. de 2023.

BERNARDES, O. **Estimativa das características do rebanho bubalino brasileiro em 2016**. 5p. Disponível em: DOI: [10.13140/RG.2.2.24303.53925](https://doi.org/10.13140/RG.2.2.24303.53925). Acesso em: 10 de abr. de 2023.

BORCHARDTH, S.; SCHULLER, L.; WOLF, L.; WESENAUER, C.; HEUWIESER, W. Comparison of pregnancy outcomes using either an Ovsynch or a Cosynch protocol for the first timed AI with liquid or frozen semen in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 107, p. 21-26, 2018. Disponível em: doi: 10.1016/j.theriogenology.2017.10.026. Acesso em: 11 de abr. de 2023.

BUCHER, A.; KASIMANICKAM, R.; HALL, J. B.; DEJARNETTE, J. M.; WHITTIER, W. D.; KAHN, W.; XU, Z. Fixed-time AI pregnancy rate following insemination with frozen-thawed or fresh-extended semen in progesterone supplemented CO-Synch protocol in beef cows. **Theriogenology**, v. 71, p. 1180-1185, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.12.009>. Acesso em: 04 de abr. de 2023.

CBRA - COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal**. 3ª ed., Belo Horizonte: CBRA, 104p., 2013.

DOHOO, I. R.; MARTIN, W.; STRYHN, H. **Veterinary Epidemiologic Research**. 2ª ed. Charlottetown, Canadá: University of Prince Edward Island, 865p., 2010.

FAO 2020. www.fao.org/dairy-production-products/production/dairy-animals/buffaloes/en/. Gateway to dairy production and products. Disponível em: <https://www.fao.org/family-farming/detail/en/c/1605825/>. Acesso em: 02 de abr. 2023.

FAO. World buffalo population; 2017. Available: <http://www.fao.org/fd8ce742-c531-4111-9ff0-dae56ac3de1>. 2019. Acesso em: 25 de mar. de 2023.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home>, 2013.

MATOS, A.; ARAÚJO, C.; PIMENTEL, C. LAUREANO, M. M. M.; MARQUES, L. C.; SALES, R. L.; SILVA, C. S.; FILHO, E. S.; MARQUES, J. R. F. Production of buffalo milk (*Bubalus bubalis*) in Brazil. **Buffalo Bull**, v. 39, n. 3, p. 323-329, 2020. Disponível em: <https://kuojs.lib.ku.ac.th/index.php/BufBu/article/view/2268>. Acesso em: 06 de mar. de 2023.

MOREIRA, P.; COSTA, A. L.; VALENTIM, J. F. Comportamento produtivo e reprodutivo de bubalinos mestiços Murrah-Mediterrâneo em pastagem cultivada de terá firme, no Estado do Acre. **Folheto EMBRAPA ACRE**, v. 13, p. 19, 1994. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/492214/comportamento-produtivo-e-reprodutivo-de-bubalinos->

mesticos-murrah-mediterraneo-em-pastagem-cultivada-de-terra-firme-no-estado-do-acre. Acesso em: 06 de abr. de 2023

OLIVEIRA, C.M.C.; BARBOSA, J.D.; MACEDO, R. S. C.; BRITO, M. F.; PEIXOTO, P. V.; TOKARNIA, C. H. Estudo comparativo da toxidez de *Palicourea juruana* (*Rubiaceae*) para búfalos e bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24, p. 27-30, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2004000100007>.

Acesso em: 14 de abr. de 2023.

SAACKE, R. G.; NADIR, S.; DALTON, J. C. Accessory sperm evaluation and bull fertility: an update. Proc 15th Tech Conf Artif Insem and Reprod Nat'l. **Association of animal breeders**, Columbia, MO, p. 57-67, 1994.

SAMPAIO, I.B.M. **Estatística Aplicada à Experimentação Animal**. 3^a ed. Ed. Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte, Brasil, 264p., 2007.

VALE, W. G., RIBEIRO, H. F. L. Características reprodutivas dos bubalinos: puberdade, ciclo estral, involução uterina e atividade ovariana no pós-parto. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 29, n. 2, p. 63-73, abril/jun. 2005. Disponível em: <chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcgclefindmkaj/http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/RE026.pdf>. Acesso em: 27 de mar. de 2023.

VISHWANATH, R.; SHANNON, P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 23-53, 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00153-6](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00153-6). Acesso em: 14 de abr. de 2023.

WARD, F.; RIZOS, D.; CORRIDAN, D. *et al.* Paternal influence on the time of first embryonic cleavage post insemination and the implications for subsequent bovine embryo development in vitro and fertility *in vivo*. **Molecular Reproduction and Development**, v. 60, p. 47-55, 2001. Disponível em: DOI: [10.1002/mrd.1060](https://doi.org/10.1002/mrd.1060). Acesso em: 16 de mar. de 2023.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction of Science**, v. 60-61, p. 481-492, 2000. Disponível em: DOI: [10.1016/s0378-4320\(00\)00099-3](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(00)00099-3). Acesso em: 07 de abr. de 2023.

YANAGIMACHI, R. Sperm capacitation and gamete interaction. **Journal of Reproduction and fertility**, v. 38, p. 27-33, suppl., 1989. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2677347/>. Acesso em: 22 de mar. de 2023.