



**Universidade Federal do Pará
Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Universidade Federal Rural da Amazônia
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal
Área Produção Animal**

Anelise de Sarges Ramos

PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BUBALINOS NA ILHA DO MARAJÓ

Belém, PA
2022

Anelise de Sarges Ramos

PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BUBALINOS NA ILHA DO MARAJÓ

Dissertação apresentada como parte final das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Pará (UFPA), Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Amazônia Oriental e Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA).

Orientador: Prof. Dr. Moysés dos Santos Miranda

Coorientador: Prof.^a Dr.^a Simone do Socorro Damasceno Santos

Belém, PA
2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

R175p Ramos, Anelise.
Produção in vitro de embriões bubalinos na ilha do Marajó /
Anelise Ramos. — 2022.
LIII, 53 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. Moysés Miranda
Coorientador(a): Prof. Dr. Simone do Socorro Damasceno
Santos

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará,
Campus Universitário de Castanhal, Programa de Pós-
Graduação em Ciência Animal, Castanhal, 2022.

1. búfalas. 2. produção de embriões. 3. arquipélago
marajoara. I. Título.

CDD 571.81

ANELISE DE SARGES RAMOS

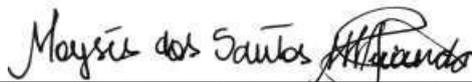
PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BUBALINOS NA ILHA DO MARAJÓ

Dissertação apresentada como parte final das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Pará (UFPA), Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Amazônia Oriental e Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA).

Orientador: Prof. Dr. Moysés dos Santos Miranda

Coorientador: Prof.^a Dr.^a Simone do Socorro Damasceno Santos

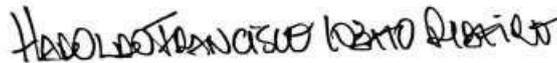
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Moysés dos Santos Miranda
Universidade Federal do Pará – Orientador



Prof.^a Dr.^a Nathalia Nogueira da Costa de Almeida
Universidade Federal do Pará – Membro Titular



Prof. Dr. Haroldo Francisco Lobato Ribeiro
Universidade Federal Rural da Amazônia – Membro Titular

Belém, PA
2022

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, que em sua infinita misericórdia tornou possível toda essa trajetória, mostrando-me os caminhos que deveriam ser trilhados e guiando-me em meus momentos de fraqueza.

Aos meus pais Maria Santana e Francisco Ramos, pela dedicação, amor, paciência, carinho, dando-me apoio incondicional e lições valiosas, que nunca serão esquecidas.

Aos meus irmãos: Francisco, Alex e Amanda, pelo seu carinho e atenção.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

A FAPESPA pelo novo patrocínio financeiro, nos permitindo dar continuidade de maneira mais confortável aos trabalhos desenvolvidos no Marajó.

Ao SENAR/ FAEPA e SEDAP pelo reconhecimento e pelo emprego para que as pesquisas no Marajó, a nível de laboratório, não terminassem.

Aos Produtores marajoaras pelo financiamento do projeto e disponibilidade dos animais para a pesquisa e experimentos, em especial ao Dr. João Rocha por sempre estar disponível a qualquer pedido da equipe e também por lutar para que eu fosse contratada e voltasse a assumir as OPUs Marajoaras.

Ao Loreno Francez por ter feito o primeiro contato com as escolas e com os produtores para instalação do projeto e por ter cedido sua casa para nos abrigar durante o início de nossa pesquisa.

Aos colégios que serviram (Escola Salomão) e servem (EETEPA) como instalação do laboratório de FIV.

A equipe marajoara pioneira: João Ricardo, Carolina Rodrigues, Satish Kumar, Paulo Cruz e Yanka Monteiro que estiveram comigo e aguentaram os momentos mais difíceis de instalação e desenvolvimento das primeiras atividades marajoaras.

Aos amigos que o Marajó me deu e que ajudaram nos momentos mais difíceis também: Simey, Yuri, Syanne, Michele, Baixinho, Rafael e Max.

Aos meus professores da UFRA, responsáveis por terem me encaminhado ao LabFIV, por todas as conquistas profissionais que consegui por ter seguido seus conselhos e são os profissionais por quem guardo minha eterna admiração: Prof. Dr. Haroldo Francisco Lobato Ribeiro e Prof. Dr. Sebastião Tavares Rolim Filho, meu muito obrigada pelos incentivos e aprendizados contínuos.

Às professoras da UFPA: Prof^ª. Dr^ª. Simone Do Socorro Damasceno Santos, pela amizade, preocupação com minha formação e pela confiança em meu trabalho; Prof^ª. Dr^ª. Nathalia Nogueira da Costa de Almeida por me ajudar, incentivar e não me deixar desistir no decorrer de todas as tentativas falhas dos vários experimentos para finalização do mestrado.

Aos meus amigos do Setor de Reprodução Animal, em especial: Elenara Botelho Araújo, Larissa Teixeira e Juliana Vasconcelos, pela amizade e por todo apoio para o desenvolvimento deste trabalho.

A toda a equipe do laboratório de fecundação *in vitro* da UFPA, em especial: Eduardo Baia e Bruno Porpino, que sempre estarem disponíveis para ajudar e apoiar no que for preciso.

Aos animais, pois sem eles não teríamos o desenvolvimento da pesquisa.

A todos vocês, agradeço com todo meu coração. Muito OBRIGADA!

Dedico este trabalho *in memoriam* ao meu eterno Orientador Prof. Dr. **Otávio Mitio Ohashi** que nos deixou de uma maneira tão precoce, mas não sem antes deixar plantado em mim este sonho e este amor de sempre levar a PIVE para os lugares mais longínquos e com sua grande experiência e genialidade sempre fazia dar certo e parecer que seria fácil rsrsrsrs. Obrigada por todo ensinamento professor e saiba que por onde eu for, irei sempre levar seu legado e seus ensinamentos a todos que tenham interesse pela ciência!!!!

EPÍGRAFE

“O homem não teria alcançado o possível, se repetidas vezes, não tivesse tentado o impossível. ”

Max Weber

RESUMO

RAMOS, A. S. **Produção *in vitro* de embriões bubalinos na ilha do Marajó.** Belém, 2022. 62f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária, Campus Castanhal, Universidade Federal do Pará- UFPA, 2022.

Visando estudar biotécnicas reprodutivas que possam melhorar a produção embriões *in vitro* na Amazônia. O experimento objetivou analisar os efeitos dos níveis pluviométricos, sêmen utilizado, crioprotetores (diluidores) de sêmen, presença do folículo dominante e corpo lúteo sobre a quantidade e qualidade de oócitos e na taxa de embriões. O experimento foi realizado na fazenda Paraíso no município de Cachoeira do Arari, Ilha do Marajó - PA, durante de um ano. Folículos com diâmetro acima de 4,0 mm foram obtidos pela técnica de aspiração folicular – Ovum Pick-up (OPU), guiada por ultrassonografia. Foram selecionadas 40 búfalas para OPU e três reprodutores para colheita seminal, todos da raça Murrah e em idade reprodutiva. Para criopreservação foram testados os diluidores BotuBov® e o Tes-Tris. Os *complexos cumulus oophorus* (CCOs) foram processados no Laboratório de Produção *in vitro* da Escola de Ensino Técnico do Estado do Pará (EETEPa). Os melhores (CCOs) foram maturados, fertilizados e cultivados *in vitro*, após seis dias, os embriões foram qualificados e quantificados, usando a técnica desenvolvida pelo laboratório de FIV da UFPA. O diluidor BotuBov® foi o diluidor usado na PIVE por apresentar melhor motilidade progressiva ($p < 0,05$), ($70,70\% \pm 10,90\%$) em relação ao Tes- Tris ($60,42\% \pm 6,00\%$). Não houve diferença estatística ($p > 0,05$) nas médias e desvio padrão dos folículos total aspirados, ($11,75 \pm 5,23$), de folículos aspirados por animal ($11,23 \pm 1,39$), de CCOs rastreados total ($10,5 \pm 61,65$) e de CCOs rastreados por animal ($5,96 \pm 1,56$) entre a estação chuvosa e a menos chuvosa (folículos totais aspirados $12,47 \pm 4,86$, folículos aspirados por animal $11,74 \pm 1,04$, CCOs rastreados total $118,5 \pm 12,02$ e CCOs rastreados por animal $7,27 \pm 0,83$) respectivamente. Assim como, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) na presença do corpo lúteo e de folículos dominantes e do escore de condição corporal (ECC). Nas taxas de embriões, também não houve diferença estatística ($p > 0,05$), entre estações mais chuvosa ($25,25\% \pm 0,64\%$) e menos chuvosa ($19,37\% \pm 14,06\%$), respectivamente. Não verificamos diferenças estatísticas nas taxas de embriões, ($p > 0,05$) em relação ao sêmen utilizados ($59,33\% \pm 22,27\%$, $38,29\% \pm 20,35\%$ $54,17\% \pm 31,55\%$). Desta forma, concluímos que as variáveis estudadas não influenciaram na produção de embriões.

Palavras chave: búfalas, produção de embriões, arquipélago marajoara.

ABSTRACT

RAMOS, A. S. *In vitro* production of buffalo embryos on the island of Marajó. Belém, 2022. 62f. Dissertation (Master's) – Faculty of Veterinary Medicine, Federal University of Pará, 2022.

Aiming to study reproductive biotechniques that can improve *in vitro* embryo production in the Amazon. The experiment aimed to analyze the effects of rainfall levels, semen used, cryoprotectants (diluters) of semen, presence of the dominant follicle and corpus luteum on the quantity and quality of oocytes and on the rate of embryos. The experiment was carried out on the Paraíso farm in the municipality of Cachoeira do Arari, Ilha do Marajó - PA, for one year. Follicles with a diameter greater than 4.0 mm were obtained by the technique of follicular aspiration – Ovum Pick-up (OPU), guided by ultrasound. Forty buffaloes were selected for OPU and three sires for seminal collection, all of the Murrah breed and of reproductive age. For cryopreservation, the BotuBov® and Tes-Tris extenders were tested. The cumulus oophorus complexes (CCOs) were processed in the *in vitro* production laboratory of the Escola de Ensino Técnico do Estado do Pará (EETEPA). The best ones (CCOs) were matured, fertilized and cultured *in vitro*, after six days, the embryos were qualified and quantified, using the technique developed by the FIV laboratory at UFPA. The BotuBov® extender was the extender used in the PIVE for presenting better progressive motility ($p < 0,05$) ($70,70\% \pm 10,90\%$) in relation to the Tes-Tris ($60,42\% \pm 6,00\%$). There was no statistical difference ($p > 0,05$) in the means and standard deviation of total aspirated follicles ($11,75 \pm 5,23$), of aspirated follicles per animal ($11,23 \pm 1,39$), of total screened COCs ($10,5 \pm 61,65$) and of CCOs tracked per animal ($5,96 \pm 1,56$) between the rainy and less rainy seasons (total follicles aspirated $12,47 \pm 4,86$, follicles aspirated per animal $11,74 \pm 1,04$, total screened CCOs $118,5 \pm 12,02$ and screened CCOs per animal $7,27 \pm 0,83$) respectively. Likewise, there was no significant difference ($p > 0,05$) in the presence of the corpus luteum and dominant follicles and in the body condition score (ECC). In terms of embryos, there was also no statistical difference ($p > 0,05$), between the rainiest ($25,25\% \pm 0,64\%$) and less rainy seasons ($19,37\% \pm 14,06\%$), respectively. We did not find statistical differences in embryo rates ($p > 0,05$) in relation to the semen used ($59,33\% \pm 22,27\%$, $38,29\% \pm 20,35\%$, $54,17\% \pm 31,55\%$). Thus, we concluded that the variables studied did not influence the production of embryos.

Keywords: buffaloes, embryo production, marajoara archipelago.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 15 |
| 2. OBJETIVOS | 17 |
| 2.1. OBJETIVO GERAL | 17 |
| 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 17 |
| 3. REVISÃO DE LITERATURA | 18 |
| 3.1. FATORES QUE INFLUENCIAM NA ATIVIDADE REPRODUTIVA | 18 |
| 3.1.1. Sazonalidade | 18 |
| 3.1.2. Clima | 19 |
| 3.1.3. Nutrição | 20 |
| 3.2. OPU E PIVE EM BÚFALAS | 21 |
| 3.3. TAXA DE RECUPERAÇÃO OOCITÁRIA EM BÚFALAS | 21 |
| 3.4. INFLUÊNCIA DO CORPO LÚTEO (CL) NA OPU | 23 |
| 3.5. INFLUÊNCIA DO FOLÍCULO DOMINANTE NA OPU | 23 |
| 3.6. INFLUÊNCIA DOS MEIOS DE CULTURA NA PIVE EM BÚFALAS | 24 |
| 3.7. TAXA DE EMBRIÕES EM BÚFALAS NA PIVE | 26 |
| 3.8. INFLUÊNCIA DE DIFERENTES TOUROS NA PIVE | 27 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 28 |
| 4.1. LOCAL DOS EXPERIMENTOS | 28 |
| 4.2. MANEJO SANITÁRIO E ALIMENTAR DOS ANIMAIS | 29 |
| 4.3. ASPIRAÇÃO FOLICULAR (OPU) E PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES (PIVE) | 29 |
| 4.3.1. Seleção das vacas doadoras de oócitos | 29 |
| 4.3.2. Aspiração folicular - <i>Ovum pick-up</i> (OPU) | 30 |
| 4.3.3. Recuperação e seleção dos <i>complexos cumulus oophorus</i> (CCOs) | 30 |
| 4.3.4. Maturação <i>in vitro</i> (MIV) | 31 |
| 4.3.5. Fecundação <i>in vitro</i> (FIV) | 32 |
| 4.3.6. Cultivo <i>in vitro</i> (CIV) | 32 |
| 4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA | 33 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 34 |
| 5.1. OPU E PIVE | 34 |
| 5.1.1. Quantitativo de aspirações (OPU) de búfalas submetidas a PIVE | 34 |
| 5.1.2. Efeito do período mais chuvoso e menos chuvoso na taxa de recuperação oocitária | 36 |

| | | |
|---------------|---|-----------|
| 5.1.3. | Efeito da presença do corpo lúteo e do maior folículo dominante na PIVE | 38 |
| 5.1.4. | Influência do escore da condição corporal (ECC) na recuperação oocitária da PIVE | 39 |
| 5.1.5. | Influência da época mais e menos chuvosa na Ilha de Marajó. | 41 |
| 5.1.6. | Influência do touro na taxa de PIVE | 43 |
| 6. | CONCLUSÃO | 44 |
| 7. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 45 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Localização geográfica da Fazenda Paraíso em Cachoeira do Arari e do Laboratório de Fertilização in vitro em Salvaterra, ambos pertencentes a Messorregião do Marajó..... | 28 |
| Figura 2. BRS Capiacu plantado para ser utilizado para produção de silagem; B: preparação do Silo; C: Abertura do primeiro Silo de BRS Capiacu, com assistência ATeG leite Parceria entre SENAR/FAEPA na Fazenda Cachoeira do Arari no Marajó. | 29 |
| Figura 3. A: Rastreamento; B: seleção dos CCOs realizado com auxílio de lupa estereomicroscópica; C: os CCOs foram incubados, em gotas de 100µL de meio de MIV em placas de petri de 35 mm sob óleo mineral estéril..... | 31 |
| Figura 4. Efeito do período climático recuperação de folículos e oócitos aspirados e rastreados na OPU de bubalinos na Região do Marajó. | 36 |
| Figura 5. Influência do ECC na quantidade de folículos e oócitos aspirados nas sessões de OPU's no Marajó. | 40 |
| Figura 6. Influência da época mais e menos chuvosa, sobre a taxa de produção de embriões, de acordo com o período estudado, cachoeira do Arari, Ilha do Marajo - PA. | 41 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BEN: Balanço Energético Negativo;

BSA: Albumina Sérica Bovina;

CCOs: *complexos cumulus oophorus*;

CIV: Cultivo *in vitro*;

CL: Corpo Lúteo;

DEP: Diferença Esperada da Progenie;

ECC: Escore de Condição Corporal;

FIV: Fertilização *in vitro*;

GnRH: Hormônio Liberador de Gonadotrofina;

MIV: Maturação *in vitro*;

OPU: *Ovum Pick-up*;

PIVE: Produção *in vitro* de Embriões;

PTA: Predicted Transmitting Ability;

ROS: Radicais Livres de Oxigênio;

SFB: Soro Fetal Bovino;

SOF: Fluido Sintético de Oviduto;

SSS: Soro Sintético Quimicamente Definido;

TE: Transferência de Embriões;

TES-TRIS: ácido N-Trishidroximetil-metil-2-aminometanosulfônico;

TRAs: Técnicas de Reprodução Assistida.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Número de aspirações, n° de bufalas, pluviosidade, n°folículos aspirados, média de folículos por vaca, oócitos rastreados, média de oócitos por vaca, embriões produzidos, média de embriões por vaca e embriões produzidos de búfalas submetidas a PIVE no Marajó..... 34
- Tabela 2.** Influência da presença ou ausência do corpo lúteo e de folículo dominante na quantidade de folículos e oócitos aspirados nas sessões de OPU's no Marajó. 38

1. INTRODUÇÃO

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE (2019), o Pará lidera na produção bubalina e concentra o maior rebanho do Brasil, com 38,13% da produção nacional. Os dados demonstram que das 1.434.141 cabeças produzidas no Brasil, 546.777 estão presentes do Pará (representando um ganho de 5,34% em relação ao ano de 2018), sendo a região da Ilha do Marajó responsável pelo maior quantitativo do rebanho. Os municípios de Chaves (32,09%), Soure (15,41%) e Cachoeira do Arari (8,15%) são os que mais se destacam no segmento. Com a crescente expansão do agronegócio, diversas técnicas de reprodução assistida (TRAs) têm sido empregadas e adaptadas com a finalidade de maximizar a produção e sendo utilizadas de maneira mais abrangente em animais de alto valor produtivo, oriundos tanto de material genético masculino (sêmen congelado), quanto de material genético feminino (superovulação, transferência de embriões e produção *in vitro* de embriões), aumentando a velocidade de seleção genética do rebanho bubalino.

Segundo Shahzad et al., (2020), a importância da espécie bubalina está diretamente ligada ao fato de que ela suporta quase 13% da demanda mundial de leite, assim também como é uma importante fonte de carne e produtos lácteos. Impulsionando, desta forma, a economia de inúmeros países em desenvolvimento e conseqüentemente levando ao aumento da produtividade pecuarista através de TRAs, que tem por finalidade melhorar a genética animal.

Por outro lado, a técnica pioneira na multiplicação de material genético materno foi a transferência de embriões (TE), primeiramente relatada em coelhos em 1891 por Heape. Em bovinos, no entanto, uma maior difusão ocorreu a partir da década de 70 quando a abordagem deixou de ser cirúrgica (BALL & PETERS, 2004). Porém, em bubalinos, a eficiência da técnica de TE é inferior em comparação aos bovinos visto que em bubalino são recuperadas poucas estruturas embrionárias, geralmente de baixa qualidade, mesmo quando a resposta superovulatória é satisfatória (BARUSELLI et al., 2007; CAMPANILE et al., 2010).

Portanto, devido ao insucesso na transferência de embriões (TE) em bubalinos a técnica de Produção *in vitro* de Embrião (PIVE) tornou-se uma ferramenta mais viável, permitindo deste modo, a difusão do material genético materno de fêmeas bubalina de alta produção. Inúmeros são os fatores que influenciam a PIVE em bubalino e para o sucesso de um programa de natureza comercial são considerados alguns fatores

imprescindíveis: quantidade e qualidade dos oócitos (fatores genéticos, nutricionais), seleção das doadoras de oócitos (animais com alta produção de carne ou leite e com maior população folicular), meios de cultivo de oócitos/embriões (estudos em metabolismo de proteínas, lipídios, anti-oxidantes), manejo e nutrição animal, como deficiências minerais, energéticas, estresse térmico, entre outros (OHASHI et al., 2017).

Saliba et al., (2013) e Ohashi et al. (2017), relataram alta taxa de blastocistos, sendo observada uma grande variação individual nas doadoras e também entre touros utilizados como doadores de sêmen, demonstrando a necessidade da seleção prévia da doadora e do touro para um bom resultado no processo de PIVE.

Ohashi et al. (2017) e Marin et al. (2019), trabalhando com doadoras selecionadas através do tamanho do ovário, quantidade de população folicular, comparado animais fêmeas com alta e baixa população folicular obtiveram excelentes resultados demonstrando que é possível aumentar a produção de embriões bubalinos, porém existe a necessidade de seleção das doadoras para essas características.

Devido à grande variabilidade de resultados encontrados na literatura, existe a necessidade de mais estudos que visem aumentar a eficiência das técnicas de congelação seminal (escolha dos melhores touros e melhores diluidores) e PIVE em bubalinos com o intuito de elevar a produção de leite e de carne, por meio da difusão mais rápida e eficiente de material genético de alto valor zootécnico e de difundir entre os pequenos produtores material genético, que estes não poderiam ter acesso devido ao elevado custo.

E para se tentar alcançar tais metas, o presente trabalho teve como objetivo verificar se as variáveis: perfil pluviométrico regional, condição corporal das doadoras, sêmen, presença do corpo lúteo e do maior folículo, influenciariam nas taxas de embriões produzidos em búfalos do Marajó.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Viabilizar a produção *in vitro* de embriões (PIVE) em búfalas na ilha do Marajó.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o efeito da concentração pluviométrica regional na quantidade e qualidade das aspirações foliculares;

Avaliar a influência do escore de condição corporal (ECC) na quantidade de folículos e oócitos aspirados;

Definir a existência de uma estação favorável ou desfavorável nas taxas de embriões;

Avaliar a influência do corpo lúteo na quantidade e qualidade de folículos e oócitos aspirados;

Avaliar a interferência do folículo dominante na quantidade de folículos e oócitos aspirados;

Verificar a contribuição do sêmen nas taxas de embriões.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. FATORES QUE INFLUENCIAM NA ATIVIDADE REPRODUTIVA

Os búfalos (*Bubalus bubalis*) são animais que possuem seu período reprodutivo influenciado pela sazonalidade, clima, temperatura, alimentação e genética. Entretanto, esse último fator não consegue exercer tanto impacto no ciclo estral desses animais, quanto os aspectos ambientais (ZICARELLI, 1994). Além disso, variações na latitude também podem interferir no comportamento reprodutivo dos bubalinos (VALE E RIBEIRO, 2005).

3.1.1. Sazonalidade

Apesar de ter a fisiologia reprodutiva semelhante à do bovino, a fêmea bubalina, possui uma particularidade que afeta a dinâmica do seu eixo hipotalâmico – hipofisário-gonadal. Torres et al., (2018), afirmou que o búfalo, por ser um animal poliéstrico estacional de dias curtos, possui a síntese e a liberação dos hormônios reprodutivos modulados conforme as variações de luminosidade ao longo do ano, fazendo com que a búfala entre em seu período reprodutivo quando os dias ficam mais curtos e as horas de luz diminuam. No entanto, na zona equatorial e em regiões com latitude mais baixas os búfalos se comportam como poliéstricos contínuos com cios regulares de duração de 21 dias, em média, que podem variar dependendo do manejo, clima, alimentação e genética.

Phogat et al., (2016), afirmou que essa característica fotoperiódica tem relação com a melatonina. Esse hormônio é liberado quando a retina captura a informação de luz e envia um sinal para a glândula pineal que secreta essa substância para informar ao sistema reprodutor a duração da noite, sendo que ela mantém seus níveis elevados em períodos de baixa luminosidade. Além disso, a melatonina regula a liberação da tireotrofina, hormônio glicoproteico que se liga as regiões do hipotálamo responsáveis por produzir e secretar o hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) que modula, dessa maneira, a secreção das gonadotrofinas e a atividade ovariana dos bubalinos. Gasparini (2019), afirma que não apenas o fotoperíodo, mas também fatores ambientais e nutricionais afetam diretamente o desempenho reprodutivo das búfalas, refletindo nos resultados da taxa de prenhez.

Nos machos, de acordo com Torres et al., (2018), o fotoperíodo diminui a libido e modifica a qualidade e volume do ejaculado. A melatonina age diretamente sobre os testículos, espermatozoides e plasma seminal (CASAO et al., 2010). Ela atua aumentando a motilidade espermática, diminuindo as alterações apoptóticas e estimulando a atividade de enzimas antioxidantes que eliminam radicais livres do plasma seminal e equilibram o ejaculado.

3.1.2. Clima

Os búfalos (*Bubalus bubalis*) são animais homeotérmicos, logo conseguem regular a sua temperatura corporal. Contudo são muito sensíveis a radiação solar e altas temperaturas (DE SOUZA JUNIOR et al., 2008). A epiderme desses animais, é mais espessa se comparada com a dos bovinos e apresenta tonalidade escura por conta da elevada quantidade de melanina (FAO, 1991). Essa característica protege o animal contra a radiação ultravioleta do sol, mas dificulta a perda de calor para o ambiente. Além disso, os bubalinos possuem reduzida quantidade de pelos distribuídos pelo corpo na forma de tufos que, com o passar do tempo, vão reduzindo ainda mais. Esse aspecto favorece a dissipação de calor por não formar uma camada isolante, mas torna o animal vulnerável as radiações infravermelhas que são absorvidas com mais intensidade pela sua pele escura (DE SOUZA JUNIOR et al., 2008).

Nota-se, portanto, que o búfalo é um animal que pode se adaptar a temperaturas elevadas, mas que ainda sofre com os efeitos do estresse térmico principalmente no aspecto reprodutivo. Na dinâmica folicular, o calor é responsável por reduzir o diâmetro do folículo dominante e causar uma desordem no ciclo estral da búfala. Isso porque a relação de dominância é alterada e a regressão de folículos subordinados é atrasada (GARCIA, 2013). Além disso, a PIVE também é afetada pela elevada temperatura, pois esse fator reduz a qualidade oocitária e, conseqüentemente, dificulta o processo de fecundação e desenvolvimento do embrião (PAES et al., 2015).

Desta forma, o clima está diretamente ligado ao manejo alimentar dos bubalinos, pois o período das águas e o período da seca estão relacionados com a disponibilidade de forragem. O período das águas é caracterizado pelo elevado calor e umidade, fatores esses que favorecem o crescimento de pastagens com alto valor nutritivo para o animal (PAULA et al., 2020). No período seco isso não ocorre, a baixa quantidade de água afeta

o crescimento das pastagens e a qualidade nutricional das folhas, ocasionando uma queda no ECC dos animais e afetando o desempenho reprodutivo dos mesmos (NABINGER,1997).

No Marajó as chuvas são persistentes e a divisão entre esses dois períodos é marcada pela diminuição desse fenômeno natural. Sendo, o tempo das águas compreendido entre dezembro a maio e o período seco entre junho a novembro. O índice pluviométrico nessa região varia de 2500 mm a 4000 mm de chuva (LIMA, 2005). Devido a esta característica singular do arquipélago marajoara, os rebanhos bubalinos criados nessa localidade conseguem manter o ECC durante o ano todo, sofrendo apenas pequenas variações durante o período de seca.

3.1.3. Nutrição

Nas regiões de baixa latitude e em que o fotoperíodo é constante, a alimentação é o principal fator que influencia na sazonalidade reprodutiva dos bubalinos. A baixa disponibilidade e qualidade de forragem faz com que esses animais passem a ter um gasto energético superior ao ganho de calorías, chamado balanço energético negativo, que afeta de modo danoso os aspectos reprodutivos dos búfalos (VALE, 2007).

O balanço energético negativo (BEN) faz com que haja a perda do ECC. Além disso, ocasiona um desequilíbrio metabólico prejudicial para a reprodução, como: a hipoglicemia, elevação da concentração dos hormônios de crescimento e alteração nos níveis de ácidos graxos (FILHO, 2010). Todos esses fatores proporcionam mudanças na dinâmica folicular, no tamanho do folículo, na qualidade oocitária, atrasam a ovulação e prejudicam o desenvolvimento folicular (WADE & JONES, 2004).

Portanto, o metabolismo peculiar desta espécie quando submetida a condições que não favorecem a categoria de doadoras, raça, estado metabólico, idade, condições climáticas e nutricionais podem ser associadas a resultados de *complexos cumulus oophorus* (CCOs) com qualidade inferior e conseqüente redução na taxa de fertilidade e de número de embriões (ARMSTRONG et al., 2001; WALSH et al., 2010; SENEDA et al., 2020).

3.2. OPU E PIVE EM BÚFALAS

A associação de biotecnologias como a OPU e PIVE buscam otimizar a produção de embriões em doadoras bubalinas selecionadas com o objetivo de melhoramento genético por meio de uma linhagem feminina (BONI et al., 1994; GASPARRINI, 2002; BARUSELLI et al., 2020). Todavia, alguns fatores importantes limitam o uso nesta espécie, como fatores intrínsecos: estado ovariano e uterino, número reduzido de folículos, a sazonalidade do oócito, qualidade e competência de desenvolvimento do mesmo, reduzida quantidade de número de COCs que podem ser recuperados por ovário, diâmetro folicular, estado nutricional, categoria animal, sêmen (touro) (GASPARRINI, 2002; OHASHI et al., 2003; GIMENES, 2010; DI FRANCISCO et al., 2012; BALDRIGHI et al., 2014; BARUSELLI et al., 2018; BARUSELLI et al., 2020).

Assim como, por fatores extrínsecos: frequência de aspiração; comprimento e diâmetro do bisel da agulha de punção, a pressão de vácuo da bomba de aspiração, pois a pressão pode comprometer a qualidade dos oócitos bubalinos, visto que a adesão das células do *cumulus* a zona pelúcida parece não ser tão forte como nos bovinos (BONI, 1994; DE CARVALHO et al., 2019; SAGHEER et al., 2020).

Para tentar tornar a PIVE uma técnica eficiente, há a necessidade de aperfeiçoamento em suas diferentes etapas, sendo o fator primordial a elaboração de meios mais adequados e específicos para os processos de cultivo dos gametas e embriões e de capacitação espermática (fundamental para o sucesso da fertilização). Seleção de animais que estejam em boas condições de manejo nutricional e sanitário são fatores que podem aprimorar e tornar esta biotécnica eficiente de uma forma que a associação de OPU com PIVE possa representar uma nova alternativa para a exploração da genética na espécie bubalina (OHASHI et al., 2006; MELLO et al., 2018; BARUSELLI et al., 2020).

3.3. TAXA DE RECUPERAÇÃO OOCITÁRIA EM BUFALAS

Nos últimos anos a PIVE em bubalinos passou por importantes modificações, conseguindo se aplicar a nível comercial. Entretanto, apesar das limitações, principalmente quando se trata em baixa função das taxas de produção dos embriões por doadora aspirada implicando diretamente no custo da prenhez (cerca de 3 a 4 vezes maior que em bovino zebuino), demonstra que ainda é frequente as restrições desta biotécnica

(OHASHI et al. 2017). Porém, ainda permitem uma vantagem há longo prazo, por ser uma atividade reprodutiva que pode ser repetida durante longo período de tempo possibilitando, desta maneira, um maior rendimento em relação a taxa embrionária das doadoras (LIANG et al., 2007; NEGLIA et al., 2011; PETROVAS et al., 2020).

Apesar da melhoria dos sistemas de produção de embriões nos últimos anos, a maior limitação para aplicação da técnica de OPU, seguida da PIVE em bubalinos tem sido a baixa taxa de recuperação de oócitos viáveis. Independentemente do método de coleta, o número de oócitos viáveis recuperados dificilmente ultrapassa duas estruturas por animal em bubalinos, fazendo com que este se torne um grande limitante para o processo de PIVE em larga escala nestes animais (DI FRANCESCO et al., 2012).

Outro fator que pode influenciar na qualidade e na competência oocitária é a fase do crescimento folicular durante a recuperação do oócito. Assim como o tamanho do folículo antral, no momento da aspiração, também podem melhorar os resultados da PIVE por aumentarem o número de oócitos disponíveis, os autores afirmaram que esta melhora ocorre quando folículos < 4 mm predominam (SIRARD et al., 1999; SENEDA et al., 2005; SENEDA et al., 2020).

Porém, ao se comparar o número de folículos recrutado por onda folicular nos bovinos e bubalinos, nota-se que o número é menor em búfalos (BARUSELLI et al., 1997; GIMESSES et al., 2010; CAMPANILE et al., 2010). Estudos indicam que o número de folículos primordiais pode variar de 10.000 a 12.000, sendo em torno de 10 vezes menor quando comparado com os bovinos (DANELL, 1987; MANIK et al., 2002). Tais fatores podem limitar o uso de TRAs e uma melhor compreensão da dinâmica folicular e da manipulação do ciclo estral é de fundamental importância para o desenvolvimento e melhoria dos resultados em OPU-PIVE para a espécie (BARUSELLI et al., 2020).

Alguns fatores extrínsecos como a pressão da aspiração, o tempo de coleta e processamento, a temperatura de transporte até o laboratório pode afetar a qualidade dos CCOs na OPU. A alta incidência de atresia (PALTA & CHAUHAN, 1998), o reduzido número de folículos primordiais (DANELL, 1987) e antrais (NEGLIA et al., 2011) e a baixa qualidade dos oócitos recuperados são os principais motivos em bubalinos para recuperação de reduzido número de estruturas utilizáveis no procedimento de PIVE. Essas características têm como consequência uma menor taxa de blastocisto e menor taxa de prenhez por aspiração folicular/doadora resultando na elevação do custo da gestação na espécie (GASPARRINI et al., 2014).

3.4. INFLUÊNCIA DO CORPO LÚTEO (CL) NA OPU

A principal estrutura ovariana, que pode ser usada para classificar a fase do ciclo estral de uma fêmea bovina é o CL, responsável pela liberação de progesterona (P4) que pode corresponder a uma fase do ciclo estral ou a gestação (PENITENTE-FILHO et al., 2014), afetando a função ovariana e o crescimento folicular, e, conseqüentemente, interferindo na quantidade e qualidade de oócitos para PIVE (PFEIFER et al., 2012).

Se não houver fertilização, ocorrerá a regressão do corpo lúteo, permitindo a maturação de outros folículos ovarianos. À medida que ocorre degeneração celular, o órgão diminui de tamanho, e passa a ser *corpo albicans*. Na fase de regressão em fêmeas bubalinas, o peso do corpo lúteo diminui um terço e o peso do corpo albicans equivale a um quarto do corpo lúteo maduro (EL-SHEIKH et al., 1967).

A presença ou ausência do CL na superfície ovariana têm se mostrado um critério de seleção macroscópico para recuperação de oócitos em bubalinos (EL-NABY et al., 2013) devido ao tamanho em que preenche grande parte do ovário. Contudo, os resultados com relação à influência do CL sobre a qualidade oocitária ainda são controversos (PENITENTE-FILHO et al., 2015), enquanto que os ovários de bovinos com e sem CL do mesmo animal não apresentaram diferenças com relação a parâmetros de recuperação e qualidade oocitária por morfologia convencional (SANTOS et al., 2017).

3.5. INFLUÊNCIA DO FOLÍCULO DOMINANTE NA OPU

O primeiro trabalho relacionado à dinâmica folicular durante o ciclo estral em búfalas foi realizado por Singh et al., (1984), que observaram a presença de estruturas ovarianas durante o ciclo estral em novilhas da raça Surti (MELLO et al., 2018). Um dos fatores que influenciam diretamente a quantidade e qualidade de oócitos obtidos por sessão de aspiração e, conseqüentemente, a competência para produção embrionária, é a fase do ciclo estral (MERTON et al., 2003; VASSENA et al., 2003). O estudo da dinâmica folicular nos diferentes momentos do ciclo estral pode ajudar a elucidar fenômenos envolvidos com procedimentos de sincronização do ciclo estral e ovulação, assim como na resposta ovariana de búfalas super ovuladas, colaborando para o aumento da fertilidade (SIQUEIRA et al., 2009).

O desenvolvimento folicular de fêmeas bovinas é realizado por meio de ondas foliculares. Em vacas é descrito a existência de três ondas de desenvolvimento folicular por ciclo. Todavia, isto não é uma regra, haja vista, que algumas fêmeas apresentam apenas duas ondas, enquanto outras apresentam quatro ondas (NOSEIR, 2003). Ao contrário da raça bovina zebuína, as búfalas apresentam um folículo ovariano inferior que de bovinos (~19.000 vs ~150.000, para búfalos e bovinos espécies respectivamente) (DANELL, 1987; SANTOS et al., 2013) e um número menor de folículos em cada onda de crescimento folicular (cerca de 5 -8) (BARUSELLI et al., 1997). Como consequência, a taxa de recuperação oocitária alcançadas pela OPU são geralmente mais baixas em búfalo (cerca de 14 vs 37 oócitos/animal para búfalo e espécie bovina, respectivamente (GIMENES, 2010).

Em bubalinos (MANJUNATHA et al., 2007) verificou-se que um folículo dominante é capaz de exercer efeitos negativos sobre folículos subordinados, como atresia folicular, e, conseqüentemente, sobre a qualidade dos oócitos contidos nesses folículos. Porém, Vassena et al., (2003), demonstraram que é desejável que os oócitos colhidos por OPU sejam provenientes de folículos em estágio inicial de atresia, uma vez que as alterações produzidas nestes são semelhantes às observadas no momento da ovulação.

3.6. INFLUÊNCIA DOS MEIOS DE CULTURA NA PIVE EM BÚFALAS

O ponto primordial na qualidade embrionária durante a PIVE é associado ao meio utilizado, o qual vai interferir como mimetização da tuba uterina da fêmea (MANTIKOU et al., 2013). Não é um processo simples um embrião se desenvolver até o estágio de blastocisto, se implantar e gerar uma prole saudável (SIRAD et al., 2006). A embriogênese começa após a fertilização, quando a entrada do espermatozoide no oócito desencadeia o início de desenvolvimento que foi programado durante a ovogênese (TELFORD et al., 1990).

Para o sucesso na preparação do cultivo *in vitro*, é extremamente necessário que as composições dos meios usados artificialmente sejam similares ao ambiente e aos fluidos do útero e do oviduto de uma vaca durante o início de uma gestação, sendo um dos pontos mais importantes para o desenvolvimento embrionário, que é dependente do suporte à nutrição celular, na relevância que os nutrientes, pH, hormônios e oxigênio

devem estar presentes nas mesmas quantidades ou aproximadas do ambiente uterino (FIGUEIREDO et al., 1997).

O meio mais utilizado atualmente para a etapa do cultivo *in vitro* é o fluido sintético de oviduto (SOF), suplementado com proteínas, substâncias energéticas, aminoácidos essenciais e não essenciais. Em geral, os meios utilizados para o cultivo embrionário são suplementados com uma fonte proteica tal como soro fetal bovino (SFB), soro sintético quimicamente definido (SSS), e albumina sérica bovina (BSA) (HOLM et al., 1999).

Algumas linhas de pesquisa em PIVE de bubalinos buscam o enriquecimento do meio de cultivo com antioxidantes para melhorar a produção de blastocistos (ANAND et al., 2008; SINGHAL et al., 2009), sendo relatadas taxas entre 7,7 a 30,9%. Porém, devido ainda ser utilizado o mesmo protocolo de PIVE de bovinos na espécie bubalina, as taxas de blastocisto e taxas de prenhez tornam-se ainda mais baixas, fato que pode ser explicado devido a não utilização de um protocolo específico para espécie e que consiga suprir todas as características da mesma (MARIN et al., 2019). Tronando-se necessário aprofundar mais o conhecimento sobre as particularidades da búfala para se alcançar resultados mais apropriados e estáveis.

As etapas da PIVE também sofrem variações, durante a maturação *in vitro* (MIV) apenas 5% dos oócitos chegarem a fase final de crescimento embrionário e o principal fator que pode impedir este desenvolvimento é o estresse oxidativo, o que pode ser causado pela maior tensão atmosférica de oxigênio (20%) que aumenta a produção de radicais livres de oxigênio (ROS), causando alterações celulares como dano mitocondrial, redução de ATP, dano de DNA, ruptura da membrana devido à peroxidação lipídica e apoptose (ABSALÓN-MEDINA et al., 2014; SHAHZAD et al., 2020).

Portanto, o fornecimento de condições ideais, com o intuito de conseguir um metabolismo celular mais parecido com o encontrado nos gametas *in vivo*, tem sido o objetivo de diversas pesquisas que tentam identificar alterações e comportamentos metabólicos que podem afetar diretamente a viabilidade dos CCO's durante a MIV (SHAHZAD et al., 2020; ABSALÓN-MEDINA et al., 2014). Contudo, já se sabe que a maturação em baixa tensão de oxigênio (5%) melhora a qualidade do oócitos bovinos e também o desenvolvimento de blastocistos (BERMEJO-ÁLVAREZ et al., 2010).

3.7. TAXA DE EMBRIÕES EM BÚFALAS NA PIVE

Ocorreu nos anos recentes um aumento de forma exponencial no número de embriões oriundos da PIVE, fazendo com que, pela primeira vez, o número de embriões desta biotécnica seja significativamente maior em comparação com o número de embriões produzidos *in vivo* em todo o mundo (IETS, 2017; SENEDA et al., 2020).

A primeira tentativa de associação de OPU-PIVE obtendo resultados promissores foi realizada por Boni et al. em 1994 e a partir do primeiro nascimento de bubalino por PIVE no Brasil (BARUSELLI & CARVALHO, 2005), foram realizadas incontáveis publicações a cerca destas biotécnicas e demonstrando os efeitos que diferentes protocolos e meios podem ocasionar sobre o desenvolvimento de oócitos e embriões (OHASHI et al., 2006; MONDADORI et al., 2010; OBA & CAMARGOS, 2011; MELLO et al., 2018).

Publicações estas que trouxeram como resultados altas taxas de maturação (80%), umas moderadas taxas de clivagem (50%) e taxas baixas de formação de embriões (20%) das vacas doadoras bubalina (SURESH et al., 2009). Porém, os dados ainda são bastante contraditórios em relação a eficiência da técnica, demonstrando a existência de bons resultados enquanto outros não (SINGHAL et al., 2009; OBA & CAMARGOS, 2011; FERRAZ et al., 2008; KUMAR et al., 2015; BHARDWAJ et al., 2016; FU et al., 2016; PEREIRA et al., 2016; OHASHI et al., 2017; MELLO et al., 2018).

Pesquisadores italianos confirmam a produção de um embrião por sessão de OPU, em coletas realizadas uma ou duas vezes por semana, ao longo do ano, apesar da sazonalidade (GALLI et al., 2010). Ohashi et al., (2017) em programa reprodutivo, no estado do Pará, em 2003, realizou um estudo comparativo entre bovinos da raça nelore e bubalinos mestiços, de modo que na espécie bubalina das 103 búfalas aspiradas e com 20 sessões de aspiração a produção embrionária se restringiu a um total de 19 embriões produzidos (0,18 embriões/ búfala) e com resultado negativo para gestação.

Em estudos realizados por Marin et al., (2019), obtiveram uma alta variabilidade individual na produção de embriões (0-3,5 embriões/animal/OPU), sugerindo que as condições e meios de cultura utilizados atendem adequadamente às necessidades de alguns indivíduos, mas podem ser insuficientes para atender às circunstâncias particulares de outros animais mantidos mesmo sob as mesmas condições de manejo. Através da seleção das doadoras feita com referência à taxa média de produção de embriões, foi possível aumentar a produção média de embriões de 0,7/animal/OPU para 1,2

embriões/animal/OPU. Assim, a seleção de indivíduos com base em taxas de produção de blastocistos acima da média pode ser uma estratégia válida para aumentar as taxas de produção de embriões, tornando os programas de melhoramento genético nas espécies bubalinas que utilizam a PIVE viável como ferramenta.

3.8. INFLUÊNCIA DE DIFERENTES TOUROS NA PIVE

A escolha dos doadores de sêmen assim como das matrizes apresenta papel importante na seleção de um bom touro para bons resultados na PIVE (OHASHI et al., 2017). A qualidade desigual do sêmen de búfalo é um importante fator de variação nos resultados (GALLI et al., 2010). No entanto, nos últimos anos, a preparação de sêmen congelado aumentou, resultando em taxas de fertilização *in vitro* (FIV) com níveis semelhantes aos de bovinos. O perfil do macho bubalino deve ser avaliado para otimizar a concentração espermática necessária durante a FIV, maximizar as taxas de fertilização (LU et al., 2007; LIANG et al., 2008).

Ferraz (2008), realizou um estudo comparativo entre diferentes touros utilizados na PIVE, de forma que o sêmen congelado de um mesmo touro e mesma partida fossem analisados no processo, sendo avaliado o desempenho de dois touros neste estudo. A análise se deu a partir das taxas de clivagem e produção embrionária de cada reprodutor, obtendo taxa de clivagem igual a 40% e produção de 24 embriões a partir de 126 oócitos, sendo 18 embriões do reprodutor A e seis embriões do reprodutor B, representando 28,6% e 9,1% (A=18/63 e B=6/ 66).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. LOCAL DOS EXPERIMENTOS

O projeto intitulado “Produção *in vitro* de embriões bubalinos” foi aprovado pela comissão de ética (CEAU N° 1351070918), através da Portaria N° 009/2020/ICB/UFPA, cuja vigência foi de novembro de 2019 a dezembro de 2021 e utilizado como base para pesquisa desenvolvida no Arquipélago do Marajó.

O local da OPU foi em uma fazenda localizada na Ilha do Marajó no Município de Cachoeira do Arari (Fazenda Paraíso), a uma latitude 01°00'41" sul e longitude 48°57'48" oeste, estando a uma altitude de 20 metros do nível do mar.

O laboratório de Fertilização *in vitro* foi instalado Escola de Ensino Técnico do Estado do Pará (EETEPA), localizada na Mesorregião do Marajó no município de Salvaterra, distante 46 km da Fazenda Paraíso, local de realização da PIVE.

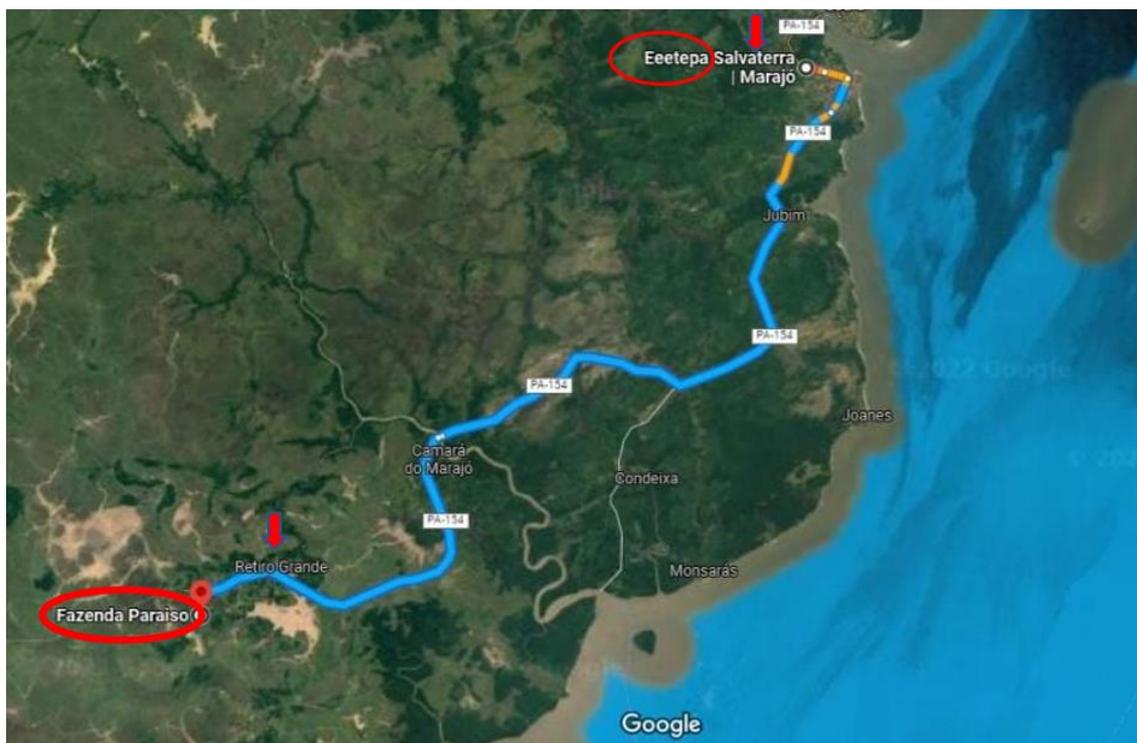


Figura 1. Localização geográfica da Fazenda Paraíso em Cachoeira do Arari e do Laboratório de Fertilização *in vitro* em Salvaterra, ambos pertencentes a Mesorregião do Marajó.

4.2. MANEJO SANITÁRIO E ALIMENTAR DOS ANIMAIS

As fêmeas (doadoras e receptoras) e os machos (doadores de sêmen) bubalinos foram submetidos (as) a um controle sanitário rigoroso, com exames de tuberculose e brucelose, além de vacinas para IBR, BVD, leptospirose e aplicação de antibióticos, a fim de evitar a contaminação dos oócitos (gameta feminino) e aumentar a produção de embriões e a taxa de prenhez.

Os animais foram mantidos em sistema semiextensivo de confinamento (as fêmeas passam por ordenhas diárias e os machos ficam separados à campo), a alimentação é por meio da disponibilidade de pastagem nativa e BRS Capiaçú, ração duas vezes ao dia, com acesso à água “*ad libitum*”, mineralização adequada, além de suplementação, durante todo o ano.



Figura 2. BRS Capiaçú plantado para ser utilizado para produção de silagem; B: preparação do Silo; C: Abertura do primeiro Silo de BRS Capiaçú, com assistência ATeG leite Parceria entre SENAR/FAEPA na Fazenda Cachoeira do Arari no Marajó.

4.3. ASPIRAÇÃO FOLICULAR (OPU) E PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES (PIVE)

4.3.1. Seleção das vacas doadoras de oócitos

A partir do banco de dados da Associação Paraense e Criadores de Bubalinos, 200 vacas doadoras de oócitos foram pré-selecionadas a partir dos seguintes critérios: com média de produção de leite acima da média para o município, com adaptabilidade as condições climáticas (termotolerantes e ao mesmo tempo, produtivos). Após esta seleção as fêmeas passaram por exame clínico e ginecológico para avaliação das características

reprodutivas, através de palpação retal e ultrassonografia, onde foram selecionadas as que apresentaram ovários (acima de 2,5 cm de comprimento x 1,5 cm de largura) e população folicular acima da média do rebanho (com folículos antrais acima de dez por ovário). Ao final da avaliação, foram selecionadas 40 fêmeas doadoras de oócitos, com idade entre três a seis anos e peso corporal médio de 500 Kg.

4.3.2. Aspiração folicular - *Ovum pick-up* (OPU)

As sessões de OPU foram realizadas com aparelho portátil de ultrassom equipado com transdutor endocavitário micro convexo de 5,0 MHz, adaptada a uma guia de biopsia para aspirar os folículos e conectado uma agulha descartável de 18G (40x08) e linha de aspiração de teflon de 1,7 mm de diâmetro interno e 80 cm de comprimento, conectados a um recipiente para coleta de oócitos (tubos cônicos de centrifuga de 50 ml). Esse sistema foi acoplado a uma bomba de vácuo portátil, calibrada e regulada com pressão negativa de 50 mmHg.

No momento da aspiração, após a contenção da vaca bubalina em brete apropriado, foi administrado a anestesia epidural com cloridrato de lidocaína 1% administrando 2,0 a 3,0 ml entre a última vértebra coccígea e a primeira vértebra caudal.

Após anestesia e higienização da genitália externa do animal, o braço do operador foi mantido posicionado no reto do animal evitando assim a entrada de ar pela ampola retal, que dificultaria o processo de aspiração. Com isso o ovário foi palpado, isolado e separado de outros tecidos para evitar perfuração acidental, logo após isso o transdutor foi introduzido na vagina até alcançar o fundo do saco vaginal ao lado correspondente ao ovário acessado. Por meio da palpação transretal o ovário foi colocado na mesma direção do transdutor para que os folículos fossem visualizados pelo ultrassom e puncionados por meio da agulha. Sendo acionada a pressão negativa a vácuo para aspirar todos os folículos visíveis. Ao término de cada aspiração o tubo coletor foi trocado e enviado ao laboratório para realização do rastreamento e seleção dos gametas viáveis.

4.3.3. Recuperação e seleção dos *complexos cumulus oophorus* (CCOs)

Após a aspiração, os tubos de polipropileno foram encaminhados ao laboratório local e o aspirado folicular foi depositado em copos coletores para serem submetidos a

sucessivas lavagens com solução salina fosfatada tamponada (PSB) para remoção principalmente do sangue e de possíveis contaminantes. Em seguida o material foi depositado em placas de petri de poliestireno (60mm) para rastreamento e seleção dos CCOs, onde foram selecionados os que apresentaram células compactas e refringentes, citoplasma homogêneo e sem vacúolos ou grânulos escurecidos. Este procedimento realizou-se com auxílio de estereomicroscópio e sob fluxo laminar e os CCOs foram selecionados em Meio de cultura de TCM199 (tampão Hepes) acrescido 10% de SFB (v/v), 22g/mL de piruvato e 50g/mL de gentamicina.

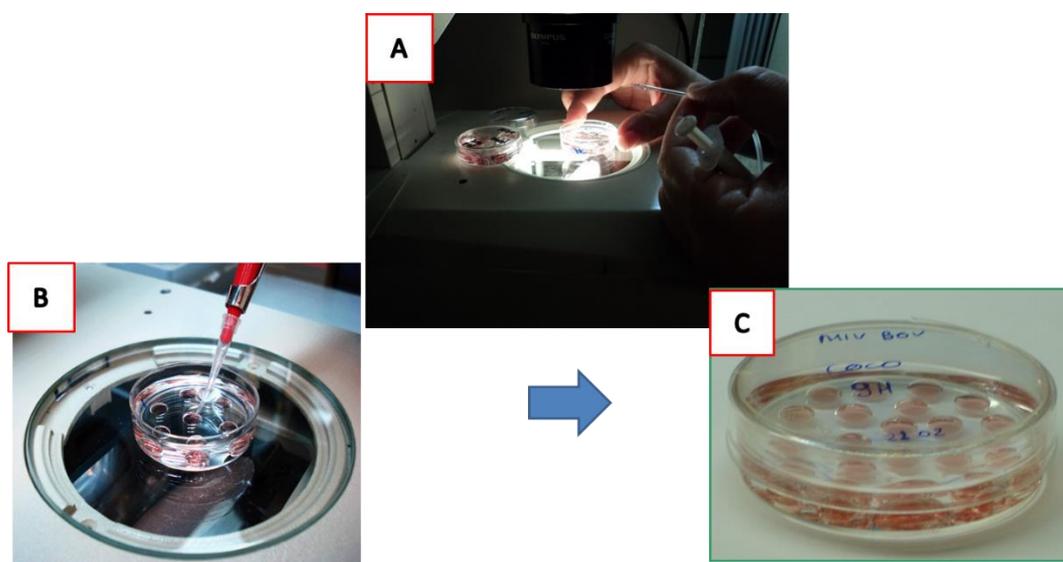


Figura 3. A: Rastreamento; B: seleção dos CCOs realizado com auxílio de lupa estereoscópica; C: os CCOs foram incubados, em gotas de 100 μ L de meio de MIV em placas de petri de 35 mm sob óleo mineral estéril.

4.3.4. Maturação *in vitro* (MIV)

Para a MIV os CCOs selecionados foram lavados e incubados em gotas de 100 μ L de meio de BOTUFIV MIV[®] (BOTUPHARMA), suplementado com 10% SFB (v/v). A incubação foi feita em placas de petri de 35mm de poliestireno em microgotas, sob óleo mineral estéril, por um período de 20 horas, em estufa de cultivo de baixa tensão de O₂ (Labmix[®]): com 5% de CO₂, 5% de O₂ e 75% de N₂ sob atmosfera úmida e temperatura de 38,5 °C.

4.3.5. Fecundação *in vitro* (FIV)

Ao término das 20 horas de MIV, para a FIV utilizou-se sêmen congelado, os quais foram criopreservados durante o experimento utilizando-se touros da própria fazenda. Tais machos foram testados quanto a PTA (produção de leite) e DEP (ganho de peso da progênie). O método de separação dos espermatozóides (SPTZ) dos crioprotetores e plasma seminal foi o gradiente de densidade descontínuo de Percoll[®]. A palheta (0,25 mL) de sêmen foi descongelada em água a 38,5 °C durante 30 segundos. Em seguida, o sêmen foi depositado sobre a coluna de 2mL de gradientes de Percoll (45% e 90%) e centrifugado (600g) por 7 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o pellet lavado em 800 µl de meio de fecundação BOTUFIV FIV[®] (BOTUPHARMA), por centrifugação a 600 g durante 3 minutos para remoção dos resíduos de percoll.

Após as lavagens, a concentração espermática foi determinada com auxílio de uma câmara de Neubauer, e ajustada para 2×10^6 SPTZ/mL. Os espermatozóides foram colocados em gotas de 80 µl de meio de BOTUFIV FIV[®], junto com os CCOs (20 a 25 por gota). Oócitos e espermatozóides permaneceram co-incubados em placas de petri de 35mm sob óleo mineral estéril, sob atmosfera controlada em estufa de cultivo de alta tensão de O₂ (HF 212 UV[®]): com 5% de CO₂, 20% de O₂ e 75% de N₂ sob atmosfera úmida e temperatura de 38,5 °C, por um período de aproximadamente 24 horas.

4.3.6. Cultivo *in vitro* (CIV)

Após 24 horas de FIV os prováveis zigotos foram submetidos a sucessivas pipetagens para retirada das células do *cumulus oophorus* restantes e dos espermatozóides aderidos à zona pelúcida e então transferidos para gotas contendo o meio de BOTUFIV SOF[®] (BOTUPHARMA), suplementado com 10% SFB (v/v). Para dar suporte ao desenvolvimento embrionário foi realizado um sistema de co-cultivo dos embriões com monocamada de células do *cumulus oophorus* que aderiram à placa durante a MIV. Para isso, logo após a FIV, a placa de MIV teve seu meio substituído por 100 µl de meio de cultivo embrionário, onde os possíveis zigotos permaneceram incubados em estufa, nas mesmas condições utilizadas na MIV, até completarem o sexto dia de cultivo, onde foram realizadas as contagens de embriões formados e classificá-los quanto o estágio de

desenvolvimento para posteriormente realizarmos a transferência dos embriões para vacas bubalinas receptoras.

4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores obtidos com a PIVE foram testados quanto a distribuição normal e submetidos a análise de variância (ANOVA), com o pós-teste adequado sugerido pelo software, adotando-se o nível de significância de 5%, através do programa SigmaPlot 14.0 (SIGMAPLOT, 2017).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. OPU E PIVE

5.1.1. Quantitativo de aspirações (OPU) de búfalas submetidas a PIVE

Os dados obtidos após 05 OPU's que ocorreram durante o período de janeiro de 2021 a janeiro de 2022 na Ilha do Marajó, referente às características de quantidade de aspirações (05); número de vacas aspiradas (86); estação do ano (período chuvoso e período seco); folículos aspirados (970); média de folículos por vaca ($12,00 \pm 05,05$); CCOs rastreados (552); média de CCOs por vaca ($6,84 \pm 4,31$); número de embriões produzidos (43); média de embriões por vaca ($0,72 \pm 0,54$) e número de embriões produzidos (43) submetidas a PIVE, encontram-se descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Número de aspirações, n° de búfalas, pluviosidade, n°folículos aspirados, média de folículos por vaca, oócitos rastreados, média de oócitos por vaca, embriões produzidos, média de embriões por vaca e embriões produzidos de búfalas submetidas a PIVE no Marajó.

| N° OPU/Variáveis | 01 | 02 | 03 | 04 | 05 | Total |
|-------------------------|---------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|----------------------------|-------------------------------------|
| N° vacas | 18 | 24 | 19 | 14 | 11 | 86 |
| Sazonalidade | Chuvoso (janeiro/2021) | Chuvoso (março/2021) | Seco (setembro/2021) | Seco (outubro/2021) | Chuvoso (janeiro/ 2022) | - |
| Folículos aspirados | 156 | 308 | 237 | 154 | 115 | 970 |
| Média de folículos/vaca | $10,4 \pm 3,52$ | $12,83 \pm 5,35$ | $12,47 \pm 4,44$ | $11,00 \pm 4,54$ | $10,45 \pm 7,51$ | $12,00 \pm 05,05$ |
| Oócitos rastreados | 100 | 169 | 127 | 110 | 46 | 552 (56,91%) |
| Média de oócitos/vaca | $6,67 \pm 3,29$ | $7,04 \pm 4,80$ | $6,68 \pm 3,67$ | $7,86 \pm 6,72$ | $4,18 \pm 2,93$ | $6,84 \pm 4,31$ |
| N° Embriões | 14/54 (25,92%) | 0/33 (0%) | 17/58 (29,31%) | 05/53(9,43%) | 07/28 (25,00%) | 43/226 (19,03%) |
| Média de embrião/vaca | $0,93 \pm 1,16$ | 0 | $0,89 \pm 1,33$ | $0,36 \pm 0,63$ | $1,40 \pm 0,55$ | $0,72 \pm 0,54$ |
| Embriões produzidos | 14 | 0 | 17 | 5 | 07 | 43 |

A partir dos resultados descritos na tabela 01, verificou-se que os dados referentes a folículos aspirados de 970, CCOs rastreados de 552 (56,91%) e número de embriões produzidos de 43/226 (19,03%) corroboram com os achados de Ohashi et al., (2017), que obtiveram 903, 549 (57,65%) e 39/365 (10,68%). A proximidade dos dados pode ser

justificada devido utilizarmos o mesmo tipo de seleção de doadoras, através de exames de imagens ultrassonográficas onde foram selecionadas fêmeas bubalinas que apresentaram tamanho ovariano acima de 2,5 cm x 1,5 cm (comprimento x largura) e um número de folículos antrais acima de dez por ovário, o que demonstra que a seleção de doadoras é de fundamental importância para se obter melhores taxa na PIVE e não demonstrando tanta variabilidade de resultado ao se utilizar as mesmas condições de cultivo e de laboratório, mesmo que tenham sido feitos em diferentes condições climáticas.

Segundo Manjunatha et al., (2009), são descritas taxas de recuperação em bubalinos que variam entre 42,0 e 69,5%, estando de acordo com o encontrado no experimento (56,91%) com média de média de CCOs por vaca de $6,84 \pm 4,31$ em diferentes períodos climáticos: chuvoso (favorável) e seco (desfavorável). No entanto, médias inferiores foram descritas por Shahzad et al., (2020), que ao compararem os dois períodos obtiveram média de recuperação oocitária de $2,31 \pm 0,10$ vs $3,65 \pm 0,27$, respectivamente. A recuperação oocitária de qualidade continua sendo um entrave para potencializar as variáveis de OPU/PIVE, o que pode ser explicado devido ao fato dos oócitos serem recuperados em dias aleatórios do ciclo estral, fazendo com que folículos de diferentes estágios sejam aspirados e conseqüentemente trazendo CCOs de má qualidade (DE WIT et al., 2000; SENEDA et al., 2020). Segundo Baruselli et al., (2020), ao avaliarem a baixa qualidade oocitária em búfalos a correlacionaram a uma frágil conexão entre o oócito e células da granulosa e fato não é observado na espécie bovina.

Gimenes et al., (2015), analisaram o efeito da fase da onda folicular sobre a eficiência da PIVE em 3 espécies distintas: Búfalo, Nelore (*Bos indicus*) e Novilhas da raça Holandesa (*Bos taurus*), sincronizadas farmacologicamente e submetidas a OPU nos dias 1, 3 e 5 após a emergência da onda folicular e não ocorrendo diferença estatística do dia da onda folicular na eficiência da OPU-PIVE, em relação a porcentagem de oócitos recuperados ($70,5\% \pm 3,1$, $75,0\% \pm 3,1$, $76,0\% \pm 3,2$, respectivamente) e a taxa de recuperação oocitária também não foi afetada pelo grupo genético (*Bos indicus*: $82,3 \pm 2,5$, *Bos taurus*: $66,8 \pm 2,8$, *Bubalus bubalis*: $72,5 \pm 3,6$; $P = 0,07$).

Demonstrando que o procedimento é menos eficiente em novilhas bubalinas e holandesas do que em novilhas Nelore, possivelmente devido ao número de folículos e tornando tais resultados relevantes para demonstrar o fato de que as novilhas taurinas e bubalinas apresentaram taxas semelhantes, ou seja, bem abaixo do observado em zebuínos. Outro fator relevante é que as búfalas possuem um tamanho de folicular

intermediário quando comparadas com o *Bos indicus* (apresentam maior número de folículos recrutados e maior diâmetro do folículo dominante) (SARTORI e BARROS, 2011; BARUSELLI et al.,2020).

5.1.2. Efeito do período mais chuvoso e menos chuvoso na taxa de recuperação oocitária

No decorrer das 05 aspirações, onde 03 ocorreram em período chuvoso e 02 em período seco, as médias de número de folículos aspirados ($11,75 \pm 5,23$), de folículos por animal ($11,23 \pm 1,39$), de CCOs rastreados ($6,65 \pm 4,54$) e de CCOs rastreados por animal ($5,96 \pm 1,56$) durante o período chuvoso não diferiram estatisticamente ($p > 0,05$) das respectivas médias também analisadas e comparadas, as quais foram: $12,47 \pm 4,86$; $11,74 \pm 1,04$; $5,87 \pm 3,68$ e $5,31 \pm 2,83$, porém no período de estação climática seco, conforme demonstrado na figura 4.

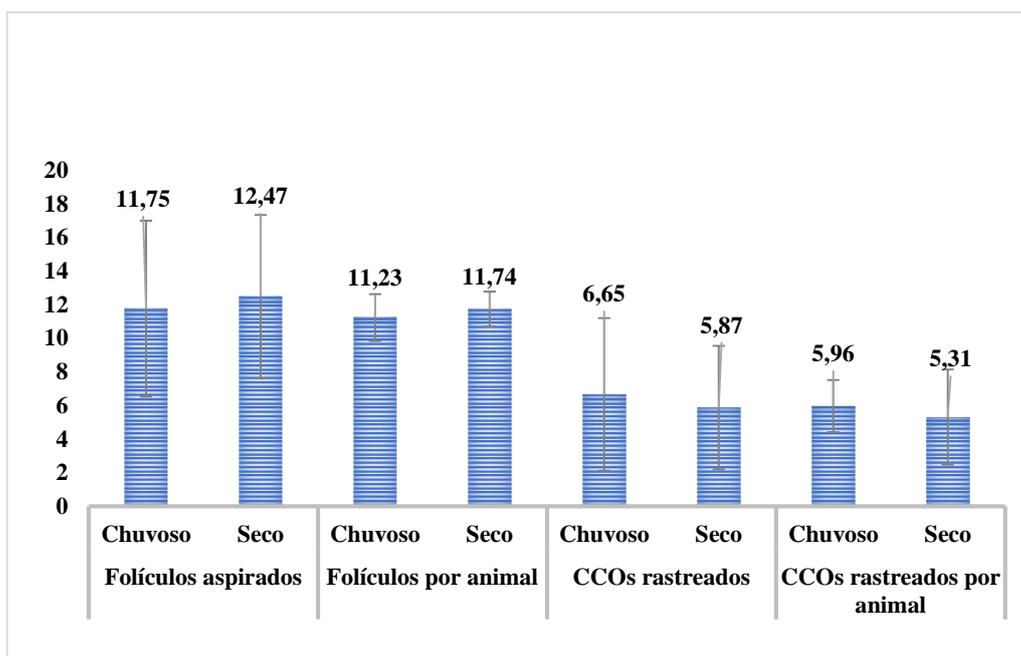


Figura 4. Efeito do período climático, recuperação de folículos e oócitos aspirados e rastreados na OPU de bubalinos na Região do Marajó.

Nossos resultados de folículos aspirados ($11,75 \pm 5,23$), e de CCOs rastreados por animal ($5,96 \pm 1,56$) no período chuvoso e $12,47 \pm 4,86$; $5,31 \pm 2,83$, respectivamente no período seco são similares com os relatados pela equipe de Di Francesco et al., (2012), onde documentaram que a estação do ano também não teve efeito sobre população folicular em búfalos mediterrâneos italianos, com resultados de folículos aspirados (4,76

$\pm 0,27$), e de CCOs rastreados por animal ($2,31 \pm 0,11$) no período inverno e $4,68 \pm 0,22$; $2,24 \pm 0,11$, respectivamente no verão. Os autores justificaram tais dados pelo fato da estação do ano está em um período de transição, o que reflete no padrão reprodutivo de búfalos expresso *in vivo* nas mesmas condições italianas.

Corroborando também, Torres (2018), afirmou que o búfalo apesar de ser um animal poliétrico estacional de dias curtos, quando estão presentes na zona equatorial e em regiões com latitude mais baixas eles se comportam como poliétrico contínuos com ciclos regulares de duração de 21 dias, em média, que podem variar dependendo do manejo, clima, alimentação e genética.

Em relação aos nossos resultados obtidos podemos destacar as características climáticas atípicas da região do Marajó, onde o tempo das águas está compreendido entre dezembro a maio e o período seco entre junho a novembro. No entanto, durante o decorrer das 05 sessões de OPU/PIVE, as chuvas foram intensas e persistentes e a divisão entre esses dois períodos ficou prejudicada, fazendo com que os rebanhos bubalinos conseguissem manter o ECC durante o ano todo, sofrendo apenas pequenas variações durante o período de seca, o que pode esclarecer não ter ocorrido diferença estatística entre os períodos climáticos avaliados. Portanto, a influência das concentrações pluviométricas regional atípicas durante o estudo, disponibilizando forragens, com insignificativas variações no período menos chuvoso. Pois, de acordo com Ribeiro (1996) e Ribeiro, et al (1997) as concentrações pluviométricas favorecem positivamente na eficiência reprodutiva e produtiva de búfalas criadas na Amazônia.

Na Amazônia a bubalinocultura ocorre em criações extensivas de terra alagadas sazonalmente (várzeas) e nas criações de firme (terras altas). Na várzea o manejo sofre influencias da hidrografia do rio Amazonas e seus afluentes e nas criações de terra firme efeitos indiretos da chuva. (RIBEIRO, (2021).

Baruselli et al, (2020), afirmaram também que em climas tropicais, a estação do ano possivelmente não afeta de maneira negativa a qualidade do oócito e a fertilidade na espécie bubalina. Por outro lado, Manjunatha et al. (2009), reportaram que sazonalidade em diferentes condições climáticas em búfalos indianos, pode afetar as taxas de OPU/PIVE, segundo os autores, relataram diferença estatística no número folículos aspirados e na taxa de recuperação oocitária. Na região de Pirassununga, sudeste do Brasil, Silva (2020) comparando as estações climáticas favoráveis e desfavoráveis em búfalos, encontrou diferença estatística, nas mesmas variáveis do nosso estudo.

Neste contexto, Sagheer et al., (2020), concluíram que tais achados ainda não esclarecem se a foto periodicidade ou outros fatores afetam a população folicular durante a OPU, e se são influenciadas pelas estações reprodutivas favoráveis e desfavoráveis em búfalos. Porém, destacam a importância de mais estudos acerca da competência oocitária durante as diferentes estações para confirmar esses achados (BARUSELLI et al., 2020).

5.1.3. Efeito da presença do corpo lúteo e do maior folículo dominante na PIVE

Comparando-se os resultados de média e desvio padrão da influência da presença ou ausência do corpo lúteo e de folículo dominante em relação a quantidade de folículos aspirados, número de CCOs aspirados, número de CCOs para FIV e número de CCOs viáveis notou-se que não houve diferença estatística entre as variáveis analisadas ($p>0,05$), de acordo com a tabela 2.

Em relação a presença de folículo dominante as médias foram: $11,47\pm 4,26$; $6,53\pm 3,36$; $2,97\pm 1,75$ e $0,90\pm 1,79$ e com ausência os valores passaram a ser: $11,85\pm 5,57$; $6,73\pm 5,16$; $3,87\pm 3,25$ e $1,19\pm 1,68$ para as análises de quantidade de folículos aspirados, número de CCOs aspirados, número de CCOs para FIV e número de CCOs viáveis que foram para FIV respectivamente.

Em relação a presença de corpo lúteo as médias foram: $11,52\pm 4,42$; $6,70\pm 5,24$; $3,46\pm 3,03$ e $1,33\pm 1,51$ e com ausência os valores passaram a ser: $11,84\pm 5,56$; $6,63\pm 4,11$; $3,59\pm 2,69$ e $0,92\pm 1,84$ para as análises de quantidade de folículos aspirados, número de CCOs aspirados, número de CCOs para FIV e número de CCOs viáveis que foram para FIV respectivamente.

Tabela 2. Influência da presença ou ausência do corpo lúteo e de folículo dominante na quantidade de folículos e oócitos aspirados nas sessões de OPU's no Marajó.

| Variáveis/FD e CL | Folículos aspirados | CCOs rastreados | CCOs para PIVE | CCOs viáveis |
|-------------------------------|---------------------|-----------------|----------------|----------------|
| Com folículo dominante | $11,47\pm 4,26$ | $6,53\pm 3,36$ | $2,97\pm 1,75$ | $0,90\pm 1,79$ |
| Sem folículo dominante | $11,85\pm 5,57$ | $6,73\pm 5,16$ | $3,87\pm 3,25$ | $1,19\pm 1,68$ |
| Com corpo lúteo | $11,52\pm 4,42$ | $6,70\pm 5,24$ | $3,46\pm 3,03$ | $1,33\pm 1,51$ |
| Sem corpo lúteo | $11,84\pm 5,56$ | $6,63\pm 4,11$ | $3,59\pm 2,69$ | $0,92\pm 1,84$ |

Na literatura são raros os achados que correlacionam a influência do folículo dominante e do corpo lúteo para as variáveis acima analisadas para bubalinos. No entanto, a fase do ciclo estral é bastante estudada como sendo um dos fatores que influenciam diretamente a quantidade e qualidade de oócitos obtidos por sessão de aspiração e, conseqüentemente, a competência para produção embrionária (MERTON et al., 2003; VASSENA et al., 2003), já que o estudo da dinâmica folicular nos diferentes momentos do ciclo estral pode ajudar a elucidar fenômenos envolvidos com procedimentos de sincronização do ciclo estral, colaborando para o aumento da fertilidade (SIQUEIRA et al., 2009).

No entanto, Manjunatha et al., (2007), verificaram que o folículo dominante em bubalinos é capaz de exercer efeitos negativos sobre folículos subordinados, como atresia folicular, e, conseqüentemente, sobre a qualidade dos oócitos contidos nesses folículos. A presença ou ausência do CL na superfície ovariana têm se mostrado um critério de seleção macroscópico para recuperação de oócitos em bubalinos (EL-NABY et al., 2013) devido ao tamanho em que preenche grande parte do ovário. Contudo, os resultados com relação à influência do CL sobre a qualidade oocitária ainda são controversos (PENITENTE-FILHO et al., 2015), enquanto que os ovários de bovinos com e sem CL do mesmo animal não apresentaram diferenças com relação a parâmetros de recuperação e qualidade oocitária por morfologia convencional (SANTOS et al., 2017).

Tais fatos não foram evidenciados em nossas análises, pois as variáveis relacionadas não apresentaram diferença estatística com ou sem a presença do FD e o mesmo se aplicou a presença ou não de CL, o que pode ser explicado pela seleção prévia das doadoras em relação a tamanho de ovário (acima de 2,5 cm x 1,5 cm) e contagem de folículos (acima de dez por ovário) ao exame ultrassonográfico.

5.1.4. Influência do escore da condição corporal (ECC) na recuperação oocitária da PIVE

Para verificar se o ECC (adotando-se uma escala de 1 a 5, em que 1 é o menor escore e 5 o maior) influenciou na quantidade de folículos aspirados, número de CCOs aspirados, número de CCOs para FIV e número de CCOs viáveis que foram para FIV foram separados dois grupos. O primeiro grupo apresentando ECC maior que 3 e o segundo com ECC menor ou igual a 3 e após análise estatística os grupos não

apresentaram diferença estatística ($p>0,05$) entre nenhuma das variáveis comparadas (figura 5).

Em relação ao ECC maior que 3 as médias foram: $13,33\pm 06,72$; $07,00\pm 06,34$; $03,58\pm 03,83$ e $01,42\pm 02,04$ e com ECC menor ou igual a 3 os valores passaram a ser: $11,23\pm 04,31$; $06,46\pm 03,76$; $3,48\pm 02,40$ e $1,11\pm 01,70$ para as análises de quantidade de folículos aspirados, número de CCOs aspirados, número de CCOs para FIV e número de CCOs viáveis que foram para FIV respectivamente.

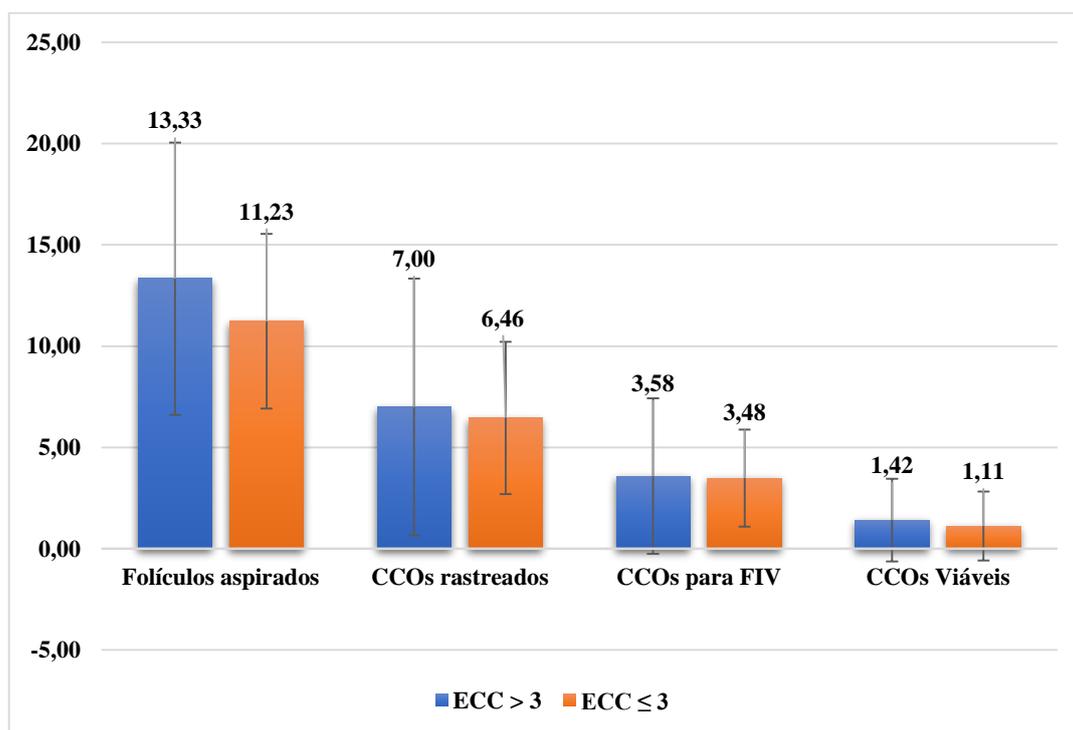


Figura 5. Influência do ECC na quantidade de folículos e oócitos aspirados nas sessões de OPU's no Marajó.

O ECC não influenciou na quantidade de folículos aspirados, número de CCOs aspirados, número de CCOs para FIV e número de CCOs viáveis que foram para FIV, podendo-se justificar pelo tipo de manejo nutricional que é adotado na propriedade (forragem de boa qualidade, silagem, mineralização e disponibilidade de sal mineral o ano todo), outro fato que também ajudou a não deixar diminuir o ECC foram as chuvas constantes (com mais frequência no período chuvoso e com menos frequência no período seco), mas que foram responsáveis por manter a disponibilidade de pastagens nativas cultiváveis durante todo o período do experimento para os animais.

Ribeiro, et al (1997), revisando os efeitos fisiológicos da subnutrição sobre o anestro pós-parto reportaram que a moderada condição corporal, interfere com o mecanismo de maturação final do folículo ou ovulação, enquanto que uma deficiência

mais pronunciada pode afetar o mecanismo de regulação do tamanho e dinâmica do crescimento e regressão do folículo dominante e que a severa subnutrição pode resultar na ausência de folículos maiores de 5.0 mm em diâmetro. Ribeiro (2020), publicou que o intervalo de escore corporal de 3,0 a 3.75 (na escala de 1.0 a 5.0) apresentaram os maiores índices de prenhez, em búfalas inseminadas em tempo fixo, na Amazônia. De acordo com (ARMSTRONG et al., 2001; WALSH et al., 2010; SENEDA et al., 2020), além das condições nutricionais, a categoria de doadoras, raça, estado metabólico, idade, condições climáticas podem ser associadas a resultados de CCOs com qualidade inferior e consequente redução na taxa de fertilidade e de número de embriões.

Assim como, o balanço energético negativo (BEN) faz com que haja a perda do escore de condição corporal (ECC). Além disso, ocasiona um desequilíbrio metabólico prejudicial para a reprodução, como: a hipoglicemia, elevação da concentração dos hormônios de crescimento e alteração nos níveis de ácidos graxos (FILHO, 2010).

5.1.5. Influência da época mais e menos chuvosa na Ilha de Marajó.

Para avaliar a influência do período climático sobre a taxa de produção de embriões bubalinos, dividiu-se os dados entre períodos chuvoso e seco. No chuvoso foram produzidos 21/115 embriões (25,25%±0,64%) e no seco 22/111 embriões (19,37%±14,06%). Totalizando 43 embriões produzidos, porém não houve diferença estatística ($p>0,05$) entre os parâmetros analisados (figura 6).

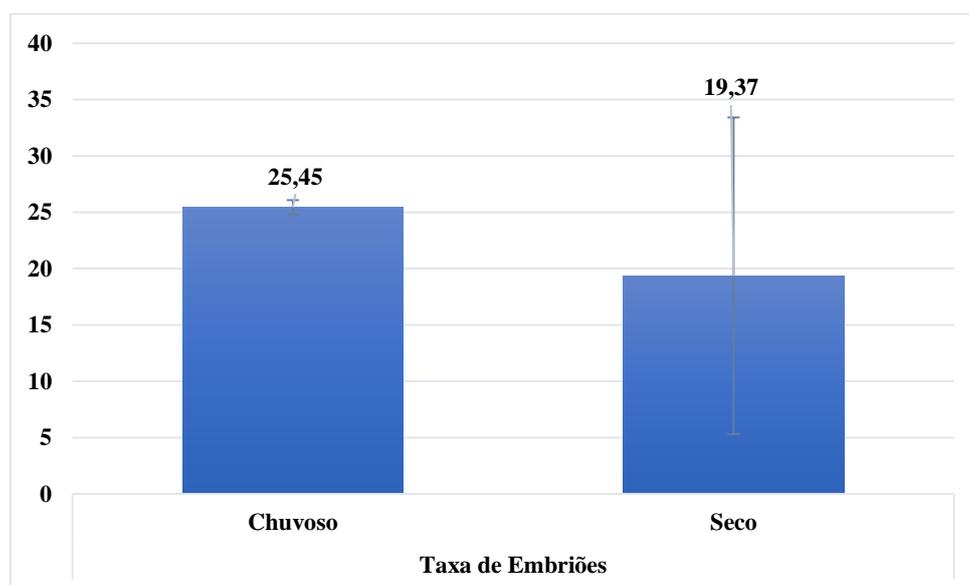


Figura 6. Influência da época mais e menos chuvosa, sobre a taxa de produção de embriões, de acordo com o período estudado, cachoeira do Arari, Ilha do Marajo - PA.

Nossos resultados não demonstraram diferença estatística sobre a taxa média de produção de embriões bubalinos entre períodos chuvoso ($25,25\pm 0,64\%$) e seco ($19,37\pm 14,06\%$), corroborando com os achados de SILVA (2020), que também apresentaram resultados semelhantes (sem diferença estatística) no período favorável (23,7%) e desfavorável (30,9%) em búfalas confinadas no estado de São Paulo. Resultados contraditórios aos nossos foram relatados por Di Francisco et al., (2012), de que a produção de embriões foi maior no outono (30,9%) em comparação com os outros dois períodos testados, na primavera-verão (13,3%) e no período de transição (10,3%) em búfalas criadas em latitudes italianas.

Podemos relacionar os resultados de nossa equipe em relação a taxa de embriões nos diferentes períodos testados não diferirem entre si devido a fatores de preparação no meio de cultivo, já que mesmo utilizando meios comerciais voltados para espécie bovina realizamos a adição de antioxidantes (melatonina e beta-mercaptoetanol) e 10% de SFB nos meios de maturação e cultivo *in vitro* com o intuito de mimetização da tuba uterina da fêmea.

Marin et al., (2019), relataram que as taxas de blastocisto e taxas de prenhez tornam-se ainda mais baixas, pelo fato de ainda se utilizar o mesmo protocolo de PIVE de bovinos na espécie bubalina, já que esta espécie não possui um protocolo específico que consiga suprir todas as características da mesma.

Utilizamos também ambientes de cultura celular com concentrações de O₂ diferentes, a MIV e CIV foram em baixa tensão de oxigênio (5% de O₂) e a FIV em alta tensão (20% de O₂), porém com as mesmas condições de cultivo de atmosfera controlada com temperatura de 38,8°C, 5% de CO₂, 90% de N₂ e umidade saturada, com o intuito de proporcionar um melhor ambiente de cultivo para minimizar a má qualidade oocitária dos CCOs rastreados nas OPUs. De acordo com Shahzad et al., (2020), apenas 5% dos oócitos maturados *in vitro* chegaram a fase final de crescimento embrionário e o principal fator que pode impedir este desenvolvimento é o estresse oxidativo, o que pode ser causado pela maior tensão atmosférica de oxigênio (20%), tornando a PIVE na espécie bubalina uma biotécnica ainda ineficiente.

Essas variações nos resultados de taxa de embriões *in vitro* de acordo com a sazonalidade destaca a importância de seleção de um modelo de programas de sessões de OPU que se ajustariam de acordo com a categoria animal e as outras exigências

reprodutivas ideais para se tentar maximizar a eficiência da espécie bubalina (SENEDA et al., 2020).

Pois, mesmo com vários anos de estudos a taxa de produção embrionária continua sendo baixa para PIVE em búfalos, fato este que se torna um empecilho para utilização desta biotécnica reprodutiva a nível de escala comercial e influenciando diretamente no custo da prenhez (de 3 a 4 vezes mais elevado que em bovino zebuino) (OHASHI et al., 2017; BARUSELLI et al., 2020).

5.1.6. Influência do touro na taxa de PIVE

Efeitos da influência do touro na PIVE também foram avaliados considerando-se a individualidade de fertilidade que cada reprodutor poderia trazer para o resultado final da taxa de embriões. No entanto, não foi encontrada diferença estatística ($p>0,05$) entre as correlações feitas e os valores média de taxa de embriões para cada touro foram: touro 1 com $59,33\pm 22,27\%$; touro 2 com $38,29\pm 20,35\%$ e touro 3 com $54,17\pm 31,55\%$ (figura 7).

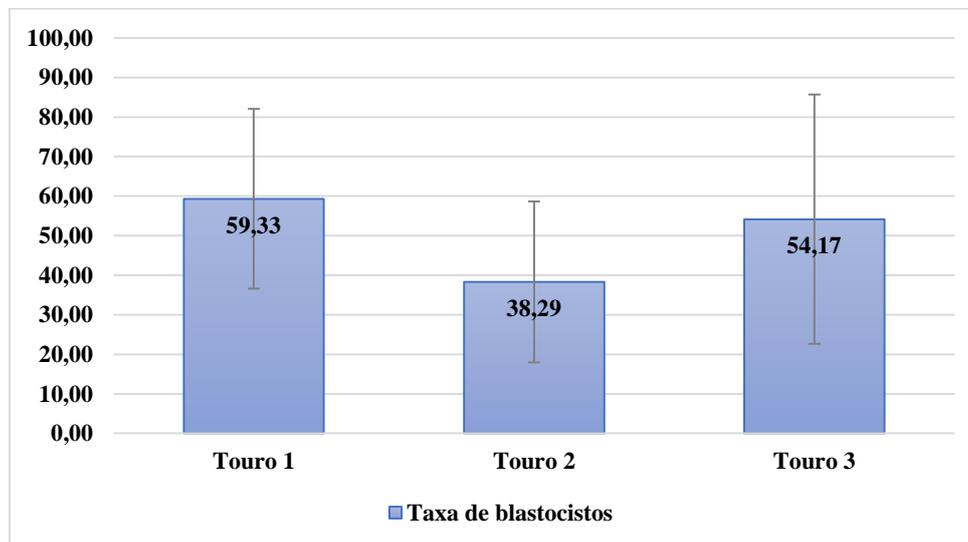


Figura 07. Influência da taxa de embriões produzidos em relação ao touro utilizados na PIVE em bubalinos na Ilha do Marajó.

A individualidade dos reprodutores, não diferiu estatisticamente, demonstrando a capacidade generandi de fertilidade do sêmen utilizado. Neste aspecto, (GALLI et al., 2010) mencionam, que o sêmen, é um dos principais fatores de variação nas taxas de embriões. Segundo OHASHI et al., (2017), chamam a atenção para a escolha dos

doadores de sêmen, que de acordo com os autores, apresenta papel importante para bons resultados na PIVE. Neste contexto, Ferraz (2008) obteve 18 embriões do reprodutor A e seis embriões do reprodutor B, representando 28,6% e 9,1% (sêmen A=18/63 e sêmen B=6/ 66), respectivamente.

Almeida et al., (2020), conduziram um estudo que teve por objetivo a análise da fertilidade do sêmen bubalino no processo de PIVE, comparando os ejaculados de três touros dividindo em refrigerados e congelados, encontraram diferença estatística entre o sêmen refrigerado e o congelado, com produção de embriões igual a 25,4% e 14%, respectivamente.

A alta variabilidade de resultados na taxa de embriões de PIVE demonstra a necessidade de seleção de touros doadores de sêmen. Em nosso experimento foi realizada a seleção dos machos, através de exames andrológicos, libido, raça, idade e docilidade, escolhendo os melhores reprodutores a partir destas características e realizada a criopreservação seminal e a utilização deles na FIV, o que possivelmente explique a não influência do sêmen dos diferentes touros testados na taxa de embriões.

6. CONCLUSÃO

De acordo com a metodologia e o material utilizado, concluímos, que no período das sessões das aspirações, não ocorreu influências da estação mais e menos chuvosa da região, assim como, presença do corpo lúteo e de folículos dominantes, escore da condição corporal e o sêmen dos reprodutores utilizados sobre as taxas de embriões de búfalas criadas no Marajó..

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABSALÓN-MEDINA, V. A.; BUTLER, W. R.; GILBERT, R. O. Preimplantation embryo metabolism and culture systems: Experience from domestic animals and clinical implications. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, v.31, n.4, p.393–409, 2014.

AHEED, M.M.; GOUDA, E.M.; KHALIFA, T.A.A. Impact of seminal plasma superoxide dismutase and glutathione peroxidase on cryopreserved buffalo spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 142, n. 3, p. 126-130, 2013.

AIRES, V. A.; HINSCH, K. D.; MUELLER-SCHLOESSER, F.; Bogner, K.; MUELLER-SCHLOESSER, S.; HINSCH, E. *In vitro* and *in vivo* comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology*, v. 60, p. 269-279, 2003.

AKHTER, S.; ANSARI, M. S.; RAKHA, B. A.; ANDRABI, S. M. H.; IQBAL, S.; ULLAH, N. Cryopreservation of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen in Bioxcell® extender. *Theriogenology*, v. 74, p. 951-955, 2010.

ALMEIDA, J.; NEVES B. P.; BRITO, M. F.; FREITAS, R.F.; LACERDA, L.G.; GRAPIUNA, L.S.; HADDAD, J. P.; AULER, P.A.; HENRY, M. Impact of *in vitro* fertilization by refrigerated versus frozen buffalo semen on developmental competence of buffalo embryos. *Animal Reproduction*, v.16, p. 1-11, 2020.

AMIRAT, L.; ANTON, M.; TAINTURIER, D.; CHATAGNON, G.; BATTUT, I.; COURTENS, J. L. Modifications of bull spermatozoa induced by three extenders: Biociphos, low density lipoprotein and Triladyl, before, during and after freezing and thawing. *Reproduction*, v. 129, p. 535-543, 2005.

ANAND, T.; KUMAR, D.; CHAUHAN, M. S.; MANIK, R. S.; & PALTA, P. Cysteamine supplementation of *in vitro* maturation medium, *in vitro* culture medium or both media promotes *in vitro* development of buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 20, n. 2, p. 253-257, 2008.

ARMSTRONG, D.G.; MCEVOY, T. G.; BAXTER, G.; ROBINSON, J. J.; HOGG, C.O.; WOAD, K. J. Effect of dietary energy and protein on bovine follicular dynamics and embryo production *in vitro*: associations with the ovarian insulin-like growth factor System1. *Biol Reprod.* v. 64, p. 1624-32, 2001.

BAILEY, J. L.; MORRIER, A.; CORMIER, N. Semen cryopreservation: Successes and persistent problems in farm species. *Can. J. Anim. Sci.*, v. 83, p. 393-401, 2003.

BALDRIGHI, J. M.; SÁ FILHO, M. F.; BATISTA, E. O. S.; LOPES, R. N. V. R.; VISINTIN, J. A.; BARUSELLI, P. S.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. A. Anti-Mullerian Hormone Concentration and Antral Ovarian Follicle Population in Murrah Heifers Compared to Holstein and Gyr Kept Under the Same Management. *Reproduction in domestic animals*, v. 49, n. 6, p. 1015-1020, 2014.

BALL, P. J.; PETERS, A. R. **Reproduction in cattle. (3^a Ed).** United Kingdom: Blackwell Publishing, 2004.

BARUSELLI, P. S.; CARVALHO, N. A. T.; GIMENE, L. U.; CREPALDI, G.A. Fixed-time artificial insemination in buffalo. **Ital. J. Anim. Sci.** v.6, p.107–118, 2007.

BARUSELLI, P. S. & CARVALHO, N. A. T. Biotecnologias da reprodução em bubalinos (*Bubalus bubalis*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 29, p. 417-425, 2005.

BARUSELLI, P. S.; DE CARVALHO, J. G. S.; ELLIFF, F. M.; DA SILVA, J. C. B.; CHELLO, D.; DE CARVALHO, N. A. T. Embryo transfer in buffalo (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, v. 150, p. 221-228, 2020.

BARUSELLI, P. S.; MUCCIOLO, R. G.; VISINTIN, J. A.; VIANA, W. G.; ARRUDA, R. P.; MADUREIRA, E. H.; MOLERO-FILHO, J. R. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in buffalo (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, v. 47, n. 8, p. 1531-1547, 1997.

BARUSELLI, P. S.; SOARES, J. G.; BAYEUX, B. M.; SILVA, J. C.; MINGOTI, R. D.; CARVALHO, N. A. Assisted reproductive technologies (ART) in water buffaloes. **Animal Reproduction (AR)**, v. 15, n. Supplement 1, p. 971-983, 2018.

BERMEJO-ÁLVAREZ, P.; LONERGAN, P.; RIZOS, D.; GUTIÉRREZ-ADAN, A. Low oxygen tension during IVM improves bovine oocyte competence and enhances anaerobic glycolysis. **Reproductive BioMedicine Online**, v.20, n.3, p.341–349, 2010.

BHARDWAJ, R.; ANSARI, M. M.; PARMAR, M. S.; CHANDRA, V.; SHARMA, G. T. Stem cell conditioned media contains important growth factors and improves *in vitro* buffalo embryo production. **Animal Biotechnology**, v. 27, p. 118-125, 2016.

BONI, R. In vitro embryo production in bovine and buffalo species. **Buffalo Journal**, Suplemento 2, p. 147-157, 1994.

BRITO, M. F. Criopreservação do sêmen de búfalos em diluidores contendo lipoproteínas de baixa densidade em substituição a gema de ovo. **Dissertação** (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2014.

CAMPANILE, G.; BARUSELLI, P. S.; NEGLIA, G.; VECCHIO, D.; GASPARRINI, B.; GIMENES, L. U.; MICHAEL, J. D. Ovarian function in the buffalo and implications for embryo development and assisted reproduction. **Animal Reproduction Science**, v. 121, n. 1-2, p. 1-11, 2010.

CASAO, A.; CEBRIÁN, I.; ASUMPCÃO, M. E.; PÉREZ-PÉ, R.; ABECIA, J. A.; FORCADA, F.; PÉREZ-CEBRIÁN, J. A.; MUIÑO-BLANCO, T. Seasonal variations of melatonin in ram seminal plasma are correlated to those of testosterone and antioxidant enzymes. **Reprod Biol Endocrinol**, v.8, p.59, 2010.

CASTRO, S. R. S. Uso de antioxidantes para elevação da qualidade do sêmen criopreservado de búfalos (**Bubalus bubalis**). **Dissertação** (Mestrado em Ciência Animal). Universidade Federal do Pará, Belém. 2010.

CURRY, M. R.; MILLAR, J. D.; WATSON, P. F. Calculated optimal cooling rates for ram and human sperm cryopreservation fail to conform with empirical observations. **Biology of Reproduction**, v. 51, p. 1014-1021, 1994.

DA SILVA, J. C. B. Sazonalidade reprodutiva em búfalas: efeitos na produção *in vitro* de embriões e nas taxas de concepção utilizando embriões criopreservados. **Tese** (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, 2020.

DANELL, B. Oestrous behaviour, ovarian morphology and cyclical variation in follicular system and endocrine pattern in water buffalo heifers. **Sveriges Lantbruksuniv.** 1987.

DE CARVALHO, J. G. S.; DE CARVALHO, N. A. T.; BAYEUX, B. M.; WATANABE, Y. F.; WATANABE, O. Y.; MINGOTI, R. D.; BARUSELLI, P. S. Superstimulation prior to the *ovum pick-up* improves the *in vitro* embryo production in nulliparous, primiparous and multiparous buffalo (*Bubalus bubalis*) donors. **Theriogenology**, v. 138, p. 164-168, 2019.

DE SOUZA JUNIOR, J. B. F.; DOMINGOS, H. G. T.; SILVA, R. B.; DE LIMA, R. N. **Termorregulação em búfalos manejados em ambiente tropical**. Pubvet, 2008.

DE WIT, A. A.; WURTH, Y. A.; KRUIP, T. A. Effect of ovarian phase and follicle quality on morphology and developmental capacity of the bovine *cumulus-oocyte complex*. **J Anim Sci.** v. 78, p. 1277, 2000.

DHAMI, A. J.; SAHNI, K. L.; MOHAN, G.; VANI, V. R. Effects of different variables on the freezability, post-thaw longevity and fertility of buffalo spermatozoa in the tropics. **Theriogenology**, v. 46, p. 109-120, 1996.

DI FRANCESCO, S.; NOVOA, M. V. S.; VECCHIO, D.; NEGLIA, G.; BOCCIA, L.; CAMPANILE, G.; GASPARRINI, B. *Ovum pick-up* and *in vitro* embryo production (OPU-IVEP) in Mediterranean Italian buffalo performed in different seasons. **Theriogenology**, v. 77, n. 1, p. 148-154, 2012.

EL-NABY, A. S. A. H.; MAHMOUD, K.; AHMED, Y. F.; ABOUEL-ROOS, M. E.; ABDEL-GHAFFAR, A. E. Effect of season of the year and ovarian structures on oocytes recovery rate, quality and meiotic competence in Egyptian buffaloes. **Glob Vet**, v. 10, n. 5, 2013.

EL-SHEIKH, A. S.; SAKLA, F. B.; AMIN, S. O. Changes in the density and progesterone content of luteal tissue in the Egyptian buffalo during the oestrous cycle. **Journal of Endocrinology**, v. 39, n. 2, p. 163-171, 1967.

ERTMER, F.; OLDENHOF, H.; SCHÜTZE, S. Induced sub-lethal oxidative damage affects osmotic tolerance and cryosurvival of spermatozoa. **Reprod. Fert. Develop.**, v. 29, n. 9, p. 1739-1750, 2017.

FAO. 1991. **The buffalo**. Ministério da Agricultura. São Paulo Associação Brasileira de Criadores de Búfalos, Brasília, DF, Brasil. 320pp (in Portuguese).

FERRAZ, M. L.; SÁ FILHO, M. F.; BATISTA, E. O. S.; WATANABE, Y. F.; WATANABE, M. R.; DAYAN, A.; JOAQUIM, D. C.; ACCORSI, M. R.; GIMENES, L. U.; VIEIRA, L. M.; BARUSELLI, P. S. 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**, v.154, p.1-7, 2015.

FERRAZ, M. L. Efeitos do intervalo entre aspirações foliculares e do tratamento com somatotropina bovina recombinante na população folicular e na produção *in vitro* de embriões bubalinos. **Dissertação** (Mestrado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, 2008.

FIGUEIREDO, R. A.; BARROS, C. M.; PINHEIRO, O. L.; SOLER, J. M. P. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. **Theriogenology**, v. 47, n. 8, p. 1489-1505, 1997.

FILHO, A. E.; DE SOUZA FARIAS, M.; DOS SANTOS, P. E. F.; DA SILVA, M. W. R. (2010). **Balanco energético negativo**. *Pubvet*, 4, Art-780.

FU, Q.; LIU, Z. F.; HUANG, Y. L.; LU, Y. Q.; ZHANG, M. Comparative proteomic analysis of mature and immature oocytes of Swamp Buffalo (*Bubalus bubalis*). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, p. 1-10, 2016.

GALLI, C. et al. Reproductive biotechnologies in buffaloes. In: **International Buffalo Conference**, New Delhi. Proceedings... New Delhi: ICAR, 2010. p.7-14, 2010.

GARCIA, A. R. **Conforto térmico na reprodução de bubalinos criados em condições tropicais**. Embrapa Pecuária Sudeste-Artigo em periódico indexado (ALICE), 2013.

GASPARRINI B. Effects of reproductive season on embryo development in the buffalo. **Reprod Fertil Dev**. v. 31, p. 68-81, 2019.

GASPARRINI B. *In vitro* embryo production in buffalo species: state of art. **Theriogenology**, v.57, p.237-256, 2002.

GASPARRINI, B.; NEGLIA, G.; DI PALO, R.; VECCHIO, D.; ALBERO, G.; ESPOSITO, L.; ZICARELLI, L. Influence of oocyte donor on *in vitro* embryo production in buffalo. **Animal reproduction science**, v. 144, n. 3-4, p. 95-101, 2014.

GIMENES, L. U.; FERRAZ, M. L.; FANTINATO-NETO, P.; CHIARATTI, M.R.; MESQUITA, L. G.; SA FILHO, M. F. The interval between the emergence of pharmacologically synchronized ovarian follicular waves and *ovum pickup* does not significantly affect *in vitro* embryo production in *Bos indicus*, *Bos taurus*, and *Bubalus bubalis*. **Theriogenology**. v. 83, p. 385-93, 2015.

GIMENES, L. U. Taxa de recuperação *in vivo* e competência *in vitro* de oócitos bubalinos, zebuínos e taurinos aspirados em diferentes fases da onda de crescimento folicular. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo, 2010.

GONÇALVES, P. B. D. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. Editora Roca, 2008.

GUTHRIE, H. D.; LIU, J.; CRITSER, J. K. Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 1811-1816, 2002.

HEAPE, W. Preliminary note on the transplantation and growth of mammalian ova within a uterine foster-mother. **Proceedings of the Royal Society of London**, London, v.48, p.457-458, 1891.

HOLM, P.; BOOTH, P. J.; SCHMIDT, M. H.; GREVE, T.; CALLESEN, H. High bovine blastocyst development in a static *in vitro* production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. **Theriogenology**, v. 52, n. 4, p. 683-700, 1999.

HOLT, W.V. **Basic aspects of frozen storage of semen**. Anim. Reprod. Sci., v. 62, p. 3-22, 2000.

KADIRVEL, G.S.K.G.; KUMAR, S.; GHOSH, S.K.; PERUMAL, P. Activity of antioxidative enzymes in fresh and frozen thawed buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa in relation to lipid peroxidation and semen quality. **Asian Pac. J. Reprod.**, v. 3, n. 3, p. 210-217, 2014.

KUMAR, P.; VERMA, A.; KUMAR, M., DE, S.; KUMAR., R.; DATTA, T. K. Expression pattern of glucose metabolism genes correlate with development rate of buffalo oocytes and embryos in vitro under low oxygen condition. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 32, p. 471-478, 2015.

LAMBRECHTS, H. The effect of cryopreservation on the survivability, viability and motility of epididymal African buffalo (*Syncerus caffer*) spermatozoa. **Theriogenology**, v. 52, p. 1241-1249, 1999.

LIANG, X.; ZHANG, X.; YANG, B.; CHEN, M.; HUANG, F.; PANG, C.; LIAO, C. Repeated *Ovum Pick-Up* and *In-vitro* Embryo Production in Buffalo. **Ital. J. Anim. Sci.** v. 6, p. 759-761, 2007.

LIMA, A. M. M.; DE OLIVEIRA, L. L.; FONTINHAS, R. L.; DA SILVA LIMA, R. J. Ilha do Marajó: revisão histórica, hidroclimatologia, bacias hidrográficas e propostas de gestão. **Holos environment**, v. 5, p. 65-80, 2005.

MANIK, R. S.; MADAN, M. L.; SINGLA, S. K. Ovarian follicular dynamics in water buffaloes (*Bubalus bubalis*): ultrasonically monitoring individual follicles for wave hypothesis. **Theriogenology**, v. 41, n. 1, p. 246, 1994.

MANJUNATHA, B. M.; DEVARAJ, M.; GUPTA, P. S. P.; RAVINDRA, J. P.; NANDI, S. Effect of taurine and melatonin in the culture medium on buffalo *in vitro* embryo development. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, n. 1, p. 12-16, 2009.

MANJUNATHA, B. M.; GUPTA, P. S. P.; RAVINDRA, J. P.; DEVARAJ, M.; RAMESH, H. S.; NANDI, S. *In vitro* developmental competence of buffalo oocytes

collected at various stages of the estrous cycle. **Theriogenology**, v. 68, n. 6, p. 882-888, 2007.

MANTIKOU, E.; YOUSSEF, M. A.; VAN WELY, M.; VAN DER VEEN, F.; AL-INANY, H. G.; REPPING, S.; MASTENBROEK, S. Embryo culture media and IVF/ICSI success rates: a systematic review. **Human reproduction update**, v. 19, n. 3, p. 210-220, 2013.

MARIN, D. F. D.; SOUZA, E. B.; BRITO, V. C.; NASCIMENTO, C. V.; RAMOS, A. S.; ROLIM FILHO, S. T.; COSTA, N. N.; CORDEIRO, M. S.; SANTOS, S. S. D.; OHASHI, O. M. *In vitro* embryo production in buffaloes: From the laboratory to the farm. **Animal Reproduction**, v.16, n.2, p.260–266, 2019.

MCCARTHY, M. J.; BAUMBER, J.; KASS, P. H.; MEYERS, S. A. Osmotic stress induces oxidative cell damage to rhesus macaque spermatozoa. **Biology of reproduction**, v. 82, p. 644-651, 2010.

MELLO, R. R. C.; MOREIRA, E. M.; FERREIRA, J. E.; REIS, R. C. S.; MELLO, M. R. B. Biotécnicas da reprodução aplicada aos bubalinos (*Bubalus Bubalis*). **Pubvet (medicina veterinária e zootecnia)**. v.12, p.1-16, 2018.

MERTON, J. S.; DE ROOS, A. P. W.; MULLAART, E.; DE RUIGH, L.; KAAL, L.; VOS, P. L. A. M.; DIELEMAN, S. J. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. **Theriogenology**, v. 59, n. 2, p. 651-674, 2003.

MIYASAKI, M. Y. A. Comparação entre o tris, lactose/tris, ringer-lactato e leite desnatado como diluidores na criopreservação do sêmen bubalino. **Dissertação** (Mestrado em Ciência Animal). Universidade Federal do Pará, 2012.

MONDADORI, R. G.; SANTIN, T. R.; FIDÉLIS, A. A. G.; NAME, K. P. O.; SILVA, J. S.; RUMPF, R.; BAO, S. N. Ultrastructure of *in vitro* oocyte maturation in buffalo (*Bubalus bubalis*). **Zygote**, v. 18, p. 309-314, 2010.

MUDGAL, V. 1992. **Reproduction in River Buffaloes**. In: Tulloh, N.M.; Holmes, J.H.G (Ed's). Buffalo Production. New York: Elsevier, p.171-181.

MUINO, R.; FERNÁNDEZ, M.; PEÑA, A. Post-thaw survival and longevity of bull spermatozoa frozen with an egg yolk-based or two egg yolk-free extenders after an equilibration period of 18 h. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, p. 305-311, 2007.

NABINGER, C. (1997). **Eficiência do uso de pastagens: disponibilidade e perdas de forragem**. *Simpósio sobre manejo da pastagem*, v.14, p.213-251.

NAHÚM B. S. Uso da água de coco (*Cocos nucifera*) como diluidor para a criopreservação de sêmen bubalino. **Dissertação** (Ciência Animal), Universidade Federal do Pará, 2000.

NEGLIA, G.; GASPARRINI, B.; VECCHIO, D.; BOCCIA, L.; VARRICCHIO, E.; DI PALO, R.; CAMPANILE, G. Long term effect of *Ovum Pick-up* in buffalo species. **Animal reproduction science**, v. 123, n. 3-4, p. 180-186, 2011.

NOSEIR, W. Ovarian follicular activity and hormonal profile during estrous cycle in cows: the development of 2 versus 3 waves. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, n. 1, p. 1-6, 2003.

OBA, E. & CAMARGOS, A. S. Produção *in vitro* de embriões bubalinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 35, 80-87, 2011.

OHASHI, O. M.; CORDEIRO, M. S. & MIRANDA, M. S. Biotecnologia da reprodução aplicada aos bubalinos. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 45, p. 1-14, 2006.

OHASHI, O. M.; MIRANDA, M. S.; SOUSA, J. S.; SOUSA, A. J. O.; CORDEIRO, M. S.; BIONDI, F. C. Produção *in vitro* de embrião bubalino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, n. 2, p. 103-108, 2003.

OHASHI, O. M.; ALMEIDA, N. N. D. C.; CORDEIRO, M. D. S.; ROLIM FILHO, S. T.; RIBEIRO, H. F. L.; SANTOS, A. X.; AYALA, H. M. D.; BRITO, V. C.; RAMOS, A. S.; SILVA, T. V. G.; SANTOS, S. S. D.; MIRANDA, M. D. S. Produção *in vitro* de embrião (PIVE) na espécie bubalina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.41, p.195–200, 2017.

OHASHI, O. M.; SANTOS, S. S. D.; MIRANDA, M. S.; CORDEIRO, M. S.; COSTA, M. M.; SILVA, T. V. G. Morfologia do sistema genital, distúrbio reprodutivo e manejo de macho bubalino (*Bubalus bubalis*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, n.2, p.88-94, 2011.

PAES, V. M.; VEIRA, L. A.; FIGUEIREDO, J. R. Impacto do estresse térmico na maturação oocitária *in vitro* em bovinos: uma revisão. **R. Bras. Reprod. Anim.**, p. 347-353, 2015.

PALTA, P., & CHAUHAN, M. S. Laboratory production of buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 10, n. 5, p. 379-392, 1998.

PAULA, P. R. P., JÚNIOR, A. P. N., DE SOUZA, W. L., DE ABREU, M. J. I., TEIXEIRA, R. M. A., CAPPELLE, E. R., & TAVARES, V. B. Composição bromatológica da silagem de capim-elefante *BRS Capiacu* com inclusão fubá de milho. **Pubvet**, v. 14, p.148, 2020.

PENITENTE-FILHO, J. M.; CARRASCAL, E.; OLIVEIRA, F. A.; ZOLINI, A. M.; OLIVEIRA, C. T.; SOARES, Í. A. C.; TORRES, C. A. A. Influence of dominant follicle and corpus luteum on recovery of good quality oocytes for *in vitro* embryo production in Cattle. **British Biotechnology Journal**, v. 4, n. 12, p. 1305, 2014.

PENITENTE-FILHO, J. M.; JIMENEZ, C. R.; ZOLINI, A. M.; CARRASCAL, E.; AZEVEDO, J. L.; SILVEIRA, C. O.; TORRES, C. A. A. Influence of corpus luteum and ovarian volume on the number and quality of bovine oocytes. **Animal Science Journal**, v. 86, n. 2, p. 148-152, 2015.

PEREIRA, E. C. M.; BORGES, A. M.; OBA, E. Maturação *in vitro* de oócitos bubalinos e seu efeito sobre o desenvolvimento embrionário. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v. 40, p. 43-50, 2016.

PETROVAS, G.; KOSIOR, M. A.; PRESICCE, G. A.; RUSSO, M.; ZULLO, G.; ALBERO, G.; GASPARRINI, B. FSH Stimulation with Short Withdrawal Improves Oocyte Competence in Italian Mediterranean Buffalo (*Bubalus bubalis*). **Animals**, v. 10, p. 1-11, 2020.

PFEIFER, L. F. M.; LEAL, S. D. C. B. D. S.; SCHNEIDER, A.; SCHMITT, E.; CORRÊA, M. N. Effect of the ovulatory follicle diameter and progesterone concentration on the pregnancy rate of fixed-time inseminated lactating beef cows. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41, n. 4, p. 1004-1008, 2012.

PHOGAT, J. B.; PANDEY, A. K.; SINGH, I. Seasonality in buffaloes reproduction. **International Journal of Plant**, v.6, p.46-54, 2016.

PUGH, P. A.; MCGOWAN, L. T.; ANKERSMIT, A. E. L.; TERVIT, H. R. Cryopreservation of *in vitro* produced bovine embryos after culture in the presence of liposomes. **Theriogenology**, v. 1, n. 45, p. 160, 1996.

RIBEIRO, H.F.L. Puerpério in the búfala (*Bubalus bubalis*): Clinical aspects and histológicos of the uterine involução and ovarian activity. Belo Horizonte. School of Veterinary of UFMG, .125p. (Tese de Doutorado), 1996.

RIBEIRO, H.F.L.; ANDRADE, V.J.; VALE, W.G. Effect of the corporal condition in the moment of the partum on the emergence of the first postparturition estrus in búfalas. **Brazilian Magazine of Veterinary Medicine**, Belo Horizonte, 19 (5): 213-218, 1997.

RIBEIRO, H.F.L. Particularidades na Inseminação artificial em tempo fixo de bubalinos na Amazônia. **Ciência Animal**, v. 30, p. 23-34, 2020.

SAGHEER, M.; ULLAH, F.; ARSHAD, U.; SALEEM, M.; NAWAZ, M.; SARWAR, Z.; AHMAD, N. Effect of photoperiodicity and methods of follicular wave emergence on follicle turn-over, recovery and quality of oocytes, and early *in-vitro* developmental competence of embryos using *ovum pick-up* in *Nili-Ravi* buffaloes: Preliminary evidence. **Theriogenology**, v. 157, p; 508-516, 2020.

SALIBA, W.; GIMENES, L. U.; DRUMOND, R.; BAYÃO, H.; ALVIM, M.; BARUSELLI, P.; BASTIANETTO, E.; LEITE, R.; GASPARRINI, B. Efficiency of OPU-IVEP-ET of fresh and vitrified embryos in buffaloes. **Buffalo Bulletin**, v. 32, p.385-388, 2013.

SANTOS, M. V. O.; NETA, L. Q.; BORGES, A. A.; SILVA, M. B.; PEREIRA, A. F. Influência do corpo lúteo sobre a recuperação de oócitos imaturos bovinos derivados de fêmeas post-mortem. **HOLOS**, v. 7, p. 278-283, 2017.

SHAHZAD, Q.; PU, L.; WADOOD, A. A.; WAQAS, M.; XIE, L.; PAREEK, C. S.; XU, H.; LIANG, X.; LU, Y. Proteomics analysis reveals that warburg effect along with modification in lipid metabolism improves *in vitro* embryo development under low

- oxygen. **International Journal of Molecular Sciences**, v.21, n.6, p. 1-21, 2020.
- SARTORI, R. & BARROS, C. M. Reproductive cycles in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 124, p. 244-250, 2011.
- SENEDA, M. M.; ZANGIROLAMO, A. F.; BERGAMO, L. Z.; MOROTTI, F. Follicular wave synchronization prior to *ovum pick-up*. **Theriogenology**, v. 150, p. 180-185, 2020.
- SILVA A. O. A.; MOTA A. V.; RIBEIRO H. F. L.; SOUZA J. S.; REIS N. A.; VALE W. G. Preliminary report on ringer-lactate solution as an alternative diluter for buffalo semen. **Anais Buffalo Symp.** Amer, 2002.
- SINGH, G.; SINGH, B. C.; SHARMA, S. S.; SHARMA, R. D. Studies on oestrous symptoms of buffalo heifers. **Theriogenology**, v. 21, n. 6, p. 849-858, 1984.
- SINGHAL, S.; PRASAD, S.; SINGH, B.; PRASAD, J. K.; GUPTA, H. P. Effect of including growth factors and antioxidants in maturation medium used for in vitro culture of buffalo oocytes recovered *in vivo*. **Animal reproduction science**, v. 113, n. 1-4, p. 44-50, 2009.
- SIQUEIRA, J. B.; LEAL, L. S.; OBA, E. Dinâmica folicular ovariana na espécie bubalina. **Rev Bras Reprod Anim**, v. 33, p. 138-148, 2009.
- SIRARD, M. A.; RICHARD, F.; BLONDIN, P.; ROBERT, C. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 126-136, 2006.
- SURESH, K. P.; NANDI, S.; MONDAL, S. Factors affecting laboratory production of buffalo embryos: A meta-analysis. **Theriogenology**, v. 72, p. 978-985, 2009.
- SWELUM, A. A.; MANSOUR, H. A.; ESAYED, A. A.; AMER, H. A. Comparing ethylene glycol with glycerol for cryopreservation of buffalo bull semen in egg-yolk containing extenders. **Theriogenology**, v. 76, p. 833-842, 2011.
- TELFORD, N. A.; WATSON, A. J.; SCHULTZ, G. A. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. **Molecular reproduction and development**, v. 26, n. 1, p. 90-100, 1990.
- TORRES-JÚNIOR, J. R. D. S.; DOS SANTOS, L. S., RIBEIRO, D. L.; DE FRANÇA, I. G.; DE CARVALHO-NETA, A. V. Aspectos Moleculares de Reprodução em Bubalinos. **R. bras. Reprod. Anim.**, p.170-175, 2018.
- VALE, W. G. Avances biotecnológicos em reproducción de búfalos. **Tecnología em marcha**. v. 24, n. 5, p. 89-104, 2011.
- 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**, v. 29, n. 2, p. 63-73, 2005.
- VALE, W.G. Effects of environment on buffalo reproduction. **Ital. J. Anim. Sci.**, vol. 6, n.2, p. 130-142, 2007.

VASSENA, R.; MAPLETOFT, R. J.; ALLODI, S.; SINGH, J.; ADAMS, G. P. Morphology and developmental competence of bovine oocytes relative to follicular status. **Theriogenology**, v. 60, n. 5, p. 923-932, 2003.

WALSH, S. W.; WILLIAMS, E. J.; EVANS, A. C. O. A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. **Anim Reprod Sci**, v. 123, p. 127-38, 2011.

ZICARELLI, L. Management in different environmental conditions. **World Buffalo Congress**, 4, 1994, São Paulo, Proceedings. São Paulo, 1994. p.88-112.

ZORZETTO, M. F. Avaliação do sêmen de búfalos em três meios de diluidores. **Dissertação** (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2013.