BRUNO MOURA MONTEIRO

**Eficiência reprodutiva de búfalas leiteiras submetidas a protocolos de IATF à base de
P4/E2 e eCG durante as estações reprodutivas favorável e desfavorável**

São Paulo

2015

BRUNO MOURA MONTEIRO

Eficiência reprodutiva de búfalas leiteiras submetidas a protocolos de IATF à base de P4/E2 e eCG durante as estações reprodutivas favorável e desfavorável

Tese Apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli

De acordo: _____

Orientador

São Paulo
2015

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.3121
FMVZ

Monteiro, Bruno Moura

Eficiência reprodutiva de búfalas leiteiras submetidas a protocolos de IATF à base de P4/E2 e eCG durante as estações reprodutivas favorável e desfavorável / Bruno Moura Monteiro. -- 2015.
82 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.
Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2015.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli.

1. Bubalinocultura. 2. Reprodução. 3. Perda gestacional. 4. Desestacionalização reprodutiva.
I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Mortalidade embrionária em búfalas (*Bubalus bubalis*) submetidas à inseminação artificial em tempo fixo (IATF), na estação reprodutiva favorável e desfavorável", protocolado sob o nº 2240/2011, utilizando 600 (seiscentos) búfalos, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 22/6/2011.

We certify that the Research "Embryo mortality in buffaloes (*Bubalus bubalis*) submitted to timed artificial insemination (TAI), at the favorable and unfavorable reproductive station", protocol number 2240/2011, utilizing 600 (six hundred) buffaloes, under the responsibility Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 06/22/2011.

São Paulo, 27 de junho de 2011.

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: MONTEIRO, Bruno Moura

Título: Eficiência reprodutiva de búfalas leiteiras submetidas a protocolos de IATF à base de P4/E2 e eCG durante as estações reprodutivas favorável e desfavorável

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: 17 / 04 / 2015

Banca Examinadora

Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli

Instituição: FMVZ/USP

Julgamento: APROVADO

Prof. Dr. Nelcio Antonio Tonizza de Carvalho

Instituição: UPD/IZ

Julgamento: APROVADO

Prof. Dr. Lindsay Unno Gimenes

Instituição: FCAV/UNESP

Julgamento: APROVADO

Prof. Dr. Manoel Francisco de Sá Filho

Instituição: FMVZ/USP

Julgamento: APROVADO

Prof. Dr. Domenico Vecchio

Instituição: IZSM, Salerno - Itália

Julgamento: APROVADO

“Do meu telescópio, eu via Deus caminhar! A maravilhosa disposição e harmonia do universo só pode ter tido origem segundo o plano de um Ser que tudo sabe e tudo pode. Isto fica sendo a minha última e mais elevada descoberta”.
(Isaac Newton)

DEDICO

À minha esposa e companheira de todas as horas, *Vívian Fragoso Rei Monteiro*.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, pelo dom da vida, pela saúde, pelas graças alcançadas, pelas pessoas boas que conheci, pelo que aprendi, pela segurança após tantos quilômetros rodados sem maiores problemas...

À **minha esposa**, por tudo! Obrigado pelo amor, carinho, doçura e zelo... por todos os momentos certos de ouvir e falar... Sua sensibilidade e inteligência me fazem querer ser uma pessoa melhor a cada dia. Te amo!

Aos **meus pais**, José Henrique Monteiro e Carmen Laura Moura Monteiro, pelo amor incondicional e por todo o esforço que fizeram pra que eu pudesse chegar até aqui.

À **minha família**, em especial aos meus irmãos Henrique e Lucas, minha afilhada Ana Laura e minha sobrinha Ágatha, pelo carinho que ajuda a me manter firme, mesmo à distância.

Ao **amigo Celso Scatena**, por ser meu grande incentivador e acreditar em mim, mais do que eu mesmo... Obrigado por acolher este estrangeiro, agora afilhado, como parte da sua família!

Ao **Prof e amigo Rinaldo Batista Viana**, pela confiança, atenção e apoio, desde a graduação até hoje. Obrigado por todos os ensinamentos e lições!

Ao **Prof. Enrico Ortolani**, pelas conversas, histórias e pelos sábios conselhos. Obrigado pelo exemplo de profissionalismo e entusiasmo!

Ao **Prof. Pietro Baruselli**, pelo exemplo de profissionalismo e trabalho. Obrigado pela orientação do doutorado, pela confiança investida e pela oportunidade de aprender.

Ao **Dr. Nelcio Carvalho**, pela disponibilidade de sempre e por ser um exemplo de profissionalismo e retidão. Obrigado pela paciência e pela ajuda durante toda a pós-graduação (mestrado e doutorado) e nos experimentos feitos no Vale do Ribeira.

Ao amigo Dr. Manoel Sá Filho, pela “co-orientação”. Obrigado pelas conversas, reflexões, risadas e por me ajudar e incentivar a ser um profissional melhor.

Aos companheiros de salinha, Henderson Ayres, Rodrigo Sala, Márcio Mendanha, Gustavo Macedo, Roberta Ferreira, Júlia Soares, Laís Vieira, Emiliana Batista, Mariana Ortolan, Tomás Reis, Bruno Freitas, Bruna Guerreiro e Rodolfo Mingoti, por todos os dias de convívio, aprendizado, viagens, experimentos, discussões, plantões... Obrigado por terem contribuído na minha formação profissional, mas acima de tudo, participado do meu amadurecimento pessoal. Muito obrigado!

Aos amigos Diego Souza e Guilherme Vasconcellos, pela ajuda e paciência durante a execução da tese e dos experimentos. Obrigado por tudo!

À equipe de funcionários da FMVZ, em especial a Harumi, Miguel, Thaís, Roberta, Elza Faquim e Sandra pelo convívio agradável e por todas as vezes que me ajudaram ao longo desses 4 anos.

Aos Professores do VRA-FMVZ/USP, pelas disciplinas ministradas e pelo aprendizado.

Ao amigo Fernando Vannucci, pelo apoio na execução do doutorado. Foi barra! kkk

Aos fazendeiros Pedro Paulo, Sr. Zé Carlos e Glauce, pela disponibilidade das fazendas e dos animais para a execução dos nossos experimentos. Nosso muito obrigado!

Aos funcionários das fazendas Santa Helena, Várzea Grande, Guaviruva, Rincão, Barra do Capinzal e da UPD-Registro, pelo apoio e paciência durante os experimentos.

À CAPES, pela bolsa de doutorado concedida, que contribuiu para minha permanência em São Paulo.

RESUMO

MONTEIRO, B. M. **Eficiência reprodutiva de búfalas leiteiras submetidas a protocolos de IATF à base de P4/E2 e eCG durante as estações reprodutivas favorável e desfavorável.** [Reproductive performance of dairy buffaloes submitted to TAI protocols based on P4/E2 and eCG during breeding and nonbreeding seasons]. 2015. 82 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Os objetivos da tese foram comparar a dinâmica folicular e luteínica (Experimento 1), bem como a eficiência reprodutiva (Experimento 2) de búfalas leiteiras submetidas a protocolos de IATF à base de progesterona/estrógeno (P4/E2) e eCG durante as estações reprodutivas favorável (ERF; maio, junho e julho) e desfavorável (ERD; novembro, dezembro e janeiro) do ano. No Experimento 1 foram utilizadas 51 búfalas leiteiras de uma propriedade e no Experimento 2, 351 búfalas leiteiras de 5 propriedades. Para comparar o efeito das ER, cada propriedade teve semelhante número de animais submetidos à IATF nas respectivas ERF e ERD, tanto no Experimento 1 (n=25 vs. n=26) quanto no Experimento 2 (n=168 vs. n=183). Todas as propriedades se localizavam na região do Vale do Ribeira, Estado de São Paulo. Em dias aleatórios do ciclo estral (D-12; 16:00 h), todas as búfalas receberam um dispositivo intravaginal contendo 1 g de P4 (*i*P4; Sincrogest[®], Ourofino Agronegócio) mais 2,0 mg de benzoato de estradiol i.m. (Sincrodiol[®], Ourofino Agronegócio). No D-3 (16:00 h), as fêmeas receberam 0,53 mg de PGF2 α i.m. (Cloprostenol, Sincrocio[®], Ourofino Agronegócio) e 400 UI de eCG i.m. (Novormon[®], MSD Saúde Animal), seguido de remoção do dispositivo de progesterona. No D-1 (16:00 h), 10 μ g de acetado de buserelina (GnRH, Sincroforte[®], Ourofino Agronegócio) foram administrados i.m. A IATF foi realizada 16 horas após a administração de GnRH (D0; 8:00 h). No D0 foram determinados o intervalo de dias em lactação (DEL) e o escore de condição corporal das fêmeas (ECC; 1-5). Avaliações ultrassonográficas (Chison D600Vet, China) foram realizadas no Experimento 1 para determinar: diâmetro do folículo dominante entre a retirada do *i*P4 e a IATF ($\emptyset$ FD), o diâmetro do folículo ovulatório ($\emptyset$ FO), o momento da ovulação, a dispersão das ovulações, a presença e o diâmetro do corpo lúteo ($\emptyset$ CL) após a ovulação. No Experimento 2, determinaram-se a taxa de ciclicidade (presença de corpo lúteo no D-12 e/ou no D-3); o diâmetro do folículo dominante nos D-3 e D0 ($\emptyset$ FD); a taxa de ovulação e diâmetro do corpo lúteo 10 dias após a IATF ($\emptyset$ CL D+10); os diagnósticos de gestação aos 30 (P/IA 30 d) e 45 dias (P/IA 45 d) após a IATF, além da taxa de mortalidade embrionária (ME) entre 30 e 45 dias, a mortalidade fetal (MF) entre 45 dias e o nascimento e a perda gestacional (PG) entre 30 dias e o nascimento. As

variáveis contínuas foram apresentadas como média e erro padrão da média (média±EPM) e as frequências como porcentagem [% (n/n)]. A comparação entre as variáveis foi realizada por análise de variância (ANOVA), por meio do programa SAS[®]. Foi considerada diferença quando $P < 0,05$. No Experimento 1, observou-se que a dinâmica ovariana não foi influenciada pelas respectivas ERF e ERD para as seguintes variáveis: ØFD (0 h – 10,3±0,4 vs. 9,9±0,5 mm; 24 h – 11,8±0,5 vs. 12,0±0,4; 48 h – 12,8±0,5 vs. 13,2±0,4; e 60 h – 13,8±0,6 vs. 13,1±0,5; $P=0,80$); ØFO (14,3±0,4 vs. 14,2±0,3 mm; $P=0,94$); momento da ovulação (76,5±1,9 vs. 72,0±2,5 h; $P=0,85$); dispersão das ovulações (24 |- 48 h – 0,0 vs. 0,0%; 48 |- 60 h – 12,5 vs. 37,5%; 60 |- 72 h – 41,7 vs. 33,3%; 72 |- 84 h – 41,7 vs. 25,0%; 84 |- 96 h – 4,2 vs. 0,0%; e 96 |- 108 h – 0,0 vs. 4,2%; $P=0,18$) e ØCL (D+6 – 17,3±0,5 vs. 16,9±0,4; D+10 – 21,5±0,6 vs. 18,4±0,5; e D+14 – 20,6±0,6 vs. 19,9±0,6; $P=0,06$). No Experimento 2, pôde-se observar que apesar das búfalas apresentarem semelhança em DEL (111,1±8,8 vs. 144,3±8,6 dias; $P=0,27$) e ECC (3,3±0,0 vs. 3,3±0,0; $P=0,41$) nas respectivas ERF e ERD, houve diferença nas taxas de ciclicidade [76,2 (128/168) vs. 42,6% (78/183); $P=0,02$]. Nenhuma das outras respostas diferiu entre as ERF e ERD, respectivamente: ØFD D-3 (9,6±0,2 vs. 9,8±0,2 mm; $P=0,35$); ØFD D0 (13,1±0,2 vs. 13,2±0,2 mm; $P=0,47$); taxa de ovulação [86,9 (146/168) vs. 82,9% (152/182); $P=0,19$]; ØCL D+10 (19,0±0,3 vs. 18,4±0,3 mm; $P=0,20$); P/IA 30 d [66,7 (112/168) vs. 62,7% (111/177); $P=0,31$]; P/IA 45 d [64,8 (107/165) vs. 60,2% (106/176); $P=0,37$]; ME [1,8 (2/111) vs. 3,6% (4/110); $P=0,95$]; MF [21,9 (18/82) vs. 8,0% (7/87); $P=0,13$]; e PG [23,8 (20/84) vs. 12,1% (11/91); $P=0,13$]. Foi possível concluir que búfalas leiteiras apresentam semelhantes respostas ovarianas ao protocolo de sincronização e equivalente eficiência reprodutiva nas ERF e ERD do ano, quando submetidas a programas de IATF à base de P4/E2 e eCG.

Palavras-chave: Bubalinocultura. Reprodução. Perda gestacional. Desestacionalização reprodutiva.

ABSTRACT

MONTEIRO, B. M. **Reproductive performance of dairy buffaloes submitted to TAI protocols based on P4/E2 and eCG during breeding and nonbreeding seasons.** [Eficiência reprodutiva de búfalas leiteiras submetidas a protocolos de IATF à base de P4/E2 e eCG durante as estações reprodutivas favorável e desfavorável]. 2015. 82 pp. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

This thesis aimed to compare the follicular and luteal dynamics (Experiment 1) and reproductive efficiency (Experiment 2) of dairy buffaloes submitted to TAI protocols based on progesterone/estrogen (P4/E2) and eCG during the breeding (On-BS; May, June and July) and nonbreeding seasons (Off-BS; November, December and January). In Experiment 1, 51 dairy buffalo of one farm were used, and in Experiment 2, 351 dairy buffaloes of 5 farms were used. To compare the effect of BS, each property had similar number of animals submitted to TAI in each, both in Experiment 1 ($n = 25$ vs. $n = 26$) as in Experiment 2 ($n = 168$ vs. $n = 183$). All properties were located in the Vale do Ribeira, State of São Paulo, Brazil. On random days of the estrous cycle (D-12; 4:00 PM), all buffaloes received an intravaginal device containing 1 g of P4 (Sincrogest®, Ourofino Agronegócio) plus 2.0 mg of estradiol benzoate im (Sincrodiol®, Ourofino Agronegócio). On D-3 (4:00 PM), females received 0.53 mg of PGF $_{2\alpha}$ im (Cloprostenol, Sincrocio®, Ourofino Agronegócio) and 400 IU of eCG im (Novormon®, MSD Animal Health), followed by removal of progesterone device. On D-1 (4:00 PM), 10 mg of buserelin acetate (GnRH Sincroforte®, Ourofino Agronegócio) were administered im. The TAI was performed 16 hours after application of GnRH (D0; 8:00 AM). At the beginning of each protocol (D-12), it was recorded the number of days in milk (DIM) and body condition score of females (BCS, 1-5). Ultrasonography (Chison D600Vet, China) were performed in Experiment 1 to determine: the diameter of the dominant follicle between withdraw of *i*P4 and TAI ($\emptyset$ DF), the diameter of the ovulatory follicle ($\emptyset$ OF), the time of ovulation, the dispersion of ovulation, and the presence and diameter of the corpus luteum ($\emptyset$ CL) after ovulation. In Experiment 2, was determined cyclicity rate (the presence of corpus luteum in the D-12 and/or D-3), diameter of the dominant follicle in the D-3 and D0 ($\emptyset$ DF), ovulation rate, diameter of the corpus luteum 10 days after artificial insemination ($\emptyset$ CL D+10); pregnancy rates to 30 (P/AI 30 d) and 45 days (P/AI 45 d) after TAI, embryonic mortality (EM) between 30 and 45 days, fetal mortality (FM) between 45 days and birth, and pregnancy loss (PL) between 30 days and birth. Continuous variables were presented as mean and standard error of the mean (mean $\pm$ SEM)

and frequencies as a percentage [% (n/n)]. The comparison between variables was performed through analysis of variance (ANOVA) using the SAS[®] program. Difference was considered when $P < 0.05$. In Experiment 1, it was found that the ovarian dynamics was not influenced by the respective On-BS and Off-BS for the following variables: ØDF (0 h – 10.3 ± 0.4 vs. 9.9 ± 0.5 mm; 24 h – 11.8 ± 0.5 vs. 12.0 ± 0.4 ; 48 h – 12.8 ± 0.5 vs. 13.2 ± 0.4 ; and 60 h – 13.8 ± 0.6 vs. 13.1 ± 0.5 ; $P = 0.80$); ØOF (14.3 ± 0.4 vs. 14.2 ± 0.3 mm; $P = 0.94$); timing of ovulation (76.5 ± 1.9 vs. 72.0 ± 2.5 h; $P = 0.85$); dispersion of ovulations (24 |- 48 h – 0.0 vs. 0.0%; 48 |- 60 h – 12.5 vs. 37.5%; 60 |- 72 h – 41.7 vs. 33.3%; 72 |- 84 h – 41.7 vs. 25.0%; 84 |- 96 h – 4.2 vs. 0.0%; and 96 |- 108 h – 0.0 vs. 4.2%; $P = 0.18$) and ØCL (D+6 – 17.3 ± 0.5 vs. 16.9 ± 0.4 ; D+10 – 21.5 ± 0.6 vs. 18.4 ± 0.5 ; and D+14 – 20.6 ± 0.6 vs. 19.9 ± 0.6 ; $P = 0.06$). In Experiment 2, it was observed that despite the similarity of DIM (111.1 ± 8.8 vs. 144.3 ± 8.6 d, $P = 0.27$) and BCS (3.3 ± 0.0 vs. 3.3 ± 0.0 ; $P = 0.41$) on respective On-BS Off-BS, buffalo females showed different cyclicity rates [76.2 (128/168) vs. 42.6% (78/183); $P = 0.02$]. None of the other answers differ between On-BS and Off-BS respectively: ØDF D-3 (9.6 ± 0.2 vs. 9.8 ± 0.2 mm; $P = 0.35$); ØDF D0 (13.1 ± 0.2 vs. 13.2 ± 0.2 mm; $P = 0.47$); ovulation rate [86.9 (146/168) vs. 82.9% (152/182); $P = 0.19$]; ØCL + D 10 (19.0 ± 0.3 vs. 18.4 ± 0.3 mm, $P = 0.20$); P/AI d 30 [66.7 (112/168) vs. 62.7% (111/177); $P = 0.31$]; P/AI d 45 [64.8 (107/165) vs. 60.2% (106/176); $P = 0.37$]; EM [1,8 (2/111) vs. 3.6% (4/110); $P = 0.95$]; FM [21.9 (18/82) vs. 8.0% (7/87); $P = 0.13$]; and PL [23.8 (20/84) vs. 12.1% (11/91); $P = 0.13$]. It was concluded that dairy buffaloes have similar responses to ovarian synchronization protocol and equivalent reproductive efficiency during OnBS and OffBS, when subjected to TAI programs based on P4 / E2 and eCG.

Keywords: Buffalo. Reproduction. Pregnancy loss. Breaking sazonality.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Modelo hipotético gráfico	33
Figura 2 -	Procedimentos para avaliar as respostas folicular e luteínica ao protocolo de sincronização da ovulação nas estações reprodutivas favorável (n=25) e desfavorável (n=26) do ano	37
Figura 3 -	Diâmetro do folículo dominante (média±EPM) após a retirada do dispositivo intravaginal liberador de progesterona (iP4) em búfalas leiteiras submetidas a dinâmica ovariana durante protocolo de IATF à base de P4/E2 e eCG nas estações reprodutivas favorável (ERF; n=25) e desfavorável (ERD; n=26) do ano	39
Figura 4 -	Distribuição e dispersão das ovulações (%) de búfalas leiteiras submetidas a protocolo de IATF à base de P4/E2 e eCG nas estações reprodutivas favorável (ERF; n=25) e desfavorável (ERD; n=26) do ano.....	40
Figura 5 -	Diâmetro do corpo lúteo (média±EPM) após a IATF de búfalas leiteiras submetidas a protocolo de IATF à base de P4/E2 e eCG nas estações reprodutivas favorável (ERF; n=25) e desfavorável (ERD; n=26) do ano.....	41
Figura 6 -	Procedimentos realizados para determinar as taxas de ovulação, concepção e mortalidade embrionária nas búfalas leiteiras submetidas ao protocolo de IATF nas estações reprodutivas favorável (ERF; n=168) e desfavorável (ERD; n=183) do ano	43
Figura 7 -	Probabilidade de ocorrência de ovulação em relação ao diâmetro do folículo dominante no momento da inseminação em búfalas leiteiras submetidas a protocolo de IATF à base de P4/E2 e eCG (n=292). Probabilidade de ovulação = $\exp[-6,0197+0,6325(\varnothing FDD0)]/1+\exp[-6,0197+0,6325(\varnothing FDD0)]$; $P < 0,01$	50
Figura 8 -	Probabilidade de ocorrência de prenhez aos 45 dias em relação ao diâmetro do folículo dominante no momento da inseminação em búfalas leiteiras submetidas a protocolo de IATF à base de P4/E2 e eCG (n=284). Probabilidade de prenhez aos 45 dias = $\exp[-3,1120+0,2876(\varnothing FDD0)]/1+\exp[-3,1120+0,2876(\varnothing FDD0)]$; $P < 0,01$	50
Figura 9 -	Curva de regressão simples não polinomial de efeito linear para a predição do diâmetro do corpo lúteo 10 dias após a IATF de acordo com o diâmetro do folículo dominante no momento da inseminação em búfalas leiteiras submetidas a protocolo de IATF à base de P4/E2 e eCG (n=240). $CLD+10 = 13,48+0,39(\varnothing FDD0)$; $P < 0,01$; $R^2=0,08$	51
Figura 10 -	Probabilidade de ocorrência de prenhez aos 45 dias em relação ao diâmetro do corpo lúteo 10 dias após a inseminação em búfalas leiteiras submetidas a protocolo de IATF à base de P4/E2 e eCG (n=285). Probabilidade de prenhez aos 45 dias = $\exp[-0,8085+0,0985(CLD+10)]/1+\exp[-0,8085+0,0985(CLD+10)]$; $P = 0,02$	51

- Figura 11 - Probabilidade de ocorrência de prenhez aos 45 dias em relação ao diâmetro do folículo dominante no momento da inseminação somente em búfalas que ovularam após protocolo de IATF à base de P4/E2 e eCG (n=285). Probabilidade de prenhez aos 45 dias = $\exp[0,6634+0,0430(\text{ØFDD0})]/1+\exp[0,6634+0,0430(\text{ØFDD0})]$; P = 0,53...53
- Figura 12 - Probabilidade de ocorrência de mortalidade embrionária (ME) em relação ao diâmetro do folículo dominante no momento da inseminação em búfalas prenhes 30 dias após protocolo de IATF à base de P4/E2 e eCG (n=190). Probabilidade de ME = $\exp[1,5916-0,4044(\text{ØFDD0})]/1+\exp[1,5916-0,4044(\text{ØFDD0})]$; P = 0,05.....53
- Figura 13 - Diâmetro do folículo dominante no momento da retirada do iP4 (ØFD D-3) de acordo com a presença de corpo lúteo no momento da retirada do iP4 (CL D-3) em búfalas leiteiras submetidas a protocolo de IATF à base de P4/E2 e eCG (n=337). Probabilidade de presença de CL D-3 = $\exp[1,2836-0,1567(\text{ØFDD-3})]/1+\exp[1,2836-0,1567(\text{ØFDD-3})]$; P < 0,0154
- Figura 14 - Probabilidade de ocorrência de mortalidade fetal (MF) em relação ao diâmetro do folículo dominante no momento da retirada do iP4 (com ou sem CL no D-3) em búfalas prenhes após a IATF (n=169) nas estações reprodutivas favorável e desfavorável. Probabilidade de MF em búfalas sem CL D-3 = $\exp[-1,1387-0,1212(\text{ØFDD-3})]/1+\exp[-1,1387-0,1212(\text{ØFDD-3})]$; P = 0,54. Probabilidade de MF em búfalas com CL D-3 = $\exp[-0,6424-0,0706(\text{ØFDD-3})]/1+\exp[-0,6424-0,0706(\text{ØFDD-3})]$; P = 0,64. Efeito de CL D-3 P = 0,04 54
- Figura 15 - Proporção de animais submetidos a protocolo de IATF que ovularam ao final do protocolo de sincronização, que estavam prenhes aos 30 e 45 dias após a IATF (P/IA) e que tiveram o nascimento de bezerro vivo de acordo com as estações reprodutivas favorável (ERF) e desfavorável (ERD).....69
- Figura 16 - Síntese dos resultados do estudo.....70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Taxas de prenhez por inseminação (P/IA) de búfalas submetidas ao protocolo de IATF à base de progesterona, com ou sem eCG.....	30
Tabela 2 -	Taxas de prenhez por inseminação (P/IA) e mortalidade embrionária (ME) em búfalas submetidas ao protocolo Ovsynch de sincronização da ovulação para IATF durante as estações reprodutivas favorável (ERF) e desfavorável (ERD).....	31
Tabela 3 -	Dados produtivos e reprodutivos (média±EPM) de búfalas leiteiras submetidas a protocolo de IATF à base de P4/E2 e eCG nas estações reprodutivas favorável (ERF) e desfavorável (ERD) do ano.....	39
Tabela 4 -	Distribuição do número de búfalas utilizadas de acordo com cada fazenda nas estações reprodutivas favorável (ERF) e desfavorável (ERD) do ano	42
Tabela 5 -	Dados produtivos e reprodutivos (média±EPM) de búfalas leiteiras submetidas a protocolo de IATF à base de P4/E2 e eCG nas estações reprodutivas favorável (ERF) e desfavorável (ERD) do ano.....	46
Tabela 6 -	Coeficientes de correlação (r) probabilidade (P) e número de ocorrências (No.) entre as variáveis de dinâmica folicular ovariana e as variáveis de eficiência reprodutiva	48
Tabela 7 -	Fator de risco ajustado (AOD) para a ocorrência de P/IA aos 45 d e mortalidade fetal (MF) em búfalas leiteiras submetidas a IATF à base de E2/P4 e eCG	56

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1 - Taxas de prenhez por inseminação (P/IA) de búfalas submetidas ao protocolo de IATF à base de GnRH e PGF_{2α} (Ovsynch) 27
- Quadro 2 - Taxas de mortalidade embrionária (ME) e mortalidade fetal (MF) em búfalas submetidas a protocolos de sincronização da ovulação para IATF 32

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	18
1 INTRODUÇÃO.....	20
2 CAPÍTULO 1 - REVISÃO DA LITERATURA	24
2.1 MANEJO REPRODUTIVO DE BÚFALAS LEITEIRAS CRIADAS A PASTO	24
2.2 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL COMO FERRAMENTA PARA O MELHORAMENTO GENÉTICO DO REBANHO	24
2.2.1 Uso da inseminação artificial por observação de cio.....	25
2.2.2 Uso de prostaglandinas (PGF2 α).....	26
2.2.3 Métodos de sincronização de cio como ferramenta de melhoramento genético e de manejo reprodutivo	26
2.2.3.1 Uso do protocolo à base de GnRH+PGF2 α +GnRH (Ovsynch)	27
2.2.3.2 Desestacionalização da produção de leite a pasto	29
2.2.3.2.1 <i>Uso do protocolo à base de progesterona e estradiol (P4/E2)</i>	29
2.3 EFICIÊNCIA REPRODUTIVA DE BÚFALAS LEITEIRAS	31
3 CAPÍTULO 2 – EFICIÊNCIA REPRODUTIVA DE BÚFALAS LEITEIRAS SUBMETIDAS A PROTOCOLO DE IATF À BASE DE P4/E2 E ECG DURANTE AS ESTAÇÕES REPRODUTIVAS FAVORÁVEL E DESFAVORÁVEL	33
3.1 HIPÓTESE	33
3.2 OBJETIVO GERAL	34
3.2.1 Objetivos específicos	34
3.3 EXPERIMENTO 1 – RESPOSTAS FOLICULAR E LUTEÍNICA AO PROTOCOLO DE SINCRONIZAÇÃO NAS ERF E ERD.....	34
3.3.1 Materiais e métodos	34
3.3.1.1 Animais e local do experimento	34
3.3.1.2 Protocolo de sincronização da onda de crescimento folicular e da ovulação para IATF 35	
3.3.1.3 Avaliações ultrassonográficas	36
3.3.1.4 Análise estatística	37
3.3.2 Resultados.....	38
3.4 EXPERIMENTO 2 – EFICIÊNCIA REPRODUTIVA NAS ERF E ERD	41
3.4.1 Materiais e métodos	41
3.4.1.1 Animais e local do experimento	41
3.4.1.2 Protocolo de sincronização da onda de crescimento folicular e da ovulação para IATF 42	

3.4.1.3 Avaliações ultrassonográficas	42
3.4.1.4 Análise estatística	44
3.4.2 Resultados.....	45
3.4.2.1 Eficiência reprodutiva nas ERF e ERD	45
3.4.2.2 Relação entre a resposta ao protocolo de sincronização e a eficiência reprodutiva	46
3.5 DISCUSSÃO	57
3.5.1 Respostas folicular e luteínica ao protocolo de sincronização nas ERF e ERD	57
3.5.2 Eficiência reprodutiva nas ERF e ERD	59
3.5.3 Relação entre a resposta ao protocolo de sincronização e a eficiência reprodutiva	63
3.6 CONCLUSÕES	66
3.7 IMPLICAÇÕES PRÁTICAS	66
3.7.1 Considerações acerca do manejo reprodutivo	66
3.7.2 Considerações acerca da dinâmica ovariana	68
3.7.3 Considerações acerca da eficiência reprodutiva	68
REFERÊNCIAS	71

1 INTRODUÇÃO

De acordo com o mais recente levantamento realizado pela Organização das Nações Unidas, o rebanho mundial de búfalos é de aproximadamente 200 milhões de animais (FAO, 2014). Devido a sua grande capacidade de adaptação, atualmente o búfalo doméstico (*Bubalus bubalis*) pode ser encontrado em diversos países do mundo e criado em diferentes condições geográficas e climáticas.

A bubalinocultura há muito é praticada em países em desenvolvimento como Paquistão, Bangladesh, Tailândia, Vietnã, Índia e China. Nesses países, o búfalo é utilizado para a produção de carne e leite, assim como a utilização da tração animal para o trabalho. No entanto, essa cultura já conquistou mercados mais exigentes em países desenvolvidos como Itália, Alemanha, Estados Unidos e Austrália que perceberam no búfalo a capacidade de produção de uma proteína animal de alta qualidade, tanto na carne quanto no leite, para a nutrição e segurança alimentar da população mundial.

Dentre os produtos oriundos da produção de búfalos, o leite é o que tem maior destaque. Algumas das características físicas do leite da búfala, como a maior proporção de gordura e proteína em relação ao leite bovino (VERRUMA; SALGADO, 1994) proporcionam maior rendimento e qualidade na produção de lácteos como a *mozzarella* (BASTIANETTO; ESCRIVÃO; OLIVEIRA, 2005), além do maior valor agregado desse subproduto. No entanto, o mercado de leite de búfalo ainda tem um grande desafio a enfrentar: a produção sazonal decorrente da estacionalidade reprodutiva da espécie (VALE; RIBEIRO, 2005; ZICARELLI, 2007, 2010).

A espécie bubalina é caracterizada reprodutivamente como poliéstrica estacional de dias curtos, pois apresenta marcada estacionalidade reprodutiva, a qual se intensifica conforme o distanciamento do equador (BARUSELLI et al., 2001b). Na região Sudeste do Brasil, onde se concentram aproximadamente 80% dos laticínios do país com o “Selo de Pureza 100% Búfalo” (ABCB, [2015]), a maioria das búfalas concentram seus partos durante os meses de fevereiro a abril (BARUSELLI et al., 1993, 2001b). Isso porque, nessa região, os dias de menor incidência luminosa do ano (proporção dia:noite de até 11:13 horas no outono-inverno; maio a julho) são considerados como o período de estação reprodutiva favorável (ERF). Em contrapartida, os dias de maior incidência luminosa (proporção dia:noite de até 13:11 horas na primavera-verão; dezembro a fevereiro) são considerados a estação reprodutiva desfavorável (ERD) para a espécie (ZICARELLI, 2010).

Nos meses que sucedem as parições (maio a julho), a disponibilidade de leite para comercialização chega a atingir o triplo da quantidade ofertada em relação a outros meses do ano (MACEDO et al., 2001; BERNARDES, 2007). Vale salientar que os períodos de maior demanda da *mozzarella*, durante as festas de fim de ano e as férias de verão entre dezembro e janeiro, são os momentos de menor oferta de leite para os laticínios.

Somando-se a isso, esse período de maior oferta de leite de búfalo no mercado coincide com o momento em que a quantidade e qualidade das pastagens começam a decrescer devido ao fim das chuvas de verão (GERDES et al., 2000). Este fato faz com que o momento de maior produção de leite das búfalas criadas a pasto seja durante um momento de baixa disponibilidade de forragem (outono-inverno), o que obriga o produtor a investir em suplementação protéico-energética e mineral para conseguir aumentar a quantidade e qualidade do leite produzido pelos animais.

Os bubalinocultores de leite do Brasil vêm buscando estratégias para desestacionalizar as parições de suas búfalas a fim de atingir maior regularidade na oferta de matéria prima durante todo o ano e aproveitar melhor a disponibilidade das pastagens durante a primavera e o verão. Isso é possível graças ao uso adequado de biotecnologias da reprodução como a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) (BERNARDES, 2007; ZICARELLI, 2007). Essa biotecnologia agrega os benefícios do melhoramento genético com o manejo reprodutivo, pois permite que as búfalas sejam artificialmente inseminadas com sêmen de touros provados, sem a necessidade de observação de cio e em dias e horários pré-determinados em épocas desfavoráveis para reprodução (CARVALHO; BERNARDES; BARUSELLI, 2011).

O protocolo de IATF à base de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) e prostaglandina ($\text{PGF}_{2\alpha}$), denominado Ovsynch (PURSLEY; MEE; WILTBANK, 1995), é amplamente difundido e utilizado em rebanhos bovinos leiteiros em todo o mundo. Esse protocolo também pode ser indicado para a sincronização da ovulação em búfalas durante a ERF (BARUSELLI; CARVALHO, 2005), quando aproximadamente 80% das búfalas estão ciclando (MONTEIRO et al., 2014). No entanto, durante a ERD quando as búfalas apresentam baixas taxas de ciclicidade (10-40%), esse protocolo não é capaz de induzir eficientemente a ovulação e a ciclicidade e interromper o anestro estacional (BARUSELLI et al., 2003b).

Situações de anestro também podem ser observadas em vacas bovinas de corte durante o período pós-parto precoce ou por deficiência nutricional (RHODES et al., 2003; SÁ FILHO et al., 2005). Nestas circunstâncias, semelhantemente às búfalas, fêmeas bovinas também apresentam comprometimento na resposta reprodutiva quando submetidas ao protocolo

Ovsynch (BARUSELLI et al., 2002), provavelmente devido a ausência de folículos com capacidade ovulatória ao momento do primeiro GnRH (BARROS; MOREIRA; FERNANDES, 1998).

Estudos prévios em bovinos mostraram que a progesterona (P4) produzida pelo corpo lúteo (CL) é capaz de aumentar a frequência dos pulsos de LH, o diâmetro do folículo pré-ovulatório e aumentar as concentrações circulantes de estradiol E2 (RHODES; ENTWISTLE; KINDER, 1996), assim como a associação entre P4 e estradiol (E2) ao início de um protocolo é capaz de sincronizar o início da onda de crescimento folicular e da ovulação (BO et al., 1995; RHODES et al., 2002).

Atualmente, a IATF é uma técnica consagrada, com protocolos de sincronização da onda de crescimento folicular e da ovulação muito bem estabelecidos para a espécie bubalina (BERBER; MADUREIRA; BARUSELLI, 2002; BARUSELLI; CARVALHO, 2005; BARUSELLI et al., 2007a,b). A associação P4/E2 é capaz de promover a desestacionalização reprodutiva e viabilizar a utilização da IATF durante a ERD (BARUSELLI; CARVALHO, 2005; BARUSELLI; CARVALHO; JACOMINI, 2009; CARVALHO; BERNARDES; BARUSELLI, 2011). Recentemente foi também comprovado que a adição de gonadotrofina coriônica equina (eCG) durante o protocolo de desestacionalização das búfalas melhora o desenvolvimento dos folículos pré-ovulatórios formados, assim como o diâmetro e a produção de P4 do CL formado após a ovulação, além de aumentar a taxa de prenhez por inseminação (P/IA) (CARVALHO et al., 2013).

Apesar de índices reprodutivos satisfatórios serem obtidos em búfalas sincronizadas com protocolos de IATF à base de P4/E2 durante a ERD (P/IA ~50%) (BARUSELLI; CARVALHO, 2005; BARUSELLI; CARVALHO; JACOMINI, 2009; CARVALHO et al., 2013), alguns estudos demonstraram altas taxas de perda gestacional quando búfalas foram inseminadas durante esse mesmo período (primavera/verão) (CAMPANILE et al., 2010). Após o diagnóstico de gestação 25 dias após a IATF em búfalas criadas na Itália (sistema de criação intensivo e clima temperado), foram descritas taxas de mortalidade embrionária de 10-45% (entre 25 a 45 dias) (CAMPANILE et al., 2005, 2007a, b, 2008, 2013; RUSSO et al., 2010; VECCHIO et al., 2007, 2010) e taxa de mortalidade fetal ao redor de 10-15% (entre 45 a 70 dias) (RUSSO et al., 2010; VECCHIO et al., 2007, 2010). Nas condições brasileiras de criação foram observadas baixas incidências de mortalidade embrionária entre 30 e 43 dias (~5%) e de mortalidade fetal entre 43 e 50 dias (2%) após a IA (BARUSELLI et al., 1997b). No entanto, estes dados foram obtidos durante a ERF (outono-inverno) após observação do cio natural de búfalas mantidas exclusivamente a pasto em condições climáticas tropicais.

Alguns estudos foram desenvolvidos para comparar a eficiência reprodutiva de búfalas durante as diferentes estações reprodutivas do ano (BARUSELLI et al., 2003b; CAMPANILE et al., 2013; ROSSI et al., 2014). No entanto, ambos os estudos se restringiram a utilização do protocolo de sincronização recomendado somente para a estação reprodutiva favorável (Ovsynch) e da P/IA como único indicador de eficiência reprodutiva. Dessa forma, permanecem desconhecidos os efeitos das estações reprodutivas sobre a eficiência reprodutiva, desde a concepção até o parto, de búfalas submetidas a protocolos de IATF à base de P4/E2 sob as mesmas condições de manejo e criação.

2 CAPÍTULO 1 - REVISÃO DA LITERATURA

2.1 MANEJO REPRODUTIVO DE BÚFALAS LEITEIRAS CRIADAS A PASTO

Há pouco mais de 20 anos, vem se observando no país significativa expansão de unidades industriais dedicadas à produção de derivados de leite de búfalas, o que é motivado não só pelo maior rendimento industrial, mas também pelo maior valor agregado dos seus produtos em relação aos lácteos bovinos. Mesmo com o destaque alçado pelo leite bubalino e seus derivados, observa-se que o búfalo ainda vem sendo predominantemente criado em pequenas e médias propriedades, que adotam a produção de leite “a pasto”, muitas vezes sem a suplementação necessária para compensar as variações sazonais das pastagens (BERNARDES, 2007).

Apesar de existirem propriedades que realizam a suplementação de volumosos nos períodos de pior oferta alimentar (outono e inverno), é pouco comum o fornecimento de alimentos concentrados nesse período, o que acaba se tornando um fator limitante à expressão do potencial produtivo efetivo dos animais (BERNARDES, 2007). Em função da sazonalidade reprodutiva (ZICARELLI, 2010), no sudeste do Brasil, o período de diminuição das chuvas de verão coincide com o período de maior produção leiteira (MACEDO et al., 2001). Mesmo nessas condições, é possível encontrar indivíduos com grande variação na produção de leite por lactação (< 1000 a >5000 kg de leite por lactação), o que mostra o potencial de evolução se os animais forem devidamente manejados e alimentados, e submetidos a processos de seleção e melhoramento genético (BERNARDES, 2007).

2.2 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL COMO FERRAMENTA PARA O MELHORAMENTO GENÉTICO DO REBANHO

O controle da produtividade leiteira permite a identificação de animais melhoradores para que se acelere o processo de melhoramento genético em um rebanho (BARUSELLI; CARVALHO, 2005). Após o processo de seleção, o uso de biotecnologias da reprodução, como a inseminação artificial (IA), permite que o material genético dos animais superiores

possa ser difundido para outros rebanhos comerciais (BARUSELLI et al., 2013). O emprego da IA em bovinos tem sido amplamente estudado e utilizado com sucesso em propriedades rurais de todo o mundo, permitindo que a melhoria genética dos rebanhos seja mais rápida e eficiente. No entanto, em bubalinos, esta biotécnica tem sido pouco empregada por criadores, devido a certas dificuldades na identificação das manifestações estrais e do momento apropriado para a realização da IA (BARUSELLI; CARVALHO, 2005).

2.2.1 Uso da inseminação artificial por observação de cio

A eficiência da IA em rebanhos bubalinos deve considerar os aspectos fisiológicos e comportamentais das búfalas. O emprego dessa biotecnologia pode ser severamente comprometido se baseada somente na observação de cio devido ao discreto comportamento homossexual das fêmeas e, dependendo da temperatura ambiental, a manifestação do comportamento de estro durante a noite e a madrugada (SINGH et al., 1984; BARUSELLI et al., 1993, 2007a; VALE; RIBEIRO, 2005; PORTO-FILHO et al., 2014).

Para a identificação do cio de bubalinos geralmente são necessárias duas ou mais observações diárias, ininterruptas, durante toda estação reprodutiva, além da necessidade de se detectar o início e o final do cio para realizar a IA no momento mais apropriado. Os resultados obtidos pela IA com detecção visual de cio demonstram média de 51,8% de taxa de concepção a primeira e de 57,9% à segunda inseminação, conferindo de 75% a 80% de taxa de prenhez a IA do rebanho no final da estação reprodutiva. Observa-se que estes índices apresentam grande variação conforme o manejo geral da propriedade (BARUSELLI; CARVALHO, 2005). Rebanhos com ineficiência na detecção do estro apresentam diminuição no desempenho reprodutivo, com conseqüente aumento do período de serviço e do intervalo entre partos. Devido a esses entraves, muitos criadores acabam optando por não utilizar essa importante biotecnologia para o melhoramento genético de seus rebanhos (BARUSELLI; CARVALHO; JACOMINI, 2009).

2.2.2 Uso de prostaglandinas (PGF_{2α})

Uma das formas de otimizar o uso da IA e facilitar o manejo da observação de cio seria lançando-se mão do uso de tratamentos hormonais para concentrar o aparecimento dos estros em períodos controlados. A sincronização com prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}) é uma ferramenta barata e efetiva para melhorar a eficiência da detecção do estro e o uso da IA em búfalos (CHAUHAN; SHARMA; SINGH, 1985; DIAZ; FRITSCH; RODRIGUES, 1994; MIRMAHMOUDI; PRAKASH, 2012; PORTO-FILHO et al., 2014).

Como descrito para bovinos, a manifestação de estro e ovulação podem ocorrer até 6 dias após a administração de PGF_{2α}, dependendo da responsividade do corpo lúteo (CL) e do estágio de desenvolvimento do folículo dominante ao momento da prostaglandina (BÓ; BARUSELLI; MARTÍNEZ, 2003). Da mesma forma, o intervalo entre o tratamento com PGF_{2α} e o início do cio em fêmeas bubalinas varia de acordo com o estágio de desenvolvimento folicular no momento da aplicação do fármaco (PORTO-FILHO et al., 2014). Animais com folículos antes da dominância manifestam cio de 4 a 6 dias após a administração do hormônio, e animais com um folículo dominante no momento da aplicação manifestam cio após 2 a 3 dias (DE RENSIS; LÓPEZ-GATIUS, 2007).

Porém, como descrito para búfalas criadas a pasto, mesmo durante a ERF, aproximadamente 20% das fêmeas aptas a reprodução estão em anestro pós-parto ou nutricional. Condição essa que se agrava durante a ERD quando aproximadamente 60% das búfalas se encontra em anestro, principalmente estacional (MONTEIRO et al., 2014). Dessa forma, a manipulação da ocorrência dos estros somente com PGF_{2α} para a realização da IA fica comprometida quando búfalas são mantidas exclusivamente a pasto em região de clima tropical e não preenchem os pré-requisitos nutricionais, de ciclicidade ou presença de CL para que ocorra efetiva sincronização dos estros.

2.2.3 Métodos de sincronização de cio como ferramenta de melhoramento genético e de manejo reprodutivo

Para facilitar o manejo e aumentar a eficiência da IA foram desenvolvidos protocolos que dispensam a necessidade de detecção do estro. O objetivo destes protocolos é sincronizar a fase luteínica, o crescimento folicular e a ovulação, permitindo o uso da inseminação

artificial em tempo fixo (IATF) mesmo em animais que não estão apresentando sinais de estro ou de ciclicidade. O uso destes protocolos tem colaborado para a difusão da técnica de IA em diversos rebanhos no Brasil e no mundo, possibilitado o melhoramento genético, com conseqüente aumento na produção de leite (BARUSELLI; CARVALHO; JACOMINI, 2009).

2.2.3.1 Uso do protocolo à base de GnRH+PGF_{2α}+GnRH (Ovsynch)

Diversos protocolos para sincronização do estro e da ovulação em fêmeas bovinas e bubalinas foram desenvolvidos, permitindo o uso de um programa com inseminação artificial em tempo fixo, sem a necessidade de detecção de cio. Em fêmeas bovinas, a associação da PGF_{2α} com a administração de GnRH (protocolo Ovsynch) (PURSLEY; MEE; WILTBANK, 1995) vem sendo amplamente utilizada para manipular a emergência de uma nova onda de crescimento folicular e sincronizar a ovulação (TENHAGEN et al., 2004; WILTBANK et al., 2011). A administração de GnRH em búfalas promove a ovulação de um folículo dominante (FD), sendo capaz de induzir 60-90% de ovulação nos animais tratados, com intervalo ao redor de 30 horas entre o GnRH e a ovulação (BERBER; MADUREIRA; BARUSELLI, 2002; BARUSELLI et al., 2003b). Satisfatórias taxas de P/IA podem ser obtidas em búfalas leiteiras por meio do protocolo Ovsynch, como mostrado no quadro 1.

Quadro 1 - Taxas de prenhez por inseminação (P/IA) de búfalas submetidas ao protocolo de IATF à base de GnRH e PGF_{2α} (Ovsynch)

P/IA ao protocolo Ovsynch, % (n/n)	Referência
48,5 (133/270)	(BARUSELLI et al., 2001a)
60,3 (184/305)	(BERBER; MADUREIRA; BARUSELLI, 2002)
44,3 (116/262)	(BARUSELLI et al., 2003a)
48,8 (472)	(BARUSELLI et al., 2003b)
44,4 (40/90)	(NEGLIA et al., 2003)
63,0 (131/209)	(CAMPANILE et al., 2005)
27,7 (23/83)	(DE RENSIS et al., 2005)
46,6 (166/356)	(NEGLIA et al., 2008)
52,9 (204/385)	(VECCHIO et al., 2010)
44,2 (138/312)	(CAMPANILE et al., 2011)
61,8 (94/152)	(CAMPANILE et al., 2013)
50,2 (1701/3391)	

Este protocolo promove a ovulação do FD pela aplicação de GnRH, regressão do CL pela administração de prostaglandina 7 dias depois e posterior controle da ovulação do novo FD por uma segunda injeção de GnRH. No entanto, para seu sucesso, este protocolo necessita da presença de um FD no momento do primeiro tratamento com GnRH (VASCONCELOS et al., 1999). Estudos prévios mostram que quando bovinos estão em anestro (sem CL), a resposta ao primeiro GnRH do protocolo Ovsynch é comprometida (BARROS; MOREIRA; FERNANDES, 1998), o que se reflete diretamente na menor taxa de prenhez de vacas bovinas submetidas ao protocolo à base de GnRH e prostaglandina em relação a protocolos que utilizam uma fonte de progesterona durante a sincronização (BARUSELLI et al., 2002).

Situação de anestro também é encontrada em búfalas durante os meses de primavera-verão (ERD) visto ser um animal reprodutivamente caracterizado como poliétrico estacional de dias curtos (BARUSELLI et al., 1993, 2001b; ZICARELLI, 2010). As búfalas intensificam a sazonalidade de acordo com o maior distanciamento do equador (ZICARELLI, 1997), o que também pôde ser observado no Brasil, quando Baruselli e cols. (2001) demonstraram que a sazonalidade das búfalas é mais acentuada em direção ao sul do país (ao redor de 24° de latitude), onde há marcada concentração dos partos.

A duração da luminosidade é negativamente correlacionada com o número de búfalas demonstrando comportamento de estro, e curtos períodos de escuridão artificial reduzem o problema de anestro durante os períodos de dias longos (SINGH et al. 2000). Portanto, o hormônio melatonina mostra ter papel fundamental sobre a regulação da liberação de GnRH e a secreção das gonadotrofinas e para a regulação sazonal da atividade ovariana de búfalas (ZICARELLI 1997).

Dessa forma, quando as fêmeas dessa espécie são submetidas ao protocolo Ovsynch durante a ERF (outono e inverno) apresentaram maior taxa de P/IA que as tratadas na ERD [48,8% (472/967) vs. 6,9% (6/86)] (BARUSELLI et al., 2003b). Esse resultado é indicativo de que, mesmo com estimulação hormonal exógena utilizando GnRH e PGF_{2α}, as búfalas em anestro estacional não respondem ao protocolo Ovsynch (BARUSELLI; CARVALHO; JACOMINI, 2009).

2.2.3.2 Desestacionalização da produção de leite a pasto

A sazonalidade reprodutiva das búfalas pode ser observada por meio da disponibilidade de leite à indústria. É possível verificar que a produção de leite na safra (outono-inverno) pode atingir o triplo da produção observada no verão (dezembro-janeiro). No mercado brasileiro, a demanda por derivados lácteos bubalinos é relativamente constante durante o ano, o que motiva as propriedades a desestacionalizar as parições a fim de atingir maior regularidade na oferta de matéria prima durante todo o ano, através do uso adequado de biotecnologias da reprodução (BERNARDES, 2007).

Como anteriormente exposto, o protocolo Ovsynch proporciona baixa taxa de concepção após a IATF em búfalas durante a estação reprodutiva desfavorável (primavera e verão) (BARUSELLI et al., 2003b). Nesta estação, as búfalas apresentam alta incidência de anestro, o que aumenta o intervalo parto concepção e, conseqüentemente, afeta negativamente o desempenho reprodutivo (BARUSELLI; CARVALHO; JACOMINI, 2009). Prévios estudos conduzidos com vacas em anestro pós-parto demonstraram que o tratamento com P4 proporciona aumento na pulsatilidade de LH (RHODES et al., 2002). O tratamento de vacas em anestro com P4 resulta no aumento das concentrações de E2, elevando a pulsatilidade da secreção de LH, o que é fundamental para o crescimento final do folículo pré-ovulatório e garantir a ocorrência da ovulação (RHODES et al., 2003). Dessa forma, a exposição de búfalas em anestro à P4 exógena surge como alternativa para a desestacionalização dos partos e produção de leite de búfalas submetidas a protocolos de sincronização da onda de crescimento folicular e da ovulação para IATF.

2.2.3.2.1 *Uso do protocolo à base de progesterona e estradiol (P4/E2)*

A Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Registro (UPDR-APTA) juntamente ao Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (VRA-FMVZ-USP) desenvolveu estudos para possibilitar a utilização da IATF durante as estações da primavera e verão (PORTO-FILHO, 2004; CARVALHO et al., 2007, 2013), viabilizando desta forma a introdução de material genético superior, a desestacionalização dos partos, a otimização da produção leiteira – maior número

de búfalas produzindo leite durante o período de maior disponibilidade de forragem –, proporcionando assim, uma produção de leite mais linear durante o ano (CARVALHO; BERNARDES; BARUSELLI, 2011).

O protocolo atual preconizado para a desestacionalização consiste na inserção de um dispositivo intravaginal liberador de progesterona (P4) associado à injeção intramuscular de estradiol (E2; benzoato de estradiol - BE), em dia aleatório do ciclo estral. Nove dias mais tarde, aplica-se prostaglandina F2 mais a eCG, seguida pela aplicação de GnRH no D11. Com 16 horas do último tratamento, realiza-se a IATF (CARVALHO; BERNARDES; BARUSELLI, 2011).

Somando-se aos efeitos benéficos do protocolo à base de P4/E2, a adição da gonadotrofina coriônica equina (eCG) ao momento da retirada do dispositivo intravaginal liberador de P4 mostrou-se como ferramenta eficaz para potencializar os resultados de P/IA de programas de IATF em búfalas durante a ERD do ano (CARVALHO et al., 2013) (MURUGAVEL et al., 2009). Resultados satisfatórios são descritos para búfalas submetidas ao protocolo de IATF à base de P4/E2 durante a ERD (Tabela 1).

Tabela 1 - Taxas de prenhez por inseminação (P/IA) de búfalas submetidas ao protocolo de IATF à base de progesterona, com ou sem eCG

P/IA ao protocolo à base de P4, % (n/n)		Referência
<i>sem eCG</i>	<i>com eCG</i>	
-	30,3 (33/109)	(NEGLIA et al., 2003)
-	43,1 (22/51)	(PORTO-FILHO, 2004)
46,5 (40/86)	-	(DE RENSIS et al., 2005)
-	52,1 (126/242)	(CARVALHO et al., 2007)
27,3 (9/33)	40,6 (13/32)	(MURUGAVEL et al., 2009)
39,4 (50/127)	52,7 (68/129)	(CARVALHO et al., 2013)

2.3 EFICIÊNCIA REPRODUTIVA DE BÚFALAS LEITEIRAS

É possível encontrar “taxas de fertilidade” acima de 90% descritas para rebanhos bubalinos leiteiros (BERNARDES, 2007). Apesar dos altos índices, esses indicadores não mostram precisamente o número de serviços necessários por concepção, o intervalo parto-concepção, a proporção de gestações que vieram a termo, bem como o tempo de intervalo entre os partos que os animais apresentaram. Por se tratarem de dados obtidos somente de monta natural, essas “taxas de fertilidade” também se restringem à eficiência reprodutiva durante a estação reprodutiva favorável do ano (outono-inverno).

A literatura carece de trabalhos que comprovem a eficiência reprodutiva de búfalas leiteiras, desde a concepção até o parto, de acordo com as estações reprodutivas favorável e desfavorável do ano. Foram encontrados dois trabalhos realizados na Itália que descrevem a eficiência reprodutiva de búfalas submetidas a programas de IATF (Ovsynch) durante as ERF e ERD (Tabela 2). Estes trabalhos mostram as taxas de prenhez obtidas por inseminação (P/IA) e de mortalidade embrionária (ME) entre o diagnóstico precoce de gestação (25 dias após a IA) e a confirmação desse diagnóstico (45 dias após a IA). No entanto, estas pesquisas não acompanham as gestações até o momento do parto e só utilizam o protocolo de sincronização à base de GnRH e prostaglandina, que não funciona para búfalas criadas a pasto nas condições criatórias tropicais do Brasil.

Tabela 2 - Taxas de prenhez por inseminação (P/IA) e mortalidade embrionária (ME) em búfalas submetidas ao protocolo Ovsynch de sincronização da ovulação para IATF durante as estações reprodutivas favorável (ERF) e desfavorável (ERD)

ERF		ERD		Referência
P/IA, % (n/n)	ME, % (n/n)	P/IA, % (n/n)	ME, % (n/n)	
55,2 (47/85)	14,8 (7/47)	70,1 (47/67)	31,9 (15/47)	(CAMPANILE et al., 2013)
50,0 (342/684)	7,1 (26/368)	47,9 (318/664)	9,9 (35/354)	(ROSSI et al., 2014)

Apesar de existir grande variação entre as taxas de mortalidade embrionária relatadas para búfalas submetidas a IA, somente poucos trabalhos descreveram taxas de mortalidade fetal entre 44-45 dias após a IA e 50/70/90 dias após a inseminação (Quadro 2), sem nenhum relato até o nascimento.

Quadro 2 - Taxas de mortalidade embrionária (ME) e mortalidade fetal (MF) em búfalas submetidas a protocolos de sincronização da ovulação para IATF

ME, % (n/n)¹	MF, % (n/n)	Referência
4,7 (7/145)	2,0 (3/138) ²	(BARUSELLI et al., 1997b)
45,0 (59/131)	-	(CAMPANILE et al., 2005)
23,0 (43/187)	-	(CAMPANILE et al., 2007a)
17,1 (39/228)		(CAMPANILE et al., 2007b)
8,8 (?)	13,4 (?) ³	(VECCHIO et al., 2007)
19,6 (29/148)		(CAMPANILE et al., 2008b)
16,9 (28/166)		(NEGLIA et al., 2008)
27,1 (38/140)	13,7 (14/102) ⁴	(RUSSO et al., 2010)
21,1 (43/204)	8,1 (13/161) ⁴	(VECCHIO et al., 2010)
23,4 (22/94)	-	(CAMPANILE et al., 2013)
8,5 (61/722)	-	(ROSSI et al., 2014)

¹Mortalidade embrionária entre 25 e 45 dias após a IA;

²Mortalidade fetal entre 44 e 50 dias após a IA;

³Mortalidade fetal entre 45 e 90 dias após a IA;

⁴Mortalidade fetal entre 45 e 70 dias após a IA;

3 CAPÍTULO 2 – EFICIÊNCIA REPRODUTIVA DE BÚFALAS LEITEIRAS SUBMETIDAS A PROTOCOLO DE IATF À BASE DE P4/E2 E ECG DURANTE AS ESTAÇÕES REPRODUTIVAS FAVORÁVEL E DESFAVORÁVEL

3.1 HIPÓTESE

A hipótese deste projeto de pesquisa é de que as búfalas submetidas à sincronização da ovulação para IATF durante a estação reprodutiva desfavorável apresentam comprometimento na resposta folicular, luteínica e na taxa de concepção, além de maiores taxas de mortalidade embrionária e fetal quando comparadas às búfalas submetidas à sincronização da ovulação para IATF durante a estação reprodutiva favorável (Figura 1).

Figura 1 - Modelo hipotético gráfico

3.2 OBJETIVO GERAL

O objetivo dessa tese foi comparar a eficiência reprodutiva de búfalas leiteiras submetidas a protocolo de IATF à base de progesterona/estrógeno (P4/E2) e gonadotrofina coriônica equina (eCG) durante as estações reprodutivas favorável (ERF; maio, junho e julho) e desfavorável (ERD; novembro, dezembro e janeiro).

3.2.1 Objetivos específicos

Os objetivos específicos dessa tese foram:

- Comparar a dinâmica ovariana por meio dos diâmetros do folículo dominante ($\emptyset$ FD) e do corpo lúteo ($\emptyset$ CL), assim como a distribuição e dispersão das ovulações de búfalas submetidas à IATF a base de P4/E2 e eCG durante as ERF e ERD do ano (Experimento 1);
- Comparar as taxas de ciclicidade, ovulação e prenhez à IATF (P/IA) aos 30 e 45 dias, assim como as taxas de mortalidade embrionária (ME), mortalidade fetal (MF) e perda gestacional (PG) em búfalas submetidas à IATF a base de P4/E2 e eCG durante as ERF e ERD do ano (Experimento 2).
- Correlacionar as variáveis ovarianas, tanto foliculares quanto luteínicas, com cada uma das respectivas taxas de ovulação, P/IA aos 45 d, ME, MF e PG.

3.3 EXPERIMENTO 1 – RESPOSTAS FOLICULAR E LUTEÍNICA AO PROTOCOLO DE SINCRONIZAÇÃO NAS ERF E ERD

3.3.1 Materiais e métodos

3.3.1.1 Animais e local do experimento

O experimento foi conduzido em uma fazenda comercial de produção de leite de búfalas no Vale do Ribeira (Fazenda 1), localizada no Estado de São Paulo, Brasil (hemisfério sul). Um total de 51 búfalas multíparas cruzadas (Murrah e Mediterrâneo) foram utilizadas e mantidas exclusivamente em pastos de *Brachiaria spp.*, com livre acesso a água. Vinte e cinco búfalas foram usadas durante a ERF (solstício de inverno – maio a julho) e vinte e seis búfalas foram utilizadas durante a ERD (solstício de verão – novembro a janeiro). Os dados de dias em lactação (DEL) e escore de condição corporal (ECC) das fêmeas eram, respectivamente, $81,2 \pm 5,4$ dias e $3,6 \pm 0,1$ durante a ERF e $47,0 \pm 4,1$ dias e $3,8 \pm 0,1$ durante a ERD, no primeiro dia do protocolo de IATF. Foi utilizada a escala de 1-5 para ECC, onde 1 corresponde a animais caquéticos e 5 a animais obesos (BARUSELLI et al., 2001b).

3.3.1.2 Protocolo de sincronização da onda de crescimento folicular e da ovulação para IATF

Todas as búfalas foram submetidas ao mesmo protocolo de IATF de 12 dias de duração, como previamente estabelecido para a espécie (BARUSELLI et al., 2007b). Em dias aleatórios do ciclo estral (D-12; 16:00), todas as búfalas receberam um dispositivo intravaginal contendo 1 g de P4 (iP4; Sincrogest®, Ourofino Agronegócio) mais 2,0 mg de benzoato de estradiol i.m. (Sincrodiol®, Ourofino Agronegócio) (Figura 2). No D-3 (16:00), as fêmeas receberam 0,53 mg de PGF2 α i.m. (Cloprostenol, Sincrocio®, Ourofino Agronegócio) e 400 UI de eCG i.m. (Novormon®, MSD Saúde Animal), seguido de remoção do iP4. No D-1 (16:00), 10 μ g de acetado de buserelina (GnRH, Sincroforte®, Ourofino Agronegócio) foram administrados i.m. A IATF foi realizada 16 horas após a aplicação do GnRH (D0; 8:00). Todas as inseminações foram realizadas pelo mesmo inseminador usando sêmen congelado de um único touro com fertilidade previamente avaliada em programas de IATF. Todas as partidas utilizadas foram avaliadas por meio de análises computadorizadas das células espermáticas (CASA), usando o sistema Hamilton Thorne (Hamilton Thorne Research, Beverly, USA) utilizado para bovinos. As avaliações foram realizadas no Laboratório de Andrologia do Departamento de Reprodução Animal da Universidade de São Paulo.

3.3.1.3 Avaliações ultrassonográficas

As fêmeas foram submetidas a avaliações ultrassonográficas para dinâmica ovariana (transdutor linear de 5.0 MHz, Chison D600Vet, Shenzhen, China), realizadas pelo mesmo examinador. As fêmeas foram avaliadas de acordo com: ciclicidade [presença de CL no momento da colocação do *i*P4 (CL D-12) e/ou no dia da retirada do mesmo (CL D-3)]; diâmetro do folículo dominante ($\emptyset$ FD) no momento da retirada do *i*P4 (0 h); $\emptyset$ FD um dia depois (24 h); $\emptyset$ FD no momento da aplicação de GnRH (48 h); e $\emptyset$ FD no momento da IATF (60 h); diâmetro do CL ($\emptyset$ CL) seis dias após a IATF ($\emptyset$ CL D+6); dez dias após a IATF ($\emptyset$ CL D+10); e quatorze dias após a IATF ($\emptyset$ CL D+14); taxa de crescimento do folículo dominante (mm/hora; calculada como o crescimento do $\emptyset$ FD entre a retirada do *i*P4 e a IATF dividindo por 60 horas).

A taxa de ovulação (Ov) foi determinada por meio de exames ultrassonográficos realizados duas vezes ao dia, desde a IATF até 48 horas após (24 |- 48, 48 |- 60, 60|- 72, 72|- 84, 84|- 96 e 96|- 108 h após a retirada do *i*P4). Foi determinada ovulação antes da IA quando a búfala ovulou entre a retirada do *i*P4 e a IATF. O diagnóstico de prenhez foi realizado aos 30 (P/AI 30 d) e aos 45 (P/AI 45 d) dias após a IATF, com a detecção de um embrião compatível com estes períodos (No. de búfalas prenhes / No. de búfalas inseminadas). A mortalidade embrionária (ME) foi determinada quando, aos 45 dias após a IATF, os embriões ou seus batimentos cardíacos estavam ausentes em relação ao número total de fêmeas que apresentavam embrião aos 30 dias após a IATF $\{[(\text{No. de búfalas prenhes aos 30 d} - \text{No. de búfalas prenhes aos 45 d}) / \text{No. de búfalas prenhes aos 30 d}] * 100\}$.

Figura 2 - Procedimentos para avaliar as respostas folicular e luteínica ao protocolo de sincronização da ovulação nas estações reprodutivas favorável (n=25) e desfavorável (n=26) do ano

Fonte: Monteiro (2015)

BE – 2 mg de benzoato de estradiol

iP4 – Dispositivo Intravaginal de Progesterona

PGF_{2α} – 0,53 mg de cloprostenol sódico

eCG – 400 UI de gonadotrofina coriônica equina

GnRH – 10 µg de busserelina

US – Exame de ultrassonografia

3.3.1.4 Análise estatística

As variáveis contínuas foram apresentadas como média mais ou menos erro padrão da média (média $\pm$ EPM) e porcentagem (%) para frequência de ocorrência nas variáveis binomiais. A comparação entre as variáveis de acordo com a estação do ano (ERF ou ERD) foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA), usando o procedimento GLIMMIX do SAS[®] versão 9.3 (SAS/STAT, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

Os modelos estatísticos foram compostos pelas variáveis classificatórias (ER), efeitos lineares de DEL, ECC e CL. As variáveis-resposta contínuas foram: ØFD, Ø do folículo ovulatório, taxa de crescimento do folículo dominante e ØCL (dist = normal). As variáveis-resposta binomiais foram: CL, ovulação antes da IA, Ov, P/AI 30 d, P/AI 45 d e ME (dist = binomial). A avaliação de folículo (ØFD às 0, 24, 48 e 60 h após a retirada do iP4) e CL (ØCL aos 6, 10 e 14 dias após a IATF) ao longo do tempo foi realizada como medidas repetidas no tempo, considerando os efeitos de ER, tempo e suas interações (ER*tempo). Adicionalmente, o efeito da ER na distribuição e dispersão das ovulações foi avaliada entre 24 e 48 h, 48 e 60 h, 60 e 72 h, 72 e 84 h, 84 e 96 h e entre 96 e 108 h após a retirada do iP4. A dispersão das ovulações foi determinada por meio do Teste de Bartlett.

As variáveis-resposta contínuas foram submetidas aos testes de normalidade de resíduos e homogeneidade de variâncias, por meio do *Guided Data Analysis Solutions* do SAS. As variáveis que não obedeceram aos pressupostos foram transformadas em conformidade. Os gráficos foram confeccionados usando o programa Sigmaplot (versão 12.0). As tabelas foram confeccionadas usando o programa Microsoft Excel versão 2007 para Windows 7.0. Diferença significativa foi considerada quando $P \leq 0,05$.

3.3.2 Resultados

Os resultados do presente estudo estão sumarizados na Tabela 3. A taxa de ciclicidade foi de 100,0% (25/25) para as búfalas sincronizadas durante a ERF e de 61,5% (16/26) para as búfalas sincronizadas durante a ERD ($P = 0,97$). Como mostrado na figura 3, o desenvolvimento do diâmetro folicular após a retirada do dispositivo intravaginal de progesterona foi similar entre os animais tratados nas diferentes ER ($P = 0,80$). Pôde ser observado somente efeito de tempo ($P < 0,01$) no crescimento folicular após a retirada do *iP4* em ambas as estações. No entanto, nenhuma diferença na taxa de crescimento do FD foi observada quando comparadas as ER ($P = 0,99$).

Figura 3 - Diâmetro do folículo dominante (média±EPM) após a retirada do dispositivo intravaginal liberador de progesterona (iP4) em búfalas leiteiras submetidas a dinâmica ovariana durante protocolo de IATF à base de P4/E2 e eCG nas estações reprodutivas favorável (ERF; n=25) e desfavorável (ERD; n=26) do ano

Tabela 3 - Dados produtivos e reprodutivos (média±EPM) de búfalas leiteiras submetidas a protocolo de IATF à base de P4/E2 e eCG nas estações reprodutivas favorável (ERF) e desfavorável (ERD) do ano

	ERF	ERD	P
No. de animais	25	26	-
DEL (dias)	81,2±5,4	47,0±4,1	<0,01
ECC (1-5)	3,6±0,1	3,8±0,1	0,18
Taxa de crescimento do FD (mm/h) ¹	0,06±0,0	0,07±0,0	0,99
Taxa de ovulação (%)	96,0 (24/25)	92,3 (24/26)	0,87
Ø folículo ovulatório (mm)	14,3±0,4	14,2±0,3	0,94
Intervalo entre retirada do iP4 e a ovulação (h)	76,5±1,9	72,0±2,5	0,85
Intervalo entre GnRH e a ovulação (h)	28,5±1,9	24,0±2,5	0,85
Taxa de ovulação antes da IA (%) ²	12,5 (3/24)	37,5 (9/24)	0,18
P/IA aos 30 dias (%) ³	60,0 (15/25)	61,5 (16/26)	0,95
P/IA aos 45 dias (%) ⁴	60,0 (15/25)	61,5 (16/26)	0,95
ME (%) ⁵	0,0 (0/15)	0,0 (0/16)	1,00

¹Taxa de crescimento do FD – calculada como o crescimento do ØFD entre a retirada do iP4 e a IATF, dividido por 60 horas;

²Taxa de ovulação antes de IA – foi determinada quando a búfala ovulou antes do momento da IATF (D0);

³P/IA 30 d – prenhez por IA 30 d após a IATF;

⁴P/IA 45 d – prenhez por IA 45 d após a IATF;

⁵ME - mortalidade embrionária determinada quando, aos 45 dias após a IATF, os embriões ou seus batimentos cardíacos estavam ausentes em relação ao número total de fêmeas que apresentavam embrião aos 30 dias após a IATF

O mesmo ocorreu com as respostas ovulatórias (Tabela 3), como taxa de ovulação ($P = 0,87$), taxa de ovulação antes da IA ($P = 0,18$), $\emptyset$ do folículo ovulatório ($P = 0,94$) e o intervalo entre a retirada do *iP4* e a ovulação ($P = 0,85$) e o tratamento com GnRH e a ovulação ($P = 0,85$). A distribuição ($P = 0,85$) e a dispersão das ovulações foram similares ($P = 0,18$), em ambas as ER (Figura 4).

Figura 4 - Distribuição e dispersão das ovulações (%) de búfalas leiteiras submetidas a protocolo de IATF à base de P4/E2 e eCG nas estações reprodutivas favorável (ERF; $n=25$) e desfavorável (ERD; $n=26$) do ano

A formação do CL após a ovulação sincronizada (Figura 5) e o seu crescimento deferiram entre as ER ($ER \times \text{Tempo } P < 0,01$). Verificou-se que o $\emptyset$ CL 10 dias após a IATF foi maior para as búfalas sincronizadas na ERF. No entanto, nenhuma diferença foi detectada no $\emptyset$ CL 14 dias após a IATF.

Figura 5 - Diâmetro do corpo lúteo (média±EPM) após a IATF de búfalas leiteiras submetidas a protocolo de IATF à base de P4/E2 e eCG nas estações reprodutivas favorável (ERF; n=25) e desfavorável (ERD; n=26) do ano

* indica $P < 0,05$

3.4 EXPERIMENTO 2 – EFICIÊNCIA REPRODUTIVA NAS ERF E ERD

3.4.1 Materiais e métodos

3.4.1.1 Animais e local do experimento

Este experimento foi conduzido em cinco fazendas comerciais do Vale do Ribeira, (Fazendas 1, 2, 3, 4 e 5) localizadas no Estado de São Paulo (Tabela 4), Brasil (hemisfério sul). Um total de 351 búfalas cruzadas de Murrah e Mediterrâneo (37 primíparas e 314 múltíparas) foram utilizadas e mantidas exclusivamente em pastos de *Brachiaria spp.*, com livre acesso a água. Cento e sessenta e oito búfalas foram utilizadas durante a ERF (n=168;

solstício de inverno – maio a julho) e cento e oitenta e três búfalas foram utilizadas durante a ERD (n=183; solstício de verão – novembro a janeiro). Os dados de DEL e ECC das fêmeas eram, respectivamente, $111,1 \pm 8,8$ dias e $3,3 \pm 0,0$ para a ERF e $144,3 \pm 8,6$ dias e $3,3 \pm 0,0$ para a ERD no primeiro dia do protocolo de IATF. Foi utilizada a escala de 1-5 para ECC, onde 1 corresponde a animais caquéticos e 5 a animais obesos (BARUSELLI et al., 2001b).

Tabela 4 - Distribuição do número de búfalas utilizadas de acordo com cada fazenda nas estações reprodutivas favorável (ERF) e desfavorável (ERD) do ano

produtivas favorável (ERF) e desfavorável (ERD) do ano					
Fazenda	Estação Reprodutiva				Total
	Favorável		Desfavorável		
	Primípara	Múltipara	Primípara	Múltipara	
1	0	25	0	26	51
2	2	12	10	15	39
3	0	70	9	68	147
4	9	12	6	14	41
5	1	37	0	35	73
Total	12	156	25	158	351

3.4.1.2 Protocolo de sincronização da onda de crescimento folicular e da ovulação para IATF

Todas as búfalas foram submetidas ao mesmo protocolo de IATF descrito no Experimento 1 (Figura 6).

3.4.1.3 Avaliações ultrassonográficas

As fêmeas foram submetidas a avaliações ultrassonográficas para dinâmica ovariana (transdutor linear de 5.0 MHz, Chison D600Vet, Shenzhen, China), realizadas pelo mesmo examinador.. As fêmeas foram avaliadas de acordo com: ciclicidade [presença de CL no momento da colocação do iP4 (CL D-12) e/ou no dia da retirada do mesmo (CL D-3)]; diâmetro do folículo dominante no momento da retirada do iP4 (ØFD D-3) e no momento da IATF (ØFD D0); diâmetro do CL dez dias após a IATF (ØCL D+10); taxa de crescimento do

folículo dominante (mm/hora; calculada como o crescimento do ØFD entre a retirada do *iP4* e a IATF dividindo por 60 horas).

Figura 6 - Procedimentos realizados para determinar as taxas de ovulação, concepção e mortalidade embrionária nas búfalas leiteiras submetidas ao protocolo de IATF nas estações reprodutivas favorável (ERF; n=168) e desfavorável (ERD; n=183) do ano

Fonte: Monteiro, 2015

BE – 2 mg de benzoato de estradiol
iP4 – Dispositivo Intravaginal de Progesterona
 PGF_{2α} – 0,53 mg de cloprostenol sódico
 eCG – 400 UI de gonadotrofina coriônica equina
 GnRH – 10 µg de buserelina
 US – Exame de ultrassonografia

A taxa de ovulação (Ov) foi determinada 10 dias após a IATF de acordo com a presença ou ausência de CL no mesmo ovário do FD nos D-3 e D0 do protocolo de sincronização. Na mesma avaliação, quando foi detectada a ausência de CL e a presença de um folículo $\geq 20,0$ mm no mesmo ovário que estava o FD durante o protocolo, foi então considerada a ocorrência de cisto folicular. Foi considerada ocorrência de ovulação antes da IA quando a búfala apresentava um FD ≥ 7 mm no D-3 e um CL 10 dias após a IATF no mesmo ovário, no entanto, sem nenhum folículo ≥ 5 mm no dia da IA (D0).

O diagnóstico de prenhez foi realizado aos 30 (P/AI 30 d) e aos 45 (P/AI 45 d) dias após a IATF com a detecção de um embrião viável compatível com estes períodos (No. de búfalas prenhes / No. de búfalas inseminadas). A mortalidade embrionária (ME) foi determinada quando, aos 45 dias após a IATF, os embriões ou seus batimentos cardíacos estavam ausentes em relação ao número total de fêmeas que apresentavam embrião aos 30 dias após a IATF $\{[(\text{No. de búfalas prenhes aos 30 d} - \text{No. de búfalas prenhes aos 45 d}) / \text{No. de búfalas prenhes aos 30 d}] * 100\}$. Os partos das búfalas diagnosticadas como prenhez aos 45 dias após a IATF foram acompanhados em 4 das 5 fazendas utilizadas (Fazendas 1, 2, 3 e 4). A mortalidade fetal (MF) foi determinada quando uma búfala diagnosticada como prenhe aos

45 dias após a IATF não pariu ou pariu um bezerro já morto na data esperada de parto $\{[(\text{No. de búfalas prenhes aos 45 d} - \text{No. de bezerros vivos após o parto de búfalas prenhez aos 45 d}) / \text{No. de búfalas prenhes aos 45 d}] * 100\}$. A perda gestacional (PG) foi determinada quando a búfala diagnosticada como prenhe aos 30 dias não pariu ou pariu um bezerro já morto na data esperada de parto $\{[(\text{No. de búfalas prenhes aos 30 d} - \text{No. de bezerros vivos após o parto de búfalas prenhez aos 30 d}) / \text{No. de búfalas prenhes aos 30 d}] * 100\}$.

3.4.1.4 Análise estatística

As variáveis contínuas foram apresentadas como média mais ou menos erro padrão da média (média $\pm$ EPM) e porcentagem (%) para frequência de ocorrência nas variáveis binomiais. A comparação entre as variáveis de acordo com a estação do ano (ERF ou ERD), fazendas (1, 2, 3, 4 e 5) bem como suas interações foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA), usando o procedimento GLIMMIX do SAS[®] versão 9.3 (SAS/STAT, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

Os modelos estatísticos foram formados por variáveis classificatórias (ER, Fazenda e ER*Fazenda), efeito linear de DEL, ECC, CL, lote de IATF e categoria (primípara e múltipara). As variáveis-resposta contínuas foram: ØFD D-3, ØFD D0, taxa de crescimento do folículo dominante e ØCL (dist = normal). As variáveis-resposta binomiais foram: CL, ovulação antes da IA, Ov, P/AI 30 d, P/AI 45 d, ME, MF e PG (dist = binomial). Análises de correlação foram realizadas por meio do procedimento CORR RANK do SAS. A partir das correlações foram determinadas as relações entre o ØFD nos D-3 e D0 com a presença de CL D-3, taxa de ovulação, ØCL, taxa de P/AI 45 d e com a ocorrência de ME, MF e PG. Curvas de regressão logística foram criadas usando os coeficientes gerados por meio do *Interactive Data Analysis* do SAS [Logit=intercept+slop*(ØFD)]. As curvas de probabilidade foram obtidas por meio da fórmula: $Y = [\text{EXP}(\text{logit}) / 1 + \text{EXP}(\text{logit})] * 100$.

Adicionalmente, foram também gerados os fatores de risco ajustados (*adjusted odds ratio* - AOR) com seus respectivos intervalos de confiança (IC- 95%) para a ocorrência de P/AI 45 d e MF em relação a alguns fatores como: Fazenda (1, 2, 3, 4 e 5); Paridade (*primíparas e múltiparas*); DEL (44,9 $\pm$ 1,4, 102,1 $\pm$ 2,9 e 241,1 $\pm$ 11,0); ECC ($\leq$ 2,5, 3,0, 3,5 e $\geq$ 4,0); presença ou não de CL no dia da retirada do iP4 (*com CL D-3 e sem CL D-3*); e

Ovulação antes da IA (*Antes da IA e Após a IA*). Os resultados foram apresentados como proporção (%) e AOR.

As variáveis-resposta contínuas foram submetidas aos testes de normalidade de resíduos e homogeneidade de variâncias, por meio do *Guided Data Analysis Solutions* do SAS. As variáveis que não obedeceram aos pressupostos foram transformadas em conformidade. Os gráficos foram confeccionados usando o programa Sigmaplot 12 (Systat Software GmbH, Erkrath, Alemanha). As tabelas foram confeccionadas usando o programa Microsoft Excel versão 2007 para Windows 7.0. Diferença significativa foi considerada quando $P \leq 0,05$. Foi considerado tendência quando $P > 0,05$ e $\leq 0,10$.

3.4.2 Resultados

3.4.2.1 Eficiência reprodutiva nas ERF e ERD

Os resultados estão descritos na Tabela 5. Fêmeas sincronizadas durante a ERD apresentaram menor taxa de ciclicidade ($P = 0,02$). Apesar dessa diferença na taxa de ciclicidade, não foram detectadas diferenças no ØFD D-3 ($P = 0,35$), ØFD D0 ($P = 0,47$), taxa de crescimento do folículo dominante ($P = 0,92$) e ØCL D+10 ($P = 0,20$). Da mesma forma, as taxas de ovulação ($P = 0,19$), de ovulação antes da IA ($P = 0,58$), de cisto folicular ($P = 0,98$), de P/IA nos dias 30 ($P = 0,31$), 45 ($P = 0,37$) e as taxas de ME ($P = 0,95$), MF ($P = 0,13$) e PG ($P = 0,13$) também se apresentaram similares para ambas as ER.

Tabela 5 - Dados produtivos e reprodutivos (média±EPM) de búfalas leiteiras submetidas a protocolo de IATF à base de P4/E2 e eCG nas estações reprodutivas favorável (ERF) e desfavorável (ERD) do ano

	ERF	ERD	P
No. de animais	168	183	-
Ciclicidade (%) ¹	76,2 (128/168)	42,6 (78/183)	0,02
ØFD D-3 (mm) ²	9,6±0,2	9,8±0,2	0,35
ØFD D0 (mm) ²	13,1±0,2	13,2±0,2	0,47
Taxa de crescimento do FD (mm/h) ³	0,06±0,0	0,06±0,0	0,92
Taxa de ovulação (%)	86,9 (146/168)	83,5 (152/182)	0,19
Taxa de ovulação antes da IA (%) ⁴	13,0 (19/146)	21,0 (32/152)	0,58
Cisto folicular (%) ⁵	2,4 (4/168)	2,2 (4/183)	0,98
ØCL D+10 (mm) ⁶	19,0±0,3	18,4±0,2	0,20
P/IA aos 30 d (%) ⁷	66,7 (112/168)	62,7 (111/177)	0,31
P/IA aos 45 d (%) ⁸	64,8 (107/165)	60,2 (106/176)	0,37
ME (%) ⁹	1,8 (2/111)	3,6 (4/110)	0,95
MF (%) ¹⁰	21,9 (18/82)	8,0 (7/87)	0,13
PG (%) ¹¹	23,8 (20/84)	12,1 (11/91)	0,13

¹Ciclicidade – a búfala foi considerada cíclica quando da presença de um CL ao momento da colocação do iP4 (CL D-12) e/ou no dia da retirada do mesmo (CL D-3);

²ØFD – diâmetro do folículo dominante no dia da retirada do iP4 (D-3) e no dia da IATF (D0);

³Taxa de crescimento do FD – calculada como o crescimento do ØFD entre a retirada do iP4 e a IATF, dividido por 60 horas;

⁴Taxa de ovulação antes da IA - quando a búfala apresentava um FD ≥ 7 mm no D-3 e um CL 10 dias após a IATF no mesmo ovário, no entanto, sem nenhum folículo ≥ 5 mm no dia da IA (D0);

⁵Cisto folicular – quando foi detectada a ausência de CL e a presença de um folículo $\geq 20,0$ mm no mesmo ovário que estava o FD durante o protocolo;

⁶ØCL D+10 – diâmetro do CL 10 dias depois da IATF;

⁷P/IA 30 d – prenhez por IA 30 d após a IATF;

⁸P/IA 45 d – prenhez por IA 45 d após a IATF;

⁹ME - mortalidade embrionária determinada quando, aos 45 dias após a IATF, os embriões ou seus batimentos cardíacos estavam ausentes em relação ao número total de fêmeas que apresentavam embrião aos 30 dias após a IATF

¹⁰MF – mortalidade fetal foi determinada quando uma búfala diagnosticada como prenhe aos 45 dias após a IATF não pariu ou pariu um bezerro já morto na data esperada de parto;

¹¹PG – perda gestacional foi determinada quando a búfala diagnosticada como prenhe aos 30 dias não pariu ou pariu um bezerro já morto na data esperada de parto

3.4.2.2 Relação entre a resposta ao protocolo de sincronização e a eficiência reprodutiva

Os dados de dinâmica ovariana apresentaram correlação com vários índices reprodutivos (Tabela 6). A presença de CL no D-3 do protocolo de IATF foi correlacionada negativamente com o diâmetro do folículo dominante no mesmo dia. Entretanto, foi observada apenas tendência de correlação com o diâmetro do FD no dia da IATF (D0). Também, a presença do CL no D-3 mostrou correlação positiva com a ocorrência de

mortalidade fetal entre o diagnóstico de gestação realizado 45 dias após a IATF e o nascimento dos produtos.

O ØFD D-3 apresentou correlação positiva com o ØFD D0, com o ØCL D+10 e com as taxas de ovulação e de P/IA aos 30 e 45 dias após a IATF. No mesmo sentido, o ØFD D0 também correlacionou positivamente com o ØCL D+10 e com as taxas de ovulação e de P/IA aos 30 e 45 dias após a IATF. Em contrapartida, o ØFD D0 apresentou correlação negativa com a ocorrência de mortalidade embrionária.

Semelhantemente às medidas de ØFD realizadas durante o protocolo de sincronização, a medida de ØCL D+10 também apresentou correlação positiva com as taxas de P/IA aos 30 e 45 dias após a IATF. No entanto, diferentemente da correlação presente entre as medidas foliculares e as taxas de mortalidade embrionária e fetal, a mensuração do CL no D+10 não apresentou correlação com nenhuma das variáveis relacionadas com a manutenção da gestação.

Tabela 6 - Coeficientes de correlação (r) probabilidade (P) e número de ocorrências (No.) entre as variáveis de dinâmica folicular ovariana e as variáveis de eficiência reprodutiva

	CL D-3 ¹	FD D-3 ²	FD D0 ²	CL D+10 ³	Ov ⁴	P/IA 30 d ⁵	P/IA 45 d ⁶	ME ⁷	MF ⁸
CL D-3									
r	1	-0,17161	-0,10611	0,04651	0,01424	-0,07632	-0,08169	0,02837	0,19643
P		0,0016	0,0697	0,4277	0,7906	0,1572	0,1322	0,6749	0,0105
No.	351	337	293	293	350	345	341	221	169
FD D-3									
r		1	0,73448	0,25599	0,38765	0,23566	0,23468	-0,03365	-0,09689
P			<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,6261	0,2215
No.		337	282	283	336	333	329	212	161
FD D0									
r			1	0,27864	0,50794	0,33088	0,34363	-0,14159	-0,08735
P				<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0513	0,303
No.			293	240	292	287	284	190	141
CL D+10									
r				1	-	0,14861	0,13785	0,01638	0,0157
P					-	0,0114	0,0199	0,8104	0,8408
No.				293	293	289	285	217	166
Ov									
r					1	0,5631	0,54097	-	-
P						<0,0001	<0,0001	-	-
No.					350	345	341	221	169
P/IA 30 d									
r						1	0,96281	0,01596	-
P							<0,0001	0,8134	-
No.						345	341	221	169
P/IA 45 d									
r							1	-0,86199	-
P								<0,0001	-
No.							341	221	169
ME									
r								1	-
P									-
No.								221	169
MF									
r									1
P									
No.									169

¹CL D-3 – presença de corpo lúteo no momento da retirada do iP4;²ØFD – diâmetro do folículo dominante no dia da retirada do iP4 (D-3) e no dia da IATF (D0);³ØCL D+10 – diâmetro do CL 10 dias depois da IATF;⁴Ov – ovulação;⁵P/IA 30 d – prenhez por IA 30 d após a IATF;⁶P/IA 45 d – prenhez por IA 45 d após a IATF;⁷ME - mortalidade embrionária determinada quando, aos 45 dias após a IATF, os embriões ou seus batimentos cardíacos estavam ausentes em relação ao número total de fêmeas que apresentavam embrião aos 30 dias após a IATF;⁸MF – mortalidade fetal foi determinada quando uma búfala diagnosticada como prenhe aos 45 dias após a IATF não pariu ou pariu um bezerro já morto na data esperada de parto

Ambas as medidas de ØFD (D-3 e D0) poderiam ser utilizadas para realizar as análises de probabilidade de ovulação, P/IA 30 d e P/IA 45 d, no entanto, devido ao maior coeficiente de correlação, optou-se por utilizar somente a medida de ØFD D0. Da mesma forma, tanto a P/IA 30 d quanto P/IA 45 d poderiam ser utilizadas para calcular a probabilidade de prenhez, no entanto, optou-se por utilizar somente a taxa de P/IA 45 d, por ter maior correlação com as medidas foliculares.

Como observado nas Figuras 7 e 8 o aumento no ØFD D0 aumenta a probabilidade de ocorrência de ovulação e de P/IA aos 45 dias após a IATF. Para a probabilidade de P/IA aos 45 dias após a IATF, ocorreu aumento contínuo da prenhez de acordo com o crescimento do folículo dominante.

Na relação entre os dados contínuos de ØFD D0 e do ØCL D+10 (Figura 9), observou-se resposta linear positiva ($R^2=0.08$; $P<0.01$), ou seja, relação direta entre o crescimento do folículo e a estrutura do CL formado após a ovulação. Da mesma forma que o ØFD D0, quanto maior o diâmetro do CL, maior a probabilidade de prenhez aos 45 dias após a IATF (Figura 10).

Figura 7 - Probabilidade de ocorrência de ovulação em relação ao diâmetro do folículo dominante no momento da inseminação em búfalas leiteiras submetidas a protocolo de IATF à base de P4/E2 e eCG (n=292). Probabilidade de ovulação = $\exp[-6,0197+0,6325(\text{ØFDD0})]/1+\exp[-6,0197+0,6325(\text{ØFDD0})]$; $P < 0,01$

Figura 8 - Probabilidade de ocorrência de prenhez aos 45 dias em relação ao diâmetro do folículo dominante no momento da inseminação em búfalas leiteiras submetidas a protocolo de IATF à base de P4/E2 e eCG (n=284). Probabilidade de prenhez aos 45 dias = $\exp[-3,1120+0,2876(\text{ØFDD0})]/1+\exp[-3,1120+0,2876(\text{ØFDD0})]$; $P < 0,01$

Figura 9 - Curva de regressão simples não polinomial de efeito linear para a predição do diâmetro do corpo lúteo 10 dias após a IATF de acordo com o diâmetro do folículo dominante no momento da inseminação em búfalas leiteiras submetidas a protocolo de IATF à base de P4/E2 e eCG (n=240). $CLD+10 = 13,48+0,39(\varnothing FDD0)$; $P < 0,01$; $R^2=0,08$

Figura 10 - Probabilidade de ocorrência de prenhez aos 45 dias em relação ao diâmetro do corpo lúteo 10 dias após a inseminação em búfalas leiteiras submetidas a protocolo de IATF à base de P4/E2 e eCG (n=285). Probabilidade de prenhez aos 45 dias = $\exp[-0,8085+0,0985(CLD+10)]/1+\exp[-0,8085+0,0985(CLD+10)]$; $P = 0,02$

Verificou-se que deixa de existir relação entre o ØFD D0 e a probabilidade de ocorrência de P/IA 45 dias após a inseminação quando foram analisadas somente búfalas que ovularam ao protocolo de sincronização (Figura 11).

Quando analisado os dados de búfalas gestantes aos 30 dias após a IATF, verificou-se que o ØFD D0 exerce influência sobre a probabilidade de ocorrência de mortalidade embrionária (Figura 12). É possível observar a relação negativa entre o ØFD D0 e a probabilidade de ocorrência de mortalidade embrionária entre 30 e 45 dias após esta inseminação.

Como anteriormente citado na tabela de correlações, a presença de CL no dia da retirada do *iP4* (D-3) foi correlacionada negativamente com o diâmetro do folículo no mesmo momento. Ao realizar a regressão logística entre esta medida folicular e a probabilidade de presença de CL no D-3, observou-se que búfalas com presença de CL na retirada do *iP4* possuem maior probabilidade de apresentarem folículo dominante de menor diâmetro (Figura 13). A presença de CL na retirada do *iP4* (D-3) também apresentou correlação positiva com a ocorrência de mortalidade fetal. Esse efeito na MF não foi detectado para o diâmetro folicular no D-3 (Figura 14).

Figura 11 - Probabilidade de ocorrência de prenhez aos 45 dias em relação ao diâmetro do folículo dominante no momento da inseminação somente em búfalas que ovularam após protocolo de IATF à base de P4/E2 e eCG (n=285). Probabilidade de prenhez aos 45 dias = $\exp[0,6634+0,0430(\varnothing\text{FDD0})]/1+\exp[0,6634+0,0430(\varnothing\text{FDD0})]$; P = 0,53

Figura 12 - Probabilidade de ocorrência de mortalidade embrionária (ME) em relação ao diâmetro do folículo dominante no momento da inseminação em búfalas prenhes 30 dias após protocolo de IATF à base de P4/E2 e eCG (n=190). Probabilidade de ME = $\exp[1,5916-0,4044(\varnothing\text{FDD0})]/1+\exp[1,5916-0,4044(\varnothing\text{FDD0})]$; P = 0,05

Figura 13 - Diâmetro do folículo dominante no momento da retirada do *i*P4 (ØFD D-3) de acordo com a presença de corpo lúteo no momento da retirada do *i*P4 (CL D-3) em búfalas leiteiras submetidas a protocolo de IATF à base de P4/E2 e eCG (n=337). Probabilidade de presença de CL D-3 = $\exp[1,2836-0,1567(\text{ØFDD-3})]/1+\exp[1,2836-0,1567(\text{ØFDD-3})]$; $P < 0,01$

Figura 14 - Probabilidade de ocorrência de mortalidade fetal (MF) em relação ao diâmetro do folículo dominante no momento da retirada do *i*P4 (com ou sem CL no D-3) em búfalas prenhes após a IATF (n=169) nas estações reprodutivas favorável e desfavorável. Probabilidade de MF em búfalas sem CL D-3 = $\exp[-1,1387-0,1212(\text{ØFDD-3})]/1+\exp[-1,1387-0,1212(\text{ØFDD-3})]$; $P = 0,54$. Probabilidade de MF em búfalas com CL D-3 = $\exp[-0,6424-0,0706(\text{ØFDD-3})]/1+\exp[-0,6424-0,0706(\text{ØFDD-3})]$; $P = 0,64$. Efeito de CL D-3 $P = 0,04$

Após a análise do fator de risco ajustado (AOD) para a ocorrência de P/IA 45 dias após a IATF (Tabela 7), observou-se que a P/IA não sofreu influência dos fatores Fazenda ($P = 0,52$), Paridade ($P = 0,27$), DEL ($P = 0,58$), ECC ($P = 0,20$), e CL D-3 ($P = 0,13$). No entanto, a P/IA 45 d foi maior em animais que ovularam após a IATF em relação aos que ovularam antes da IATF ($P < 0,01$).

Semelhantemente, na análise de AOD para a ocorrência de mortalidade fetal (Tabela 7), foi possível observar que as falhas gestacionais ocorridas entre o diagnóstico de gestação aos 45 dias e o nascimento não sofreram influência dos fatores Fazenda ($P = 0,18$), Paridade ($P = 0,58$), DEL ($P = 0,32$), ECC ($P = 0,64$), e ovulação antes da IA ($P = 0,67$). Em contrapartida, a mortalidade fetal foi maior em búfalas que apresentavam CL D-3 em relação às fêmeas que não apresentavam CL no momento da retirada do iP4 ($P = 0,01$).

Tabela 7 - Fator de risco ajustado (AOD) para a ocorrência de P/IA aos 45 d e mortalidade fetal (MF) em búfalas leiteiras submetidas a IATF à base de E2/P4 e eCG

Variável	P/IA aos 45 d (%) ⁴	AOR (95% IC)	P	MF (%) ⁵	AOR (95% IC)	P
Fazenda						
	1	60,8 (31/51)	Referência	0,52	26,7 (8/30)	Referência
	2	74,4 (29/39)	1,871 (0,749-4,675)		6,9 (2/29)	0,204 (0,039-1,072)
	3	59,9 (88/147)	0,962 (0,500-1,851)		14,8 (13/88)	0,477 (0,174-1,306)
	4	58,5 (24/41)	0,911 (0,393-2,112)		9,1 (2/22)	0,275 (0,051-1,469)
	5	65,1 (41/63)	1,202 (0,558-2,589)		-	-
Paridade						
	<i>múltipara</i>	63,5 (193/304)	Referência	0,27	15,3 (23/150)	Referência
	<i>primípara</i>	54,1 (20/37)	0,677 (0,339-1,349)		10,5 (2/19)	0,650 (0,139-3,037)
DEL (dias) ¹						
	44,9±1,4	66,0 (62/94)	Referência	0,58	16,7 (10/60)	Referência
	102,1±2,9	58,7 (54/92)	0,733 (0,403-1,333)		18,9 (10/53)	1,163 (0,439-3,079)
	241,1±11,0	60,9 (56/92)	0,803 (0,440-1,463)		8,9 (5/56)	0,490 (0,155-1,549)
ECC (1-5) ²						
	≤2,5	50,5 (12/24)	Referência	0,20	9,1 (1/11)	Referência
	3,0	65,0 (80/123)	1,860 (0,768-4,508)		14,9 (10/67)	1,754 (0,199-15,499)
	3,5	66,0 (93/141)	1,937 (0,807-4,652)		13,3 (10/75)	1,538 (0,174-13,565)
	≥4,0	52,8 (28/53)	1,120 (0,425-2,950)		25,0 (4/16)	3,333 (0,314-35,439)
Corpo lúteo no D-3 ³						
	<i>com CL D-3</i>	58,0 (87/150)	Referência	0,13	23,2 (16/96)	Referência
	<i>sem CL D-3</i>	66,0 (126/191)	1,404 (0,901-2,186)		9,0 (9/100)	0,328 (0,134-0,798)
Ovulação antes da IA						
	<i>Antes da IA</i>	52,0 (26/50)	Referência	<0,01	12,0 (3/25)	Referência
	<i>Depois de IA</i>	77,9 (187/240)	3,257 (1,725-6,151)		15,3 (22/144)	1,322 (0,361-4,844)

¹DEL – dias em lactação;²ECC – escore de condição corporal (1-5);³CL D-3 – presença de corpo lúteo no momento da retirada do iP4;⁴P/IA 45 d – prenhez por IA 45 d após a IATF;⁵MF – mortalidade fetal foi determinada quando uma búfala diagnosticada como prenhe aos 45 dias após a IATF não pariu ou pariu um bezerro já morto na data esperada de parto

3.5 DISCUSSÃO

Em linhas gerais, esta pesquisa demonstrou que quando búfalas leiteiras criadas a pasto, em condições climáticas tropicais, são submetidas a programas de IATF à base de P4/E2 e eCG durante as ERF e ERD, as respostas foliculares são semelhantes (Experimento 1). Da mesma forma, foi possível mostrar que índices reprodutivos similares são obtidos em ambas as estações reprodutivas, mesmo que a taxa de ciclicidade seja menor durante a ERD (Experimento 2). Ainda, constatou-se relação entre a resposta ao protocolo de sincronização e a eficiência reprodutiva nas fêmeas bubalinas, independentemente da estação reprodutiva. Por fim, observou-se que é possível utilizar o protocolo de sincronização para IATF à base de P4/E2 e eCG em búfalas leiteiras criadas a pasto durante ambas estações reprodutivas, sem comprometimento na eficiência reprodutiva, o que rejeita a hipótese inicial da presente pesquisa.

3.5.1 Respostas folicular e luteínica ao protocolo de sincronização nas ERF e ERD

No Experimento 1, verificou-se que o diâmetro do folículo dominante, a taxa de crescimento diária do folículo dominante entre a retirada do *i*P4 e a IATF e o diâmetro do folículo ovulatório não apresentaram diferenças entre as estações reprodutivas. Outros autores (PORTO-FILHO, 2004; CARVALHO et al., 2013) descreveram semelhantes medidas do folículo ovulatório (entre 13,1 e 14,2 mm) quando utilizaram protocolo de sincronização à base de P4/E2 e eCG durante a ERD. Ainda, resultados equivalentes ao do presente estudo (entre 13,1 e 14,3 mm) foram relatados após a detecção de cio durante a ERF (BARUSELLI et al., 1997a; PANDEY et al., 2011; YINDEE et al., 2011; PORTO-FILHO et al., 2014). Mesmo que com delineamentos diferentes, realizados em épocas distintas do ano, pode-se traçar um paralelo entre a dinâmica folicular e inferir que o protocolo utilizado na presente pesquisa tem a capacidade de induzir condições foliculares semelhantes à de búfalas cíclicas mantidas durante a ERF. Em contrapartida, menores medidas foliculares (entre 11,7 e 11,9 mm) foram descritas em búfalas submetidas a programas de sincronização à base do protocolo Ovsynch durante a ERF (BERBER; MADUREIRA; BARUSELLI, 2002; GIMENES et al., 2011). Essas diferenças no diâmetro folicular foram verificadas tanto comparando dados da

presente pesquisa como comparando dados de experimentos que detectaram estro (PANDEY et al., 2011; YINDEE et al., 2011; PORTO-FILHO et al., 2014).

Fisiologicamente, o protocolo Ovsynch provoca a ovulação de um folículo com capacidade ovulatória após a primeira aplicação de GnRH, e induz uma nova onda de crescimento folicular, em média, 2 dia depois (PURSLEY; MEE; WILTBANK, 1995). Além da necessidade da presença de um folículo com capacidade ovulatória, este protocolo não é capaz de fornecer um *primer* de P4 para reestabelecer a pulsatilidade de LH e a ciclicidade em fêmeas bovinas em anestro (RHODES; ENTWISTLE; KINDER, 1996; MURUGAVEL et al., 2003). Em bubalinos criados no Estado de São Paulo, verificou-se que ~20% das fêmeas durante a ERF e ~60% durante a ERD apresentam-se em anestro (MONTEIRO et al., 2014). Essas informações apontam limitações para o uso do protocolo Ovsynch em búfalas durante ERD. Os resultados do presente experimento são indicativos que o protocolo a base de P4/E2 e eCG pode ser uma alternativa para a sincronização da ovulação durante a ERD, por proporcionar a ovulação de folículos com diâmetro semelhante ao verificado em búfalas em estro durante a ERF.

O intervalo entre a retirada do *i*P4 e a ovulação ($P = 0,85$) e a dispersão das ovulações ($P = 0,18$) não apresentaram diferença entre as estações reprodutivas. O comportamento ovulatório observado na presente pesquisa foi semelhante ao de búfalas sincronizadas com os protocolos Ovsynch (BERBER; MADUREIRA; BARUSELLI, 2002) ou à base de P4/E2 (CARVALHO et al., 2013). O fato que parece ser determinante para o desencadeamento da cascata de ovulação é a presença de um folículo com capacidade ovulatória e um pico de LH, seja ele induzido pelo cio natural como induzido artificialmente. Se a fêmea preenche esses pré-requisitos, a ovulação acontecerá em momentos semelhantes, independente se a origem do LH é endógena (PORTO-FILHO et al., 2014), exógena com o próprio LH (GIMENES et al., 2011) ou hCG (CARVALHO et al., 2007). Esses dados são indicativos de que o protocolo utilizado no presente experimento foi eficiente em sincronizar um folículo dominante capaz de responder adequadamente ao pico de LH, independentemente da ER.

Ao acompanhar a dinâmica luteínica nos dias 6, 10 e 14 após a IATF foi observado que o CL formado durante a ERD teve crescimento mais lento entre os dias 6 e 10 em relação ao CL formado durante a ERF ($P < 0,01$). Em experimento realizado na Itália com búfalas durante as ERF e ERD, foi descrito que o diâmetro e a área do CL formado 10 e 20 dias após IATF (Ovsynch) não sofreram influência da estação reprodutiva (DI FRANCESCO et al., 2012a). Em contrapartida, os pesquisadores mostraram que, apesar de semelhantes medidas no diâmetro do CL, a P4 circulante foi menor nas búfalas sincronizadas durante a ERD, o que

nos faz inferir possíveis efeitos do anestro estacional sobre as concentrações circulantes do LH e suas conseqüências sobre a luteinização do corpo lúteo formado durante a ERD.

Como revisado em bovinos (DIAZ et al., 2002; WILTBANK et al., 2012), o LH assume papel importante nos mecanismos de formação e estabelecimento funcional do corpo lúteo após a ovulação. Em uma série de experimentos que utilizaram antagonistas de hormônio liberador de LH (LHRH-Ant), foi possível observar menor diâmetro do CL formado quando esse antagonista é administrado 2 dias após a ovulação (QUINTAL-FRANCO et al., 1999). Efeito semelhante é observado sobre as concentrações circulantes de P4 quando o LHRH-Ant é administrado até 12 dias depois da ovulação em novilhas bovinas (PETERS et al., 1994; QUINTAL-FRANCO et al., 1999) ou quando ovelhas são hipofisectomizadas 5 dias após a ovulação (JUENGEL et al., 1995). Apesar do exposto nos estudos realizados em bovinos e ovinos, o exato papel do LH na formação e funcionalidade do CL de búfalos, assim como o real efeito da estacionalidade reprodutiva sobre o perfil de liberação de LH ainda não está totalmente esclarecido.

3.5.2 Eficiência reprodutiva nas ERF e ERD

Como esperado, as búfalas apresentaram maior taxa de ciclicidade durante a ERF ($P = 0,02$). Em bovinos e búfalos, a condição de anestro está intimamente relacionada com a baixa condição corporal e com o período pós-parto precoce (BARUSELLI et al., 1994; RHODES et al., 2003; SÁ FILHO et al., 2005; YINDEE et al., 2011). Essa condição de anestro é encontrada freqüentemente em bubalinos mantidos a pasto, que são suscetíveis as variações sazonais de forragem (PERERA, 2011). Entretanto, vale ressaltar que a oferta de pastagem na região do presente estudo é superior durante a ERD (estação das chuvas) (GERDES et al., 2000). Dessa forma, pode-se atribuir ao comportamento poliétrico estacional de dias curtos das búfalas a menor taxa de ciclicidade durante a ERD, corroborando os dados da literatura (ZICARELLI, 2010).

Semelhantes taxas de ovulação foram observadas nas búfalas submetidas ao protocolo de IATF à base de P4/E2 e eCG entre as diferentes estações reprodutivas ($P = 0,19$). Apesar de não termos encontrado pesquisas que compararam a taxa de ovulação após o emprego do mesmo protocolo de sincronização em diferentes ER, foi possível observar que a taxa de ovulação do presente estudo foi próxima à dos trabalhos que utilizaram eCG (ao redor de 70 a

80%) nos protocolos de sincronização para desestacionalização reprodutiva em búfalas (CARVALHO et al., 2013; MURUGAVEL et al., 2009; PORTO-FILHO, 2004). A eCG vem sendo utilizada sistematicamente em programas de sincronização para a IATF em bovinos, pois induz o crescimento folicular e garante satisfatórias taxas de ovulação e de prenhez em novilhas bovinas (DIAS et al., 2009; PERES et al., 2009; RODRIGUES et al., 2013; SÁ FILHO et al., 2010c; SMALL et al., 2009) assim como elevadas taxas de ovulação e P/IA de vacas em anestro pós-parto (BARUSELLI et al., 2004; GARCIA-ISPIERTO et al., 2012; NÚÑEZ-OLIVERA et al., 2014; SÁ FILHO et al., 2010a; SÁ FILHO; VASCONCELOS, 2011; SALES et al., 2011). O uso dessa gonadotrofina nos programas reprodutivos provavelmente se dá pelo fato de sua função análoga ao FSH/LH (MONNIAUX; MARIANA; GIBSON, 1984; MURPHY; MARTINUK, 1991) e pela meia-vida longa (~46 h em vacas) (MURPHY; MARTINUK, 1991), que potencializa o crescimento do folículo pré-ovulatório em animais que poderiam ter redução na atividade hipofisária-gonadal, como é o caso das búfalas em anestro estacional (ZICARELLI, 2010).

Diferentemente do que foi observado no Experimento 1, o ØCL no D+10 não foi diferente entre as estações reprodutivas ($P = 0,20$). Como discutido anteriormente, dados da literatura são indicativos de que a estação reprodutiva tem efeito sobre a produção circulante de P4, e não sobre as medidas de diâmetro e área do CL formado após a ovulação (DI FRANCESCO et al., 2012a). Na presente pesquisa, foi mensurado somente o diâmetro do CL o que limita a discussão a cerca da funcionalidade do CL e as concentrações circulantes de P4 de acordo com as estações reprodutivas.

As taxas de P/IA 30 e 45 d após a inseminação não apresentaram diferenças entre as duas estações reprodutivas ($P = 0,31$). Em estudo realizado por nosso grupo de pesquisa, utilizando o protocolo Ovsynch durante o ano todo, foram observadas menores taxas de P/IA durante a ERD (6,9 vs. 48,8%) (BARUSELLI et al., 2003b). Por outro lado, estudos realizados na Itália que também utilizaram este protocolo à base de GnRH e PGF_{2α} descreveram resultados estatisticamente semelhantes entre as respectivas ERF e ERD, com taxas de P/IA de 50,0% e 47,9% (ROSSI et al., 2014) e 55,2% e 70,1% (CAMPANILE et al., 2013). Vale ressaltar que no experimento de Rossi e col. foram inseminadas somente as búfalas que responderam ao primeiro GnRH e a prostaglandina. Os dados da presente pesquisa suportam que é possível utilizar a IATF durante todo o ano, sem comprometimento nos resultados de P/IA.

Quando foi comparada a taxa de P/IA obtida nesse experimento (~65%), levando em consideração o número de fazendas utilizadas (n=5), número de réplicas realizadas (n=13) e o

número de animais inseminados ($n=351$), constata-se que a taxa de P/IA foi acima do reportado pela literatura, tanto para inseminações realizadas por observação de cio (MIRMAHMOUDI; PRAKASH, 2012; MIRMAHMOUDI; SOURI; PRAKASH, 2014) como por meio de protocolos de sincronização para IATF, como o Ovsynch (BARUSELLI et al., 2001a, 2003a, 2003b; CAMPANILE et al., 2011; NEGLIA et al., 2003, 2008; ROSSI et al., 2014; VECCHIO et al., 2010) ou protocolos à base de P4 + E2/GnRH (CARVALHO et al., 2007, 2013; DE RENSIS et al., 2005; MURUGAVEL et al., 2009; PORTO-FILHO, 2004). Taxas de P/IA equivalentes foram encontradas somente em três dos estudos referenciados (BERBER; MADUREIRA; BARUSELLI, 2002; CAMPANILE et al., 2005, 2013). A P/IA depende de diversos fatores como, nutrição, manejo, sanidade, qualidade do sêmen, bem-estar etc. o que sugere que as condições experimentais foram adequadas e controladas no presente estudo.

Na presente pesquisa não foram detectadas diferenças entre as taxas de mortalidade embrionária ($P = 0,95$), mortalidade fetal ($P = 0,13$) e de perda gestacional ($P = 0,13$) entre as ERF e ERD. Verificou-se que a mortalidade embrionária também foi semelhante em duas pesquisas realizadas com búfalas submetidas ao protocolo de sincronização Ovsynch entre as respectivas ERF e ERD: 14,8 (7/47) vs. 31,9% (15/47) (CAMPANILE et al., 2013); 7,1 (26/368) vs. 9,9% (35/354) (ROSSI et al., 2014). Nota-se que as médias de mortalidade embrionária entre o diagnóstico precoce de gestação (30 dias após a IA) e a confirmação do diagnóstico (45 dias após a IA) foram menores na presente pesquisa (1,8% para ERF e 3,6% para ERD). Entretanto, pouco pode ser inferido em relação a essa diferença, visto que as pesquisas de Campanile e cols. e Rossi e cols. foram desenvolvidas na Itália (clima temperado), onde os animais são mantidos confinados sob sistema intensivo de criação, com realidades sanitárias diversas e submetidos a IATF sob diferentes estímulos hormonais (Ovsynch vs. P4/E2).

De maneira epidemiológica, muitas pesquisas descreveram as taxas de perda gestacional em rebanhos bubalinos leiteiros. É possível encontrar uma grande variação de dados entre índices de mortalidade embrionária (4,7-45%; 30 a 45 dias após a concepção) (BARUSELLI et al., 1997b; CAMPANILE et al., 2005, 2007a, 2007b, 2008a, 2013; NEGLIA et al., 2008; ROSSI et al., 2014; RUSSO et al., 2010; VECCHIO et al., 2010, 2007) ou de mortalidade fetal (2,0-14%; 45 e 50/70/90 dias após a concepção) (BARUSELLI et al., 1997b; RUSSO et al., 2010; VECCHIO et al., 2007, 2010). No entanto, não foram encontradas, até o momento, referências sobre a eficiência reprodutiva de búfalas submetidas a programas de inseminação artificial até o nascimento dos produtos esperados, tão pouco que

comparassem as diferenças dessa eficiência entre as diferentes estações reprodutivas. Acerca da mortalidade embrionária entre 30 e 45 dias após a concepção, observou-se que as perdas obtidas na presente pesquisa foram inferiores às citadas na literatura, independentemente se os animais foram submetidos à monta natural (VECCHIO et al., 2007), a IA após observação de cio na ERF (BARUSELLI et al., 1997b) ou após IATF com Ovsynch na ERD (CAMPANILE et al., 2005, 2007a, 2008b, 2013; RUSSO et al., 2010; VECCHIO et al., 2010).

Na Itália, as altas taxas de mortalidade embrionária durante a ERD são atribuídas às baixas concentrações circulantes de P4 entre 10 e 15 dias após a IA, que poderiam ser insuficientes para promover o alongamento do embrião (ao redor de 13 dias após o cio), estabelecer a pré-fixação (entre 17 a 24 dias após o cio) e a fixação transitória (ao redor de 25 dias após o cio) do embrião no útero (CAMPANILE; NEGLIA, 2010), determinando assim a manutenção da gestação entre 25 e 45 dias após a concepção (CAMPANILE et al., 2008b). Em bovinos, as concentrações circulantes de P4 após a ovulação estão entre os fatores determinantes para a manutenção da gestação (SANTOS et al., 2004). No processo de comunicação entre a mãe e o embrião, a P4 favorece o desenvolvimento do conceito e a produção embrionária de *interferons* (BELTMAN et al., 2009; CARTER et al., 2010; MANN; LAMMING, 2001; O'HARA et al., 2014; PARR et al., 2014; RIZOS et al., 2012), assim como o reconhecimento fetal e manutenção da gestação (BAZER et al., 2008; CLEMENTE et al., 2009; FORDE et al., 2011; SPENCER et al., 2007).

Outra possível razão para as piores taxas de perda gestacional durante a época desfavorável poderia ser atribuída à pior qualidade oocitária das búfalas observada na primavera-verão, tanto para oócitos recuperados de ovários de matadouro (DI FRANCESCO et al., 2011) quanto para os gametas recuperados por aspiração folicular *in vivo* (OPU) (DI FRANCESCO et al., 2012b; FERREIRA et al., 2013). Causas de origem infecciosa também foram investigadas para justificar uma taxa de mortalidade embrionária de 45,0% (59/131), no entanto, somente 7,6% dos animais acometidos por ME apresentavam alguma espécie de patógeno no lavado uterino (CAMPANILE et al., 2005).

Como discutido anteriormente, as medidas foliculares obtidas neste experimento foram maiores do que as encontradas para búfalas sincronizadas por meio do protocolo Ovsynch. Um dos principais fatores que poderiam influenciar no desenvolvimento do folículo dominante seria o funcionamento do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, por meio dos hormônios FSH/LH, que pode estar comprometido em situações de anestro estacional, baixa condição corporal ou período pós-parto recente. O protocolo à base de P4/E2 e eCG é capaz de mimetizar a condição de ciclicidade por meio da presença da P4 e de dar suporte de

FSH/LH com a utilização da eCG, o que garante que a grande maioria das fêmeas sincronizadas tenham um folículo pré-ovulatório saudável ao final deste protocolo de IATF. Portanto, é possível especularmos que uma das causas para a menor mortalidade embrionária obtida neste experimento pode ter sido o protocolo de IATF à base de P4/E2 e eCG utilizado para a sincronização das búfalas. Porém, a dúvida sobre o efeito direto da progesterona na receptividade uterina ao embrião e as possíveis influências do ambiente folicular pré- e peri-ovulatórios gerados a partir da combinação hormonal deste protocolo de sincronização para a IATF de búfalas leiteiras permanece sem esclarecimento.

3.5.3 Relação entre a resposta ao protocolo de sincronização e a eficiência reprodutiva

Como demonstrado na tabela de correlações (Tabela 6), a presença de um CL no momento da retirada do *iP4* mostrou ter influência sobre o diâmetro do folículo dominante no mesmo momento ($\emptyset$ FD D-3; $P < 0,01$), mas somente tendência sobre o diâmetro do folículo dominante no momento da IATF ($\emptyset$ FD D0; $P = 0,07$). Achados similares foram descritos após a IATF de novilhas de corte *Bos indicus* que apresentavam ou não CL ao início do protocolo de sincronização (SÁ FILHO et al., 2010c). Verificou-se que fêmeas bovinas com folículos menores no momento da retirada do *iP4* respondem positivamente ao tratamento com eCG, atingindo adequado diâmetro no momento da IATF (Sales et al., 2011). Dessa forma, esses animais alcançam satisfatórias taxas de ovulação e de concepção ao final dos protocolos de sincronização (SÁ FILHO et al., 2010a, 2010c). Os efeitos benéficos do eCG também foram descritos em búfalas leiteiras criadas a pasto (CARVALHO et al., 2013). Búfalas tratadas com eCG apresentaram folículos dominantes de maior diâmetro, assim como maiores taxas de ovulação e prenhez em relação às fêmeas que não receberam esta gonadotrofina no momento da retirada do *iP4*. Sendo assim, a ausência de efeito da presença do CL no momento da retirada do *iP4* sobre o diâmetro do folículo dominante à IATF pode ser devido ao tratamento com eCG nos animais do presente experimento.

Apesar de não termos quantificado os pulsos de LH na presente pesquisa, é muito provável que menores frequências de LH tenham acompanhado os folículos que apresentavam menor diâmetro quando um CL estava presente no momento da retirada do *iP4*. Existem trabalhos que mostram efeito negativo da elevada concentração de P4 e a presença de CL

durante o protocolo de sincronização sobre o crescimento folicular em bovinos (Carvalho et al., 2008) e em bubalinos (Mendes et al., 2014). Uma possível alternativa para melhorar o crescimento final do folículo dominante é a redução das concentrações de P4 durante o protocolo de IATF. Esta redução pode ser alcançada por meio da administração estratégica de PGF_{2α} antes da retirada do iP4, como previamente descrito para vacas leiteiras (PEREIRA et al., 2013a), e em fêmeas de corte (CARVALHO et al., 2008; DADARWAL et al., 2013; MANTOVANI et al., 2010; PERES et al., 2009). A luteólise precoce reduz as concentrações circulantes de P4 durante o protocolo de sincronização e favorece o aumento da frequência de LH (ADAMS et al., 2008; CIPRIANO et al., 2011), permitindo maior crescimento do folículo pré-ovulatório (CARVALHO et al., 2008) e, conseqüentemente, o aumento na probabilidade de prenhez (DADARWAL et al., 2013; PEREIRA et al., 2013a; PERES et al., 2009). Esta estratégia certamente poderia ser avaliada em búfalas leiteiras cíclicas submetidas a protocolos de IATF à base de P4/E2 durante a ERF.

Constatou-se na análise das curvas de probabilidade geradas a partir das medidas foliculares e das respostas ao protocolo de IATF que quanto maior o ØFD D0, maior a probabilidade de ovulação e P/IA. A associação entre o ØFD e o risco de ocorrência de ovulação e/ou prenhez já foi citada para vacas leiteiras *Bos taurus* (PEREIRA et al., 2013b; RODRIGUES et al., 2014; VASCONCELOS et al., 2001), novilhas e vacas de corte *Bos taurus* (PERRY et al., 2005, 2007) e novilhas e vacas de corte *Bos indicus* (SÁ FILHO et al., 2010b, 2010c, 2011). Portanto, é importante o estabelecimento de protocolos de sincronização da ovulação para IATF que foquem o crescimento de folículos dominantes compatíveis com diâmetros fisiológicos ao final da sincronização, o que aumentaria a probabilidade de ocorrência de ovulação e prenhez após a IATF.

Evidenciou-se que o diâmetro do folículo dominante na IATF (ØFD D0) mostrou correlação negativa com a ocorrência de mortalidade embrionária ($P = 0,05$) e que a presença do CL no momento da retirada do iP4 (D-3) apresentou correlação positiva com a mortalidade fetal ($P = 0,01$). Apesar de não terem sido mensuradas as concentrações circulantes de estradiol neste experimento, seriam esperadas que maiores concentrações deste hormônio fossem encontradas em búfalas com os maiores folículos, tendo em vista que as medidas foliculares apresentam relação direta com a produção de estradiol (MESQUITA et al., 2014; PANDEY et al., 2013; POHLER et al., 2012). A literatura atual tem descrito efeito positivo das concentrações de estradiol durante o proestro e o estro sobre o estabelecimento e manutenção da gestação de bovinos (JINKS et al., 2013; POHLER et al., 2012; SANTOS et al., 2004). Aumentos na quantidade de E2 circulante podem ser obtidos tanto pela

suplementação com E2 durante o protocolo de sincronização (SOUZA et al., 2007) quanto pelo aumento da duração do proestro (BRIDGES et al., 2010; MESQUITA et al., 2014). Sendo assim, tratamentos de sincronização que preconizam o aumento de estradiol ao final do protocolo podem contribuir não somente para o aumento nas taxas de P/IA, mas também para manutenção da gestação após o protocolo de IATF.

Foi descrita correlação positiva entre o diâmetro do folículo dominante no momento da IATF ($\emptyset$ FD D0) e o diâmetro do CL 10 dias após a IATF ($\emptyset$ CL D+10; $P < 0,01$), assim como entre $\emptyset$ CL D+10 e P/IA 45 d ($P = 0,02$). A relação entre o diâmetro do folículo ovulatório e o volume do CL formado foi também descrita em bovinos. Verificou-se que as concentrações de E2 antes de ovulação e de P4 depois da ovulação são maiores conforme o aumento do diâmetro do folículo dominante (MESQUITA et al., 2014). Como discutido em revisões acerca do estabelecimento e manutenção da prenhez (POHLER et al., 2012; SANTOS et al., 2004), sugere-se que a duração do proestro e o desenvolvimento do folículo ovulatório tem papel fundamental na formação do corpo lúteo. Além disso, a produção de P4 advinda desse CL parece ter papel determinante no desenvolvimento das ondas foliculares e na produção de estradiol, que são responsáveis pelo desencadeamento do mecanismo de luteólise e pela duração da fase luteínica do ciclo estral (ARAÚJO et al., 2009). Esses autores verificaram em estudo realizado com novilhas bovinas que a ablação de folículos ≥ 4 mm para manutenção de baixas concentrações de E2 durante o metaestro aumentou progressivamente a duração do CL e a fase luteínica do ciclo estral (ARAÚJO et al., 2009). Os dados são indicativos de que o desenvolvimento do folículo ovulatório aumenta a produção de estradiol, a probabilidade de ovulação e a P/IA. Além disso, o diâmetro do folículo ovulatório é correlacionado com o diâmetro do CL e com a capacidade de produção de P4. A progesterona após a IA está relacionada com o crescimento do conceito e a produção de *interferon* τ e manutenção da gestação.

No presente experimento, de forma inesperada, não foi verificada correlação entre o diâmetro do folículo ovulatório e a probabilidade de P/IA aos 45 dias. Esse resultado pode ser explicado pelo menor número de animais nessa análise, uma vez que foram incluídos somente os animais que ovularam.

3.6 CONCLUSÕES

O resultado do presente estudo rejeita a hipótese proposta e permite concluir que:

- 1) Búfalas leiteiras submetidas a protocolo de IATF à base de P4/E2 e eCG apresentam semelhante eficiência reprodutiva durante as ERF e ERD;
- 2) As diferentes estações reprodutivas não interferem na dinâmica folicular e luteínica ovariana, assim como a distribuição e dispersão das ovulações de búfalas leiteiras submetidas a protocolo de IATF à base de P4/E2 e eCG (Experimento 1);
- 3) Mesmo com semelhantes escores de condição corporal e sendo criadas sob o mesmo sistema de manejo, búfalas leiteiras mantidas a pasto apresentam menor taxa de ciclicidade durante a ERD;
- 4) As diferentes estações reprodutivas não interferem nas taxas de ovulação e P/IA aos 30 e 45 dias, assim como as taxas de ME, MF e PG em búfalas submetidas à IATF a base de P4/E2 e eCG (Experimento 2);
- 5) O desenvolvimento folicular durante o protocolo de sincronização e a formação do corpo lúteo após a IATF tem influência positiva direta sobre a eficiência reprodutiva de búfalas submetidas à IATF a base de P4/E2 e eCG. Além da influência sobre a ocorrência de ovulação e P/IA, o diâmetro do folículo dominante também exerce influência sobre a manutenção da gestação, tanto enquanto embrião como feto.

3.7 IMPLICAÇÕES PRÁTICAS

3.7.1 Considerações acerca do manejo reprodutivo

Após a realização desse trabalho foi possível perceber que, com a utilização de um protocolo para sincronização da onda de crescimento folicular e da ovulação à base de P4/E2 e eCG, búfalas leiteiras mantidas à pasto podem ser submetidas à IATF com satisfatórias taxas de ovulação, P/IA e de nascimento, independentemente da ER. Com essa ferramenta, o produtor de leite de búfala é capaz de planejar a programação dos partos e a produção de leite da propriedade, realizar melhoramento genético do rebanho com o uso do sêmen de animais

superiores e diminuir os custos de produção do leite se optar por fazer com que as búfalas tenham seus partos na primavera e no verão, ou seja, nas épocas de maior disponibilidade de forragem de acordo com a estação das chuvas. Além disso, a oferta de leite de búfala é reduzida nesse período colaborando com o aumento da demanda nessa época do ano.

Os dados do presente estudo demonstraram que mesmo durante a estação reprodutiva favorável, mais de 20% das búfalas pode estar em anestro, seja por motivos nutricionais ou de manejo. Se admitirmos que o protocolo Ovsynch depende da ciclicidade para que a sincronização da onda de crescimento folicular e da ovulação para a IATF tenha êxito, devemos considerar essa quantidade de fêmeas acíclicas nos programas de sincronização. Portanto, o protocolo à base de P4/E2 e eCG pode ser uma alternativa para realizar a IATF também nas fêmeas durante a estação reprodutiva favorável. Além disso, independente da estação reprodutiva, esse protocolo de sincronização pode resgatar a fertilidade das búfalas em anestro ao longo de todo o ano.

Para o sucesso de um programa de IATF em búfalas leiteiras mantidas a pasto, é necessário que as fêmeas estejam com ECC entre 2,5 e 4,5 e acima de 25 dias em lactação no dia do início do protocolo. Não obstante, boas taxas de P/IA dependem da utilização de produtos de qualidade, bem acondicionados e mão-de-obra devidamente treinada, assim como correto acondicionamento e manipulação do sêmen. Se o protocolo de IATF for realizado corretamente, esperam-se resultados satisfatórios, a exemplo do alcançado no presente estudo.

A utilização de sêmen de qualidade pode ser determinante para o sucesso do programa de IATF, visto que a análise seminal do sêmen descongelado pode mostrar, em menor proporção, falhas grosseiras no acondicionamento pregresso do sêmen, mas acima de tudo e em maior proporção, a qualidade das células a serem inseminadas nas fêmeas que foram submetidas ao protocolo de sincronização e que serão responsáveis pelo processo de fertilização do oócito destas fêmeas.

Tendo em vista as perdas gestacionais que podem acometer as fêmeas bubalinas submetidas a programas de IATF, destaca-se a importância do diagnóstico de gestação precoce e rotineiro como importante ferramenta no manejo reprodutivo da fazenda leiteira de búfalo. Mesmo após a confirmação da prenhez, há de se considerar as taxas de mortalidade embrionária e fetal que podem acometer as fêmeas gestantes. O diagnóstico de gestação rotineiro na propriedade permite que fêmeas prenhes que tenham perdido seu conceito possam ser devidamente remanejadas para uma nova chance de concepção. Para realizar o diagnóstico de gestação precocemente (a partir de 30 dias da inseminação) e de maneira confiável recomenda-se o uso de um aparelho de ultra-sonografia.

3.7.2 Considerações acerca da dinâmica ovariana

Pudemos perceber a importância marcante do desenvolvimento final do folículo ovulatório, tanto na ocorrência de ovulação, como na prenhez e perda gestacional (taxas de mortalidade embrionária e fetal). Para tentar evitar comprometimentos no crescimento folicular recomenda-se a utilização da eCG nos protocolos de sincronização em bubalinos. A eCG induz o crescimento folicular de fêmeas em anestro e com comprometimento na pulsatilidade de LH. Esses animais não conseguem atingir diâmetro satisfatório ao final do protocolo de sincronização, para alcançar satisfatórias taxas de ovulação e P/IA.

Acreditamos que quaisquer estratégias que consigam melhorar, ou ainda, não prejudicar o desenvolvimento do folículo dominante durante protocolo de sincronização podem aumentar as possibilidades de ocorrência de ovulação. A obtenção de um folículo dominante maior durante o proestro/estro induz a formação de CL de maior diâmetro que produz mais P4 e, por conseguinte, aumentaria as chances de P/IA, além de minimizar as possíveis perdas gestacionais inerentes às concentrações insuficientes de E2 e P4 durante o programa de IATF. Algumas dessas alternativas seriam a adição de mais uma dose de $\text{PGF}_{2\alpha}$ durante o protocolo, seja no dia da inserção do *i*P4 ou antecipando em 2 dias a dose de $\text{PGF}_{2\alpha}$ da retirada do *i*P4.

3.7.3 Considerações acerca da eficiência reprodutiva

Conforme as informações apresentadas na figura 15, para cada 100 búfalas inseminadas em tempo fixo com o protocolo a base de P4/E2 e eCG nas ERF e ERD, é possível obter aproximadamente 85% de taxa de ovulação, 65% de taxa de P/IA com 30 dias, com aproximadamente 3% de mortalidade embrionária (entre 30 e 45 dias), 55% de nascimento com 18% de mortalidade fetal (> 45 dias). Não foram observadas diferenças da estação reprodutiva para essas variáveis.

Entretanto, é importante ressaltar que, para o sucesso do programa de sincronização para IATF, é determinante o rígido controle da nutrição, sanidade, boas práticas de manejo, treinamento da mão-de-obra e qualidade e armazenamento do sêmen.

Figura 155 - Proporção de animais submetidos a protocolo de IATF que ovularam ao final do protocolo de sincronização, que estavam prenhes aos 30 e 45 dias após a IATF (P/IA) e que tiveram o nascimento de bezerro vivo de acordo com as estações reprodutivas favorável (ERF) e desfavorável (ERD)

Ao final desta pesquisa foi possível observar que búfalas submetidas à sincronização da ovulação para IATF durante a estação reprodutiva desfavorável apresentam semelhante resposta folicular, luteínica e na taxa de concepção, além de equivalentes taxas de mortalidade embrionária e fetal quando comparadas às búfalas submetidas à sincronização da ovulação para IATF durante a estação reprodutiva favorável (Figura 16).

Figura 16 - Síntese dos resultados do estudo

REFERÊNCIAS

- ABCB. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE BÚFALOS. [2015]. Disponível em: <<http://www.bufalo.com.br/laticinios.html>>. Acesso em: 7 mar. 2015.
- ADAMS, G. P.; JAISWAL, R.; SINGH, J.; MALHI, P. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. **Theriogenology**, v. 69, p. 72–80, 2008.
- ARAUJO, R. R.; GINTHER, O. J.; FERREIRA, J. C.; PALHÃO, M. M.; BEG, M. A.; WILTBANK, M. C. Role of follicular estradiol-17beta in timing of luteolysis in heifers. **Biology of Reproduction**, v. 81, p. 426–437, 2009.
- BARROS, C.; MOREIRA, M.; FERNANDES, P. Manipulação farmacológica do ciclo estral para melhorar programas de inseminação artificial ou de transferência de embriões. **Arquivo Faculdade Veterinária**, v. 26, p. 179–189, 1998. Suplemento.
- BARUSELLI, P. S.; AMARAL, R.; BARUFI, F. B.; VALENTIM, R.; MARQUES, M. D. O. Lecirelin and Buserelin (Gonadotrophin releasing hormone agonists) are equally effective for fixed time insemination in buffalo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, p. 142–145, 2001a.
- BARUSELLI, P. S.; BERBER, R. C. D. A.; MADUREIRA, E. H.; CARVALHO, N. A. T. DE. Half dose of prostaglandin F2a is effective to induce luteolysis in the synchronization of ovulation protocol for fixed-time artificial insemination in buffalo (*Bubalus bubalis*). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, p. 397–402, 2003a.
- BARUSELLI, P. S.; BERNARDES, O.; BRAGA, D. D. A. F.; ARAUJO, D. C.; TONHATI, H. **Calving distribution throughout the year in buffalo raised all over Brazil. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 6., 2001, Maracaibo, Venezuela. Proceedings...**Maracaibo, Venezuela: [s.n.], 2001b.
- BARUSELLI, P. S.; CARVALHO, N. A. T. Biotecnologias da reprodução em bubalinos (*Bubalus bubalis*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 29, p. 4–17, 2005.
- BARUSELLI, P. S.; CARVALHO, N. A. T.; GIMENES, L. U.; CREPALDI, G. A. Fixed-time artificial insemination in buffalo. **Italian Journal of Animal Science**, v. 6, p. 107–118, 2007a.
- BARUSELLI, P. S.; CARVALHO, N. A. T.; JACOMINI, J. O. Eficiência uso da inseminação artificial em búfalos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, n. 6, p. 104–110, 2009. Suplemento.
- BARUSELLI, P. S.; GIMENES, L. U.; CARVALHO, N. A. T.; SÁ FILHO, F. M.; FERRAZ, M. L.; CAMPANARUT BARNABE, R. O estado atual da biotecnologia reprodutiva em bubalinos : perspectiva de aplicação comercial. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, p. 285–292, 2007b.

BARUSELLI, P. S.; MADUREIRA, E. H.; BARNABE, V. H.; BARNABE, R. C.; BERBER, R. C. D. A. Evaluation of synchronization of ovulation for fixed timed insemination in buffalo (*Bubalus bubalis*). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, p. 431–442, 2003b.

BARUSELLI, P. S.; MARQUES, M. O.; CARVALHO, N. A. T.; MADUREIRA, E. H.; CAMPOS FILHO, E. P. Efeito de diferentes protocolos de inseminação artificial em tempo fixo na eficiência reprodutiva de vacas de corte lactantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, n. 3, p. 218–221, 2002.

BARUSELLI, P. S.; MUCCIOLO, R. G.; VISINTIN, J. A.; VIANA, W. G.; ARRUDA, R. P.; MADUREIRA, E. H.; OLIVEIRA, C. A.; MOLERO-FILHO, J. R. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in buffalo (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, v. 47, n. 97, p. 1531–1547, 1997a.

BARUSELLI, P. S.; OLIVEIRA, J. F. S.; MENDES, M. L. M.; A.M., J.; FUJII, T.; PALAZZO, J. P. C. Diagnóstico da bubalinocultura do Vale do Ribeira. Campinas, Brasil. **CATI**: documento técnico, v. 94, 16 p., 1993.

BARUSELLI, P. S.; REIS, E. L.; MARQUES, M. O.; NASSER, L. F.; BÓ, G. A. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 479–486, 2004.

BARUSELLI, P. S.; SOARES, J. G.; GIMENES, L. U.; MONTEIRO, B. M.; OLAZARRI, M. J.; CARVALHO, N. A. T. Control of buffalo follicular dynamics for artificial insemination, superovulation and In Vitro embryo production. **Buffalo Bulletin**, v. 32, n. 1, p. 160–176, 2013.

BARUSELLI, P. S.; VISINTIN, J. A.; BARNABE, V. H.; AMARAL, R.; SOUZA, A. C. **Early pregnancy ultrasonographic diagnosis and embryonic mortality occurrence in buffalo**. WORLD BUFFALO CONGRESS, 1997, Caserta, Italy. **Proceedings...** Caserta, Italy: [s.n.], 1997b.

BARUSELLI, P.; VIANA, W.; MUCCIOLO, R.; OLIVEIRA, C.; MADUREIRA, E. **Ovarian activity and sexual behaviour during postpartum period in buffaloes**. World Buffalo Congress, 1994, São Paulo, Brazil. **Anais...** São Paulo, Brazil: v. 3, p. 440-442, 1994.

BASTIANETTO, E.; ESCRIVÃO, S. C.; OLIVEIRA, D. A. A. Influência das características reprodutivas da búfala na produção, composição e qualidade do leite. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 29, p. 49–52, 2005.

BAZER, F. W.; BURGHARDT, R. C.; JOHNSON, G. A.; SPENCER, T. E.; WU, G. Interferons and progesterone for establishment and maintenance of pregnancy: interactions among novel cell signaling pathways. **Reproductive biology**, v. 8, n. 3, p. 179–211, 2008.

BELTMAN, M. E.; LONERGAN, P.; DISKIN, M. G.; ROCHE, J. F.; CROWE, M. A. Effect of progesterone supplementation in the first week post conception on embryo survival in beef heifers. **Theriogenology**, v. 71, p. 1173–1179, 2009.

BERBER, R. C. A.; MADUREIRA, E. H.; BARUSELLI, P. S. Comparison of two ovsynch protocols (GnRH versus LH) for fixed timed insemination in buffalo (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, v. 57, p. 1421–1430, 2002.

BERNARDES, O. Bubalinocultura no Brasil : situação e importância econômica. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v. 31, p. 293–298, 2007.

BO, G. A.; ADAMS, G. P.; CACCIA, M.; MARTINEZ, M.; PIERSON, R. A.; MAPLETOFT, R. J. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 39, n. 3, p. 193–204, ago. 1995.

BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S.; MARTÍNEZ, M. F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 307–326, 2003.

BRIDGES, G. A.; MUSSARD, M. L.; BURKE, C. R.; DAY, M. L. Influence of the length of proestrus on fertility and endocrine function in female cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 117, p. 208–215, 2010.

CAMPANILE, G.; BARUSELLI, P. S.; NEGLIA, G.; VECCHIO, D.; GASPARRINI, B.; GIMENES, L. U.; ZICARELLI, L.; D'OCCHIO, M. J. 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.

CAMPANILE, G.; DI PALO, R.; NEGLIA, G.; VECCHIO, D.; GASPARRINI, B.; PRANDI, A.; GALIERO, G.; D'OCCHIO, M. J. Corpus luteum function and embryonic mortality in buffaloes treated with a GnRH agonist, hCG and progesterone. **Theriogenology**, v. 67, p. 1393–1398, 2007a.

CAMPANILE, G.; GASPARRINI, B.; VECCHIO, D.; NEGLIA, G.; SENATORE, E. M.; BELLA, A.; PRESICCE, G. A.; ZICARELLI, L. Pregnancy rates following AI with sexed semen in Mediterranean Italian buffalo heifers (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, v. 76, n. 3, p. 500–506, 2011.

CAMPANILE, G.; NEGLIA, G. Embryonic mortality in buffalo cows Italian. **Journal of Animal Science**, v. 6, p. 119–129, 2010.

CAMPANILE, G.; NEGLIA, G.; GASPARRINI, B.; GALIERO, G.; PRANDI, A.; DI PALO, R.; D'OCCHIO, M. J.; ZICARELLI, L. Embryonic mortality in buffaloes synchronized and mated by AI during the seasonal decline in reproductive function. **Theriogenology**, v. 63, p. 2334–2340, 2005.

CAMPANILE, G.; VECCHIO, D.; DI PALO, R.; NEGLIA, G.; GASPARRINI, B.; PRANDI, A.; ZICARELLI, L.; D'OCCHIO, M. J. Delayed treatment with GnRH agonist, hCG and progesterone and reduced embryonic mortality in buffaloes. **Theriogenology**, v. 70, p. 1544–1549, 2008a.

CAMPANILE, G.; VECCHIO, D.; NEGLIA, G.; BELLA, A.; PRANDI, A.; SENATORE, E. M.; GASPARRINI, B.; PRESICCE, G. A. Effect of season, late embryonic mortality and progesterone production on pregnancy rates in pluriparous buffaloes (*Bubalus bubalis*) after artificial insemination with sexed semen. **Theriogenology**, v. 79, n. 4, p. 653–659, 2013.

CAMPANILE, G.; VECCHIO, D.; NEGLIA, G.; DI PALO, R.; PRANDI, A.; D'OCCHIO, M. J. Progesterone and pregnancy status of buffaloes treated with a GnRH agonist. **Livestock Science**, v. 115, p. 242–248, 2008b.

CAMPANILE, G.; VECCHIO, D.; ZICARELLI, L.; NEGLIA, G.; DI PALO, R.; BALESTRIERI, A.; D'OCCHIO, M. J. Strategies to reduce embryonic mortality in buffalo cows. **Italian Journal of Animal Science**, v. 6, p. 680–683, 2007b.

CARTER, F.; RINGS, F.; MAMO, S.; HOLKER, M.; KUZMANY, A.; BESENFELDER, U.; HAVLICEK, V.; MEHTA, J. P.; TESFAYE, D.; SCHELLANDER, K.; LONERGAN, P. Effect of elevated circulating progesterone concentration on bovine blastocyst development and global transcriptome following endoscopic transfer of in vitro produced embryos to the bovine oviduct. **Biology of reproduction**, v. 83, p. 707–719, 2010.

CARVALHO, J. B. P.; CARVALHO, N. A T.; REIS, E. L.; NICH, M.; SOUZA, A. H.; BARUSELLI, P. S. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. **Theriogenology**, v. 69, n. 2, p. 167–175, 2008.

CARVALHO, N. A T.; BERNARDES, O.; BARUSELLI, P. S. Desestacionalização Dos Partos Para a Produção De Leite De Búfalas a Pasto No Centro Sul Do Brasil. **Pesquisa & Tecnologia**, v. 8, p. 1–5, 2011.

CARVALHO, N. A T.; NAGASAKU, E. M.; VANNUCCI, F. S.; TOLEDO, L. M.; BARUSELLI, P. S. Ovulation and conception rates according intravaginal progesterone device and hCG or GnRH to induce ovulation in buffalo during the off breeding season. **Italian Journal of Animal Science**, v. 6, p. 646–648, 2007.

CARVALHO, N. A T.; SOARES, J. G.; PORTO FILHO, R. M.; GIMENES, L. U.; SOUZA, D. C.; NICH, M.; SALES, J. S.; BARUSELLI, P. S. Equine chorionic gonadotropin improves the efficacy of a timed artificial insemination protocol in buffalo during the nonbreeding season. **Theriogenology**, v. 79, n. 3, p. 423–428, 2013.

CHAUHAN, F. S.; SHARMA, R. D.; SINGH, G. B. Compatibility between serum progesterone profile and rectal/clinical findings in normal cycling, suboestrus, and after treatment with prostaglandin in suboestrous buffaloes. **Animal Reproduction Science**, v. 8, n. 1-2, p. 137–142, 1985.

CIPRIANO, R. S.; CARVALHO, B. A.; MARANGONI, N. R.; NOGUEIRA, G. P. LH and FSH concentration and follicular development in Nellore heifers submitted to fixed-time artificial insemination protocols with different progesterone concentrations. **Animal Reproduction Science**, v. 127, n. 1-2, p. 16–22, 2011.

CLEMENTE, M.; DE LA FUENTE, J.; FAIR, T.; AL NAIB, A.; GUTIERREZ-ADAN, A.; ROCHE, J. F.; RIZOS, D.; LONERGAN, P. Progesterone and conceptus elongation in cattle: A direct effect on the embryo or an indirect effect via the endometrium? **Reproduction**, v. 138, p. 507–517, 2009.

DADARWAL, D.; MAPLETOFT, R. J.; ADAMS, G. P.; PFEIFER, L. F. M.; CREELMAN, C.; SINGH, J. Effect of progesterone concentration and duration of proestrus on fertility in

beef cattle after fixed-time artificial insemination. **Theriogenology**, v. 79, n. 5, p. 859–866, 2013.

DE RENSIS, F.; LÓPEZ-GATIUS, F. Protocols for synchronizing estrus and ovulation in buffalo (*Bubalus bubalis*): A review. **Theriogenology**, v. 67, p. 209–216, 2007.

DE RENSIS, F.; RONCI, G.; GUARNERI, P.; NGUYEN, B. X.; PRESICCE, G. A.; HUSZENICZA, G.; SCARAMUZZI, R. J. Conception rate after fixed time insemination following ovsynch protocol with and without progesterone supplementation in cyclic and non-cyclic Mediterranean Italian buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, v. 63, p. 1824–1831, 2005.

DI FRANCESCO, S.; BOCCIA, L.; CAMPANILE, G.; DI PALO, R.; VECCHIO, D.; NEGLIA, G.; ZICARELLI, L.; GASPARRINI, B. The effect of season on oocyte quality and developmental competence in Italian Mediterranean buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Animal Reproduction Science**, v. 123, n. 1-2, p. 48–53, 2011.

DI FRANCESCO, S.; NEGLIA, G.; VECCHIO, D.; ROSSI, P.; RUSSO, M.; ZICARELLI, L.; D'OCCHIO, M. J.; CAMPANILE, G. Influence of season on corpus luteum structure and function and AI outcome in the Italian Mediterranean buffalo (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, v. 78, n. 8, p. 1839–1845, 2012a.

DI FRANCESCO, S.; NOVOA, M. V. S.; VECCHIO, D.; NEGLIA, G.; BOCCIA, L.; CAMPANILE, G.; ZICARELLI, L.; 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, 2012b.

DIAS, C. C.; WECHSLER, F. S.; DAY, M. L.; VASCONCELOS, J. L. M. Progesterone concentrations, exogenous equine chorionic gonadotropin, and timing of prostaglandin F₂ treatment affect fertility in postpuberal Nelore heifers. **Theriogenology**, v. 72, p. 378–385, 2009.

DIAZ, F. J.; ANDERSON, L. E.; WU, Y. L.; RABOT, A.; TSAI, S. J.; WILTBANK, M. C. Regulation of progesterone and prostaglandin F₂ production in the CL. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 191, n. 1, p. 65–80, 2002.

DIAZ, J. S.; FRITSCH, M.; RODRIGUES, J. L. **Pre-fixed artificial insemination in water buffaloes with synchronized estrus using prostaglandin f2 alfa and synchromate-b**. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 1994, São Paulo. **Proceedings...** São Paulo: [s.n.], 1994.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. 2014. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/573/DesktopDefault.aspx?PageID=573#ancor>>. Acesso em: 5 mar. 2015.

FERREIRA, R. M.; MACABELLI, C. H.; TONIZZA DE CARVALHO, N. A.; SOARES, J. G.; GIMENES, L. U.; FERRAZ, M. L.; WATANABE, Y. F.; WATANABE, O.; RODRIGUES, C. A.; VIEIRA, L. M.; MEIRELLES, F. V.; BARUSELLI, P. S.; CHIARATTI, M. R. Molecular Evaluation of Developmental Competence of Oocytes

Collected In Vivo from Buffalo and Bovine Heifers during Winter and Summer. **Buffalo Bulletin**, v. 32, p. 596–600, 1 jan. 2013.

FORDE, N.; CARTER, F.; SPENCER, T. E.; BAZER, F. W.; SANDRA, O.; MANSOURI-ATTIA, N.; OKUMU, L. A.; MCGETTIGAN, P. A.; MEHTA, J. P.; MCBRIDE, R.; O'GAORA, P.; ROCHE, J. F.; LONERGAN, P. Conceptus-induced changes in the endometrial transcriptome: how soon does the cow know she is pregnant? **Biology of Reproduction**, v. 85, p. 144–156, 2011.

GARCIA-ISPIERTO, I.; LÓPEZ-HELGUERA, I.; MARTINO, A.; LÓPEZ-GATIUS, F. Reproductive performance of anoestrous high-producing dairy cows improved by adding equine chorionic gonadotrophin to a progesterone-based oestrous synchronizing protocol. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, p. 752–758, 2012.

GERDES, L.; WERNER, J. C.; COLOZZA, M. T.; CARVALHO, D. D. DE; SCHAMMASS, E. A. Avaliação de características agronômicas e morfológicas das gramíneas forrageiras Marandu, Setária e Tanzânia aos 35 dias de crescimento nas estações do ano 1 evaluation of agronomic and morphologic characteristics of the Grasses Brachiaria brizantha cv. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 4, p. 947–954, 2000.

GIMENES, L. U.; CARVALHO, N. A. T.; SÁ FILHO, M. F.; VANNUCCI, F. S.; TORRES-JÚNIOR, J. R. S.; AYRES, H.; FERREIRA, R. M.; TRINCA, L. A.; SARTORELLI, E. S.; BARROS, C. M.; BELTRAN, M. P.; NOGUEIRA, G. P.; MAPLETOFT, R. J.; BARUSELLI, P. S. Ultrasonographic and endocrine aspects of follicle deviation, and acquisition of ovulatory capacity in buffalo (*Bubalus bubalis*) heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 123, n. 3-4, p. 175–179, 2011.

JINKS, E. M.; SMITH, M. F.; ATKINS, J. A.; POHLER, K. G.; PERRY, G. A.; MACNEIL, M. D.; ROBERTS, A. J.; WATERMAN, R. C.; ALEXANDER, L. J.; GEARY, T. W. Preovulatory estradiol and the establishment and maintenance of pregnancy in suckled beef cows. **Journal of Animal Science**, v. 91, p. 1176–1185, 2013.

JUENGEL, J. L.; MEBERG, B. M.; TURZILLO, A. M.; NETT, T. M.; NISWENDER, G. D. Hormonal regulation of messenger ribonucleic acid encoding steroidogenic acute regulatory protein in ovine corpora lutea. **Endocrinology**, v. 136, n. 12, p. 5423–9, 1995.

MACEDO, M. P.; WECHSLER, F. S.; RAMOS, A. D. A.; AMARAL, J. B. DO; SOUZA, J. C. DE; RESENDE, F. D. DE; OLIVEIRA, J. V. DE. Composição físico-química e produção do leite de búfalas da raça Mediterrâneo no oeste do Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 3, p. 1084–1088, 2001.

MANN, G. E.; LAMMING, G. E. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. **Reproduction** (Cambridge, England), v. 121, n. 1, p. 175–80, 2001.

MANTOVANI, A. P.; NICHI, M.; FILHO, M. F. S.; AYRES, H.; VETTORATO, L. F.; BO, G. A.; BARUSELLI, P. S. Follicular growth and plasma progesterone patterns in *Bos indicus* x *Bos taurus* heifers submitted to different PGF2 α / progesterone-based synchronization protocols. **Animal Reproduction**, p. 91–96, 2010.

MESQUITA, F. S.; PUGLIESI, G.; SCOLARI, S. C.; FRANÇA, M. R.; RAMOS, R. S.; OLIVEIRA, M.; PAPA, P. C.; BRESSAN, F. F.; MEIRELLES, F. V.; SILVA, L. A.; NOGUEIRA, G. P.; MEMBRIVE, C. M. B.; BINELLI, M. Manipulation of the periovulatory sex steroidal milieu affects endometrial but not luteal gene expression in early diestrus Nelore cows. **Theriogenology**, v. 81, n. 6, p. 861–9, 2014.

MIRMAHMOUDI, R.; PRAKASH, B. S. The endocrine changes, the timing of ovulation and the efficacy of the Doublesynch protocol in the Murrah buffalo (*Bubalus bubalis*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 177, n. 1, p. 153–159, 2012.

MIRMAHMOUDI, R.; SOURI, M.; PRAKASH, B. S. Comparison of endocrine changes, timing of ovulations, ovarian follicular growth, and efficacy associated with Estradoublesynch and Heatsynch protocols in Murrah buffalo cows (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, v. 82, n. 7, p. 1012–1020, 2014.

MONNIAUX, D.; MARIANA, J. C.; GIBSON, W. R. Action of PMSG on follicular populations in the heifer. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 70, n. 1, p. 243–53, 1984.

MONTEIRO, B. M.; SOUZA, D. C.; VASCONCELLOS, G. S. F. M.; ORTOLAN, M. D. D. V.; MENDANHA, M. F.; SOARES, J. G.; CARVALHO, N. A. T.; BARUSELLI, P. S. Reproductive performance of dairy buffaloes submitted to TAI protocols based on P4/E2 plus eCG during breeding and nonbreeding seasons. **Animal Reproduction**, v. 11, p. 344, 2014.

MURPHY, B. D.; MARTINUK, S. D. Equine chorionic gonadotropin. **Endocrine Reviews**, v. 12, p. 27–44, 1991.

MURUGAVEL, K.; ANTOINE, D.; RAJU, M. S.; LÓPEZ-GATIUS, F. The effect of addition of equine chorionic gonadotropin to a progesterone-based estrous synchronization protocol in buffaloes (*Bubalus bubalis*) under tropical conditions. **Theriogenology**, v. 71, n. 7, p. 1120–1126, 2009.

MURUGAVEL, K.; YÁNIZ, J. L.; SANTOLARIA, P.; LÓPEZ-BÉJAR, M.; LÓPEZ-GATIUS, F. Luteal activity at the onset of a timed insemination protocol affects reproductive outcome in early postpartum dairy cows. **Theriogenology**, v. 60, p. 583–593, 2003.

NEGLIA, G.; GASPARRINI, B.; DI PALO, R.; DE ROSA, C.; ZICARELLI, L.; CAMPANILE, G. Comparison of pregnancy rates with two estrus synchronization protocols in Italian Mediterranean Buffalo cows. **Theriogenology**, v. 60, p. 125–133, 2003.

NEGLIA, G.; NATALE, A.; ESPOSITO, G.; SALZILLO, F.; ADINOLFI, L.; CAMPANILE, G.; FRANCILO, M.; ZICARELLI, L. Effect of prostaglandin F_{2α} at the time of AI on progesterone levels and pregnancy rate in synchronized Italian Mediterranean buffaloes. **Theriogenology**, v. 69, p. 953–960, 2008.

NÚÑEZ-OLIVERA, R.; DE CASTRO, T.; GARCÍA-PINTOS, C.; BÓ, G.; PIAGGIO, J.; MENCHACA, A. Ovulatory response and luteal function after eCG administration at the end of a progesterone and estradiol' based treatment in postpartum anestrous beef cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 146, p. 111–116, 2014.

- O'HARA, L.; FORDE, N.; KELLY, A. K.; LONERGAN, P. Effect of bovine blastocyst size at embryo transfer on day 7 on conceptus length on day 14: Can supplementary progesterone rescue small embryos? **Theriogenology**, v. 81, n. 8, p. 1123–1128, 2014.
- PANDEY, A. K.; DHALIWAL, G. S.; GHUMAN, S. P. S.; AGARWAL, S. K. Impact of pre-ovulatory follicle diameter on plasma estradiol, subsequent luteal profiles and conception rate in buffalo (*Bubalus bubalis*). **Animal Reproduction Science**, v. 123, n. 3-4, p. 169–174, 2011.
- PANDEY, A. K.; GHUMAN, S. P. S.; DHALIWAL, G. S.; KUMAR, A.; AGARWAL, S. K. Impact of buserelin acetate or hCG administration on day 12 post-ovulation on subsequent luteal profile and conception rate in buffalo (*Bubalus bubalis*). **Animal Reproduction Science**, v. 136, n. 4, p. 260–267, 2013.
- PARR, M. H.; CROWE, M. A.; LONERGAN, P.; EVANS, A. C. O.; RIZOS, D.; DISKIN, M. G. Effect of exogenous progesterone supplementation in the early luteal phase post-insemination on pregnancy per artificial insemination in Holstein – Friesian cows. **Animal Reproduction Science**, v. 150, n. 1-2, p. 7–14, 2014.
- PEREIRA, M. H. C.; SANCHES, C. P.; GUIDA, T. G.; RODRIGUES, A. D. P.; ARAGON, F. L.; VERAS, M. B.; BORGES, P. T.; WILTBANK, M. C.; VASCONCELOS, J. L. M. Timing of prostaglandin F₂ α treatment in an estrogen-based protocol for timed artificial insemination or timed embryo transfer in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 5, p. 2837–46, 2013a.
- PEREIRA, M. H.; RODRIGUES, A. D.; MARTINS, T.; OLIVEIRA, W. V.; SILVEIRA, P. S.; WILTBANK, M. C.; VASCONCELOS, J. L. Timed artificial insemination programs during the summer in lactating dairy cows: comparison of the 5-d Cosynch protocol with an estrogen/progesterone-based protocol. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 1, p. 6904–6914, 2013b.
- PERERA, B. M. A. O. Reproductive cycles of buffalo. **Animal Reproduction Science**, v. 124, n. 3-4, p. 194–199, 2011.
- PERES, R. F. G.; JÚNIOR, I. C.; FILHO, O. G. S.; NOGUEIRA, G. P.; VASCONCELOS, J. L. M. Strategies to improve fertility in *Bos indicus* postpubertal heifers and nonlactating cows submitted to fixed-time artificial insemination. **Theriogenology**, v. 72, p. 681–689, 2009.
- PERRY, G. A.; SMITH, M. F.; LUCY, M. C.; GREEN, J. A.; PARKS, T. E.; MACNEIL, M. D.; ROBERTS, A. J.; GEARY, T. W. Relationship between follicle size at insemination and pregnancy success. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, p. 5268–5273, 2005.
- PERRY, G. A.; SMITH, M. F.; ROBERTS, A. J.; MACNEIL, M. D.; GEARY, T. W. Relationship between size of the ovulatory follicle and pregnancy success in beef heifers. **Journal of Animal Science**, v. 85, p. 684–689, 2007.
- PETERS, K. E.; BERGFELD, E. G.; CUPP, A. S.; KOJIMA, F. N.; MARISCAL, V.; SANCHEZ, T.; WEHRMAN, M. E.; GROTTJAN, H. E.; HAMERNIK, D. L.; KITTOCK, R. J. Luteinizing hormone has a role in development of fully functional corpora lutea (CL) but is

not required to maintain CL function in heifers. **Biology of reproduction**, v. 51, n. 6, p. 1248–54, dez. 1994.

POHLER, K. G.; GEARY, T. W.; ATKINS, J. A.; PERRY, G. A.; JINKS, E. M.; SMITH, M. F. Follicular determinants of pregnancy establishment and maintenance. **Cell and Tissue Research**, v. 349, p. 649–664, 2012.

PORTO-FILHO, R. M. **Sincronização da ovulação para a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) durante a estação reprodutiva desfavorável em fêmeas bubalinas**. 2004. 99 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

PORTO-FILHO, R. M.; GIMENES, L. U.; MONTEIRO, B. M.; CARVALHO, N. A. T.; GHUMAN, S. P. S.; MADUREIRA, E. H.; BARUSELLI, P. S. Detection of estrous behavior in buffalo heifers by radiotelemetry following PGF2 α administration during the early or late luteal phase. **Animal Reproduction Science**, v. 144, p. 90–94, 2014.

PURSLEY, J. R.; MEE, M. O.; WILTBANK, M. C. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2alpha and GnRH. **Theriogenology**, v. 44, n. 95, p. 915–923, 1995.

QUINTAL-FRANCO, J. A.; KOJIMA, F. N.; MELVIN, E. J.; LINDSEY, B. R.; ZANELLA, E.; FIKE, K. E.; WEHRMAN, M. E.; CLOPTON, D. T.; KINDER, J. E. Corpus luteum development and function in cattle with episodic release of luteinizing hormone pulses inhibited in the follicular and early luteal phases of the estrous cycle. **Biology of Reproduction**, v. 61, n. 4, p. 921–926, 1999.

RHODES, F. M.; BURKE, C. R.; CLARK, B. A.; DAY, M. L.; MACMILLAN, K. L. Effect of treatment with progesterone and oestradiol benzoate on ovarian follicular turnover in postpartum anoestrous cows and cows which have resumed oestrous cycles. **Animal Reproduction Science**, v. 69, n. 3-4, p. 139–50, 2002.

RHODES, F. M.; ENTWISTLE, K. W.; KINDER, J. E. Changes in ovarian function and gonadotropin secretion preceding the onset of nutritionally induced anestrus in *Bos indicus* heifers. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 1437–1443, 1996.

RHODES, F. M.; MCDUGALL, S.; BURKE, C. R.; VERKERK, G. A.; MACMILLAN, K. L. Treatment of cows with an extended postpartum anestrous interval. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 6, p. 1876–94, 2003.

RIZOS, D.; SCULLY, S.; KELLY, A. K.; EALY, A. D.; MOROS, R.; DUFFY, P.; AL NAIB, A.; FORDE, N.; LONERGAN, P. Effects of human chorionic gonadotrophin administration on Day 5 after oestrus on corpus luteum characteristics, circulating progesterone and conceptus elongation in cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 24, p. 472–481, 2012.

RODRIGUES, A. D. P.; PERES, R. F. G.; LEMES, A. P.; MARTINS, T.; PEREIRA, M. H. C.; CARVALHO, E. R.; DAY, M. L.; VASCONCELOS, J. L. M. Effect of interval from induction of puberty to initiation of a timed AI protocol on pregnancy rate in Nellore heifers. **Theriogenology**, v. 82, n. 5, p. 760–766, 2014.

RODRIGUES, A. D. P.; PERES, R. F. G.; LEMES, A. P.; MARTINS, T.; PEREIRA, M. H. C.; DAY, M. L.; VASCONCELOS, J. L. M. Progesterone-based strategies to induce ovulation in prepubertal Nelore heifers. **Theriogenology**, v. 79, p. 135–141, 2013.

ROSSI, P.; VECCHIO, D.; NEGLIA, G.; DI PALO, R.; GASPARRINI, B.; D'OCCHIO, M. J.; CAMPANILE, G. Seasonal fluctuations in the response of Italian Mediterranean buffaloes to synchronization of ovulation and timed artificial insemination. **Theriogenology**, v. 82, p. 132–137, 2014.

RUSO, M.; VECCHIO, D.; NEGLIA, G.; PACELLI, C.; PRANDI, A.; GASPARRINI, B.; ZICARELLI, L.; D'OCCHIO, M. J.; CAMPANILE, G. Corpus luteum function and pregnancy outcome in buffaloes during the transition period from breeding to non-breeding season. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, p. 988–991, 2010.

SÁ FILHO, M. F.; AYRES, H.; FERREIRA, R. M.; MARQUES, M. O.; REIS, E. L.; SILVA, R. C. P.; RODRIGUES, C. A.; MADUREIRA, E. H.; BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S. Equine chorionic gonadotropin and gonadotropin-releasing hormone enhance fertility in a norgestomet-based, timed artificial insemination protocol in suckled Nelore (*Bos indicus*) cows. **Theriogenology**, v. 73, p. 651–658, 2010a.

SÁ FILHO, M. F.; BALDRIGHI, J. M.; SALES, J. N. S.; CREPALDI, G. A.; CARVALHO, J. B. P.; BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S. Induction of ovarian follicular wave emergence and ovulation in progestin-based timed artificial insemination protocols for *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 129, n. 3-4, p. 132–139, 2011.

SÁ FILHO, M. F.; CRESPILO, A. M.; SANTOS, J. E. P.; PERRY, G. A.; BARUSELLI, P. S. Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous response influence likelihood of ovulation and pregnancy after estrous synchronization with progesterone or progestin-based protocols in suckled *Bos indicus* cows. **Animal Reproduction Science**, v. 120, n. 1-4, p. 23–30, 2010b.

SÁ FILHO, M. F.; MADUREIRA, E. H.; ZANETTI, M. A.; BARUSELLI, M. S.; BARUSELLI, P. S. Atividade ovariana pós-parto e eficiência reprodutiva em vacas Nelore suplementadas com minerais quelatados. **A Hora Veterinária**, v. 143, p. 52–55, 2005.

SÁ FILHO, M. F.; TORRES-JÚNIOR, J. R. S.; PENTEADO, L.; GIMENES, L. U.; FERREIRA, R. M.; AYRES, H.; CASTRO E PAULA, L. A.; SALES, J. N. S.; BARUSELLI, P. S. Equine chorionic gonadotropin improves the efficacy of a progestin-based fixed-time artificial insemination protocol in Nelore (*Bos indicus*) heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 118, p. 182–187, 2010c.

SÁ FILHO, O. G.; VASCONCELOS, J. L. M. Treatments to Optimize the Use of Artificial Insemination and Reproductive Efficiency in Beef Cattle under Tropical Environments. **Veterinary Medicine International**, v. 2011, p. 1-10, 2011.

SALES, J. N. S.; CREPALDI, G. A.; GIROTTO, R. W.; SOUZA, A. H.; BARUSELLI, P. S. Fixed-time AI protocols replacing eCG with a single dose of FSH were less effective in stimulating follicular growth, ovulation, and fertility in suckled-anestrus Nelore beef cows. **Animal Reproduction Science**, v. 124, n. 1-2, p. 12–18, 2011.

SANTOS, J. E. P.; THATCHER, W. W.; CHEBEL, R. C.; CERRI, R. L. A.; GALVÃO, K. N. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 513–535, 2004.

SINGH, G.; SINGH, G. B.; SHARMA, S. S.; SHARMA, R. D. Studies on oestrus symptoms of buffalo heifers. **Theriogenology**, v. 21, n. 6, p. 849–858, 1984.

SINGH, J.; NANDA, A. S.; ADAMS, G. P. The reproductive patterns and efficiency of female buffaloes. **Animal Reproduction Science**, v. 60, p. 593–604, 2000.

SMALL, J. A.; COLAZO, M. G.; KASTELIC, J. P.; MAPLETOFT, R. J. Effects of progesterone presynchronization and eCG on pregnancy rates to GnRH-based, timed-AI in beef cattle. **Theriogenology**, v. 71, p. 698–706, 2009.

SOUZA, A. H.; GÜMEN, A.; SILVA, E. P. B.; CUNHA, A. P.; GUENTHER, J. N.; PETO, C. M.; CARAVIELLO, D. Z.; WILTBANK, M. C. Supplementation with Estradiol-17 β Before the Last Gonadotropin-Releasing Hormone Injection of the Ovsynch Protocol in Lactating Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 10, p. 4623–4634, 10 out. 2007.

SPENCER, T. E.; JOHNSON, G. A.; BAZER, F. W.; BURGHARDT, R. C.; PALMARINI, M. Pregnancy recognition and conceptus implantation in domestic ruminants: Roles of progesterone, interferons and endogenous retroviruses. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 19, p. 65–78, 2007.

TENHAGEN, B. A.; SURHOLT, R.; WITTKE, M.; VOGEL, C.; DRILLICH, M.; HEUWIESER, W. Use of Ovsynch in dairy herds - Differences between primiparous and multiparous cows. **Animal Reproduction Science**, v. 80, p. 1–11, 2004.

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.

VASCONCELOS, J. L. M.; SARTORI, R.; OLIVEIRA, H. N.; GUENTHER, J. G.; WILTBANK, M. C. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. **Theriogenology**, v. 56, p. 307–314, 2001.

VASCONCELOS, J. L. M.; SILCOX, R. W.; ROSA, G. J. M.; PURSLEY, J. R.; WILTBANK, M. C. Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrous cycle in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 52, n. 99, p. 1067–1078, 1999.

VECCHIO, D.; NEGLIA, G.; DI PALO, R.; PRANDI, A.; GASPARRINI, B.; BALESTRIERI, A.; D'OCCHIO, M. J.; ZICARELLI, L.; CAMPANILE, G. Is a delayed treatment with GnRH, hCG or progesterone beneficial for reducing embryonic mortality in buffaloes? **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, n. 4, p. 614–618, 2010.

VECCHIO, D.; PALO, R. DI; ZICARELLI, L.; GRASSI, C.; CAMMARANO, A.; OCCHIO, M. J. D.; CAMPANILE, G. Embryonic mortality in buffalo naturally mated. **Italian Journal of Animal Science**, v. 6, n. 2, p. 677–679, 2007.

VERRUMA, M. R.; SALGADO, J. M. Análise química do leite de búfala em comparação ao leite de vaca. **Scientia Agricola**, v. 51, p. 131–137, 1994.

WILTBANK, M. C.; SALIH, S. M.; ATLI, M. O.; LUO, W.; BORMANN, C. L.; OTTOBRE, J. S.; VEZINA, C. M.; MEHTA, V.; DIAZ, F. J.; TSAI, S. J.; SARTORI, R. Comparison of endocrine and cellular mechanisms regulating the corpus luteum of primates and ruminants. **Animal reproduction / Colegio Brasileiro de Reproducao Animal**, v. 9, n. 3, p. 242–259, 2012.

WILTBANK, M. C.; SARTORI, R.; HERLIHY, M. M.; VASCONCELOS, J. L. M.; NASCIMENTO, A. B.; SOUZA, A. H.; AYRES, H.; CUNHA, A. P.; KESKIN, A.; GUENTHER, J. N.; GUMEN, A. Managing the dominant follicle in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 76, n. 9, p. 1568–1582, 2011.

YINDEE, M.; TECHAKUMPHU, M.; LOHACHIT, C.; SIRIVAIIDYAPONG, S.; NACHANGMAI, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; VAN DER WEYDEN, G. C.; COLENBRANDER, B. Follicular Dynamics and Oestrous Detection in Thai Postpartum Swamp Buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, n. 1, p. 91–96, 2011.

ZICARELLI, L. Can we consider buffalo a non precocious and hypofertile species? **Italian Journal of Animal Science**, v. 6, n. 2, p. 143–154, 2007.

ZICARELLI, L. **Enhancing reproductive performance in domestic dairy water buffalo (*Bubalus bubalis*)**. Society of Reproduction and Fertility Supplement, v. 67, p. 443–455, 2010.

ZICARELLI, L. **Reproductive seasonality in buffalo**. WORLD BUFFALO CONGRESS, 1997, Caserta, Italy. **Proceedings...** Caserta, Italy, n. 2, p. 29–52, 1997.