



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL NOS TRÓPICOS

DINÂMICA FOLICULAR, FUNÇÃO LUTEAL E MOMENTO DA
OVULAÇÃO EM PROTOCOLOS DE IATF EM BUBALINOS
(Bubalus bubalis)

LUIZ DI PAOLO MAGGITI JUNIOR

Médico Veterinário

Salvador - BA
2019

LUIZ DI PAOLO MAGGITTI JUNIOR

**DINÂMICA FOLICULAR, FUNÇÃO LUTEAL E MOMENTO DA
OVULAÇÃO EM PROTOCOLOS DE IATF EM BUBALINOS
(*Bubalus bubalis*)**

Defesa de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal nos Trópicos da Universidade Federal da Bahia como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal nos Trópicos.

Área de concentração: Saúde animal

Orientador: Prof. Dr. Antonio de Lisboa Ribeiro Filho
Coorientador: Prof. Dr. Marcus Vinicius Galvão Loiola

**SALVADOR-BA
FEVEREIRO – 2019**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA),
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

M193d Maggitti Junior, Luiz Di Paolo
Dinâmica folicular, função luteal e momento da
ovulação em protocolos de IATF em bubalinos (*Bubalus
bubalis*) / Luiz Di Paolo Maggitti Junior. -Salvador,
2019. 53 f.

Orientador: Antonio de Lisboa Ribeiro Filho.
Coorientador: Marcus Vinícius Galvão Loiola.
Dissertação (Mestrado - Ciência Animal nos
Trópicos) -- Universidade Federal da Bahia, Escola de
Medicina Veterinária e Zootecnia, 2019.

1. Búfala. 2. Corpo lúteo. 3. Folículos.
4. Gonadotrofina coriônica equina. I. Ribeiro Filho,
Antônio de Lisboa. II. Loiola, Marcus Vinícius
Galvão. III. Título.

CDU: 636.293.4

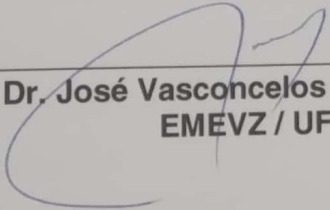
Dinâmica folicular, função luteal e momento da ovulação em protocolos de IATF em Bubalinos (*Bubalus bubalis*)

Luiz Di Paolo Maggitti Júnior

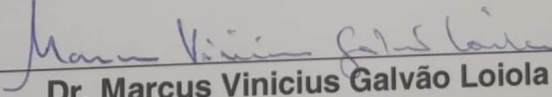
Dissertação defendida e aprovada para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal nos Trópicos

Salvador, 19 de fevereiro de 2019

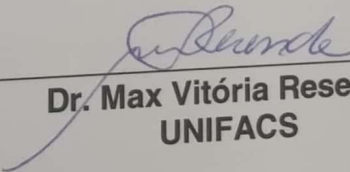
Comissão examinadora:



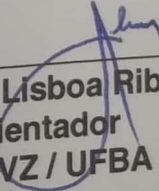
Dr. José Vasconcelos Lima Oliveira
EMEVZ / UFBA



Dr. Marcus Vinicius Galvão Loiola
EMEVZ / UFBA



Dr. Max Vitória Resende
UNIFACS



Dr. Antônio de Lisboa Ribeiro Filho
Orientador
EMEVZ / UFBA

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

LUIZ DI PAOLO MAGGITTI JUNIOR – Nascido em 04 de Maio de 1984, na cidade de Salvador - BA. No semestre de 2007.1 iniciou o curso de Medicina Veterinária na Universidade Federal da Bahia, tendo então se graduado Médico Veterinário no ano de 2013.1. Em 2015, ingressou na Especialização em Reprodução Animal e Obstetrícia Veterinária, na Universidade Federal da Bahia. Em 2017.1, após conclusão da especialização, ingressou como mestrando no Programa de Pós-graduação em Ciência Animal nos Trópicos, também na Universidade Federal da Bahia. Durante sua vida acadêmica trabalhou nas áreas de ginecologia, andrologia, obstetrícia e biotecnologias da reprodução animal. Concluiu o mestrado em Fevereiro de 2019.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (Fapesb), pelo apoio financeiro através da bolsa de pesquisa.

À Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da UFBA, por permitir a utilização dos animais e toda infraestrutura da Fazenda Experimental de Entre Rios. Um especial obrigado a Nerivaldo, Uildo, Salgado e Carlos, funcionários que lá trabalham e sempre foram solidários aos meus pedidos.

À essa grande família que é o Grupo de Estudos em Reprodução Animal da UFBA (GERA). Ao professor Antônio de Lisboa, pela oportunidade, pelos ensinamentos dados através de seu exemplo como profissional e grande disciplina. Ao professor Chalhoub, pelo acolhimento e oportunidades em visitas à campo. Ao professor Rodrigo Bittencourt, mais que um tutor, parceiro de diversos momentos, conselheiro, grande batalhador pela pesquisa e pelo enriquecimento de nosso setor, muito obrigado por acreditar em mim. Ao professor Marcus Vinícius, obrigado pela paciência e ensinamentos desde a época de visitas técnicas como autônomo onde pude aprimorar minhas habilidades. Obrigado pelas lições de humildade, parceria forte, grande habilidade em lidar com pessoas e pelo conteúdo que você agregou em minha vida pessoal e profissional.

Aos funcionários do setor, Gal, Carmolino e Dona Deise, pessoas fantásticas de extrema competência, sempre atenciosos, pacientes e companheiros.

Quero agradecer a três amigos que fiz na residência e que levo até hoje comigo, Mariana, Tiago e Elisiane (Índia). Vocês foram “alavanca” e “trampolim” para que eu conquistasse meus objetivos, além de me proporcionarem um ambiente de trabalho sempre leve e cheio de alegrias, sinto saudades!

Aos estagiários do setor, nossos “motorzinhos”, ajuda mais que indispensável de suma importância para que eu concluísse nosso trabalho. Em especial, agradeço a Isabela, Renata, Aline, João, Felipinho, Kárita, Adrielle, Gleice e Bia. Somo a estes, meus companheiros de pós-graduação, Endrigo, Gabriel, Lindomar, Mônica e meu grande amigo, Maicon.

Aos meus familiares, que sempre me apoiaram e estiveram comigo para harmonizar minhas responsabilidades de casa e pós-graduando. À minha mãe, Sueli, e minhas irmãs Lavínia e Vanessa, minhas fortalezas! À você também Mamai Planzo, meu complemento, minha plenitude. Por fim, ao meu filho Bernardo, refúgio pela pureza de criança e dono do sorriso mais lindo do mundo!

RESUMO

MAGGITTI JUNIOR, L. D. P. **Dinâmica folicular, função luteal e momento da ovulação em protocolos de IATF em bubalinos (*Bubalus bubalis*)**. 2019. 53p. Dissertação/pré-defesa (Requisito parcial. Mestre em Ciência Animal nos Trópicos) - Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade Federal da Bahia. 2019.

A fim de avaliar os efeitos da eCG, BE e GnRH na dinâmica folicular e características luteais de búfalas (*Bubalus bubalis*) em programas de sincronização da ovulação, 40 fêmeas foram submetidas a diferentes protocolos de IATF. No dia 0 todos os animais receberam um dispositivo intravaginal de P4 (1,0g), associado a 2mg de BE e 0,5mg do cloprostenol sódico. No D9, ocorreram as retiradas dos implantes e foi administrado 0,5mg do cloprostenol sódico em todos os animais e 400UI de eCG em metade das búfalas. No D10 (24h após a remoção dos implantes) metade das fêmeas tratadas com eCG e metade das fêmeas não tratadas com eCG receberam 1,0mg de BE. No D11 a outra metade das fêmeas tratadas com eCG e das fêmeas que não foram tratadas receberam 10µg de um análogo do GnRH (acetato de busarelina). Desta forma, foram constituídos os quatro grupos experimentais: C/eCG+GnRH (n= 10), S/eCG+GnRH (n= 10), C/eCG+BE (n= 10) e S/eCG+BE (n= 10). Com o recurso da ultrassonografia em modo B e *Power-Doppler*, avaliaram-se as características foliculares no DFol (D9, D10 e D11), DFOV, TXFol, VFOV, %VFOV e MOV na dinâmica folicular, além do DCLD18, VCL, %VCL e dosagens de P4D18 para a função luteal. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste de *Tukey*, *Kruskal-Wallis* e ANOVA de medidas repetidas com nível de significância de 5%. Não foi verificada diferença significativa entre os tratamentos de IATF C/eCG ou S/eCG, associados ao GnRH ou BE como indutores da ovulação, para nenhuma das características foliculares avaliadas durante os momentos da dinâmica. Foram encontradas diferenças estatísticas significativas para o DCLD18 com $1,78 \pm 0,12$ cm no grupo C/eCG+BE e $1,62 \pm 0,11$ cm no grupo S/eCG+BE ($P= 0,047$), além de, nas dosagens de P4 entre os tratamentos C/eCG+GnRH ($4,09 \pm 0,94$ ng/mL) e S/eCG+GnRH ($2,80 \pm 0,70$ ng/mL), $P= 0,017$. Quanto as variáveis avaliadas pelo modo *Power-Doppler*, não foi verificado nenhuma diferença estatística entre os grupos experimentais. Concluiu-se que a utilização da eCG associada ao BE ou GnRH possibilitaram eficientes sincronização e indução da ovulação em búfalas lactantes submetidas a um protocolo de IATF, devendo-se levar em consideração também o fator custo/benefício que foi favorável ao uso do BE como indutor da ovulação.

PALAVRAS-CHAVE: Búfala, Corpo lúteo, folículos, gonadotrofina coriônica equina.

ABSTRACT

MAGGITTI JUNIOR, L. D. P. **Follicular dynamics, luteal function and moment of ovulation in FTAI protocols in buffaloes (*Bubalus bubalis*)**. 2019. 53p. Dissertação/pré-defesa (Requisito parcial. Mestre em Ciência Animal nos Trópicos) - Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade Federal da Bahia. 2019.

In order to evaluate the effects of eCG, BE and GnRH on follicular dynamics and luteal characteristics of buffaloes (*Bubalus bubalis*) on ovulation synchronization programs, 40 females were submitted to different FTAI protocols. At day 0 all the animals received an intravaginal device of P4 1.0g, associated to 2mg of BE and 0,5mg of the cloprostenol sodium. In D9, implant withdrawals occurred and 0.5mg of sodium cloprostenol was administered in all animals and 400UI of eCG in half of the buffaloes. In D10 (24 hours after implant removal) half of the eCG-treated females and half of the non-eCG-treated females received 1.0 mg of BE. In D11 the other half of the eCG treated females and the untreated females received 10 μ g of a GnRH (buserelin acetate) analogue. Thus, the four experimental groups were: C/eGC+GnRH (n = 10), S/eGC+GnRH (n= 10), C/eCG+BE (n= 10) and S/eCG+BE (n= 10). The follicular characteristics of DFol (D9, D10 and D11), DFOV, TXFol, VFOV, % VFOV and MOV in follicular dynamics were evaluated using B-mode and Power-Doppler ultrasonography, as well as the DCLD18, % VCL and dosages of P4D18 for the luteal function. Statistical analyzes were performed using the Tukey test, Kruskal-Wallis test and repeated measures ANOVA with a significance level of 5%. There was no significant difference between the treatments of IATF C/eCG or S/eCG, associated to GnRH or BE as inductors of ovulation, for none of the follicular characteristics evaluated during moments of the dynamics. Significant statistical differences were found for DCLD18 with 1.78 \pm 0.12 cm in the C/eCG+BE group and 1.62 \pm 0.11 cm in the S/eCG+BE group (P = 0.047), as well as in the P4 between treatments C/eCG+GnRH (4.09 \pm 0.94 ng/mL) and S/eGC+GnRH (2.80 \pm 0.70 ng/mL), P = 0.017. Regarding the variables evaluated by Power-Doppler mode, no statistical difference between the experimental groups was verified. It was concluded that the use of eCG associated with BE or GnRH enabled efficient synchronization and induction of ovulation in lactating buffaloes submitted to an FTAI protocol, and it should also be taken into account the cost / benefit factor that favored the use of BE as ovulation inducer.

KEYWORDS: Buffaloes, corpus luteum, follicles, equine chorionic gonadotrophin.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 – Diagrama de atividades para estudo da dinâmica folicular e luteal do protocolo de sincronização da ovulação para búfalas (<i>Buballus bubalis</i>) lactantes.....	31
Figura 2 – Avaliações ultrassonográficas em modo B (A) e <i>Power-Doppler</i> (B) para obtenção das medidas do diâmetro folicular e vascularização da parede do folículo.....	32
Figura 3 – Avaliações ultrassonográficas em modo B e <i>Power-Doppler</i> . (A) Cálculo da área de vascularização da parede folicular utilizando-se o cursor e função do próprio aparelho. (B) e cálculo da área total da parede folicular utilizando-se a função elipse do próprio aparelho	33
Figura 4 – Figura 4 – (A) Avaliação ultrassonográfica em modo B para determinação do CL (cm), utilizando-se a função <i>Caliper</i> . (B) Avaliação <i>Power-Doppler</i> para cálculo da área total e cálculo da área de vascularização do CL, utilizando-se funções do próprio aparelho.....	34
Figura 5 – Média do diâmetro folicular a partir do dia nove (D9) do programa de IATF até ovulação nos quatro distintos protocolos de sincronização (S/eCG+GnRH, C/eCG+GnRH, S/eCG+BE e C/eCG+BE)	37
Figura 6 – Média da área da parede folicular a partir do dia nove (D9) do programa de IATF até a ovulação nos quatro distintos protocolos de sincronização (S/eCG+GnRH, C/eCG+GnRH, S/eCG+BE e C/eCG+BE)	38

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 – Efeitos dos protocolos propostos para sincronização (S/eCG+GnRH, C/eCG+GnRH, S/eCG+BE e C/eCG+BE) sobre as características foliculares avaliadas por ultrassonografia em modo B e <i>Power Doppler</i>	36
Tabela 2 – Efeitos dos protocolos propostos para sincronização (S/eCG+GnRH, C/eCG+GnRH, S/eCG+BE e C/eCG+BE) sobre as características luteais avaliadas por ultrassonografia em modo B e <i>Power-Doppler</i> e dosagens de progesterona (P4) no dia 18 do protocolo de IATF.....	40
Tabela 3 – Demonstrativo do impacto dos fármacos utilizados nos custos dos protocolos de IATF dos grupos experimentais, indicando o custo total do protocolo para um animal e os percentuais de cada hormônio no valor total por protocolo.....	43

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

µg: Micrograma

%: Percentagem

% VCL D18: Percentual de vascularização do corpo lúteo no dia dezoito

% VCL: Percentual de vascularização do corpo lúteo

% VFOV: Percentual de vascularização do folículo pré-ovulatório

ACL D18: Área do corpo lúteo no dia dezoito

ACL: Área do corpo lúteo

AFol D10: Área do folículo dominante no dia dez

AFol D11: Área do folículo dominante no dia onze

AFol D9: Área do folículo dominante no dia nove

AFOV: Área do folículo pré-ovulatório

ANOVA: Análise de variância

BE: Benzoato de estradiol

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Bahia

CL: Corpo Lúteo

CLG: Células luteais grandes

CLP: Células luteais pequenas

cm/d: Centímetros por dia

cm: Centímetro

cm²: centímetros quadrados

CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

D-10: Dia menos 10

D0: Dia zero

D9: Dia nove

D10: dia dez

D11: dia onze

D18: Dia dezoito

DCL: Diâmetro do corpo lúteo

DCL D18: Diâmetro do corpo lúteo no dia dezoito

DFol D9: Diâmetro do folículo dominante no dia nove

DFol D10: Diâmetro do folículo dominante no dia dez

DFol D11: Diâmetro do folículo dominante no dia onze

DFOV: Diâmetro do folículo pré-ovulatório
E2: Estrógeno
ECC: Escore de condição corporal
eCG: Gonadotrofina coriônica equina
FAO: Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
FGF: fator de crescimento fibroblástico 2
FSH: Hormônio folículo estimulante
GnRH: Hormônio liberador de gonadotrofinas
h: Horas
IA: inseminação artificial
IATF: Inseminação artificial em tempo fixo
im: intramuscular
LH: Hormônio luteinizante
MAPA: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
mg: Miligrama
MHz: Megahertz
mm: milímetro
MOV: Momento da ovulação após a retirada do dispositivo de progesterona
n: Número
ng/mL: nanogramas por mililitros
Perc.: Percentual
P4 D18: Concentração sérica de progesterona no dia dezoito
P4: Progesterona
PGF2 α : Prostaglandina 2 α
TETF: Transferência de embrião em tempo fixo
TXFol: Taxa de crescimento folicular
TxOV: Taxa de ovulação
UI: Unidades internacionais
VCL D18: Vascularização do corpo lúteo no dia dezoito
VCL: Vascularização do corpo lúteo
VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular
VFOV: Vascularização do folículo pré-ovulatório

SUMÁRIO

	Página
1 Introdução	13
2 Objetivos	14
3 Hipóteses	15
4 Revisão de Literatura	16
4.1 Fisiologia do ciclo estral em bubalinos	16
4.1.1 Dinâmica Folicular.....	17
4.1.2 Dinâmica Luteal.....	19
4.2 Controle farmacológico do ciclo estral na IATF	21
4.2.1 Controle da onda folicular	21
4.2.2 Término da fase luteínica.....	23
4.2.3 Indução da ovulação (BE e GnRH)	24
4.2.4 Suporte gonadotrófico (eCG)	25
4.3 Ultrassonografia convencional e doppler na avaliação folicular e luteínica	27
5 Material e Métodos	30
5.1 Local e animais	30
5.2 Protocolo de sincronização da ovulação	30
5.3 Avaliações ultrassonográficas	31
5.3.1 Dinâmica folicular	32
5.3.2 Função Luteal (morfologia e dosagens de P4)	33
5.3.3 Delineamento experimental e análise estatística	34
6 Resultados e discussão	36
7 Conclusões.....	44
Referências.....	45

1 INTRODUÇÃO

No mundo, o búfalo (*Bubalus bubalis*) atingiu a marca de 199.280.228 cabeças (FAO, 2016), destacando-se como a principal espécie da pecuária do Sudeste Asiático e do Oriente Médio, tendo em vista ser uma espécie de potencial produtivo pouco explorado se comparada a qualquer outra nestas regiões (BAITHALU et al., 2013). No Brasil (1,38 de cabeças; IBGE, 2017), onde ocorreu a organização da cadeia produtiva de carne ou leite, a expansão da bubalinocultura tem sido expressiva e sua exploração tem se mostrado importante fator de elevação da renda média e fixação do homem no campo (BERNARDES, 2007).

As búfalas são consideradas poliéstricas sazonais com fotoperíodo negativo, principalmente nos ambientes subtropicais e de elevadas latitudes (PERERA, 2008). Entretanto, nas regiões tropicais onde o fotoperíodo é relativamente constante, as fêmeas são consideradas poliéstricas anuais, sofrendo maior influência no ciclo estral por fatores como a pluviosidade, disponibilidade e qualidade da forragem (PERERA, 2011), estresse térmico ambiental, interação social, data do parto e lactação (ROSA e BRYANT, 2003). A espécie também é caracterizada pela baixa expressão do estro o que contribui para a queda da eficiência reprodutiva (MIRMAHMOUDI e PRAKASH, 2012).

Haja vista estas peculiaridades da espécie, as biotecnologias reprodutivas como a inseminação artificial (IA) e a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) podem ser estratégias capazes de mitigar tais influências (MIRMAHMOUDI e PRAKASH, 2014). No entanto, a utilização da técnica de IA convencional apresenta duas dificuldades significativas nos bubalinos. A primeira está relacionada a detecção ineficiente do estro devido ao discreto comportamento observado e a segunda relaciona-se ao anestro sazonal e nutricional que levam à diminuição da atividade reprodutiva na espécie (BARUSELLI et al., 2013).

Uma maneira para melhorar a eficiência reprodutiva é a administração de hormônios exógenos capazes de induzir a ciclicidade e sincronizar a ovulação (BARUSELLI et al., 2007; CARVALHO et al., 2013). Estimular o crescimento do folículo dominante com gonadotrofinas pode ser uma estratégia para aumentar as taxas de ovulação e gestação com a sincronização dos protocolos de ovulação em búfalas no anestro, tanto em vacas quanto novilhas (CARVALHO et al., 2016).

A administração do GnRH em bubalinos induz a ovulação em 80% das fêmeas, alcançando níveis satisfatórios durante a sincronização da ovulação nos protocolos de IATF (CARVALHO et al., 2007, 2014; MARUGAVEL et al., 2009). Entretanto, o uso do BE como indutor da ovulação apresenta algumas vantagens em comparação ao GnRH, que inclui custo,

programação mais prática de manejos antes da IATF, maior tônus uterino e relativa facilidade de inseminação (MIRMAHMOUDI et al., 2014). Por isto, também fornece exposição a concentrações mais altas de estradiol durante o proestro e estro, o que provavelmente cria um melhor ambiente uterino para o desenvolvimento embrionário (BRIDGES et al., 2012).

Stella e colaboradores (2018), concluíram que a administração da eCG após a remoção de um implante auricular em búfalas da raça Murrah em lactação favoreceu o desenvolvimento folicular, indicando sua adição ao protocolo de sincronização para um retorno pós-parto mais eficiente às atividades reprodutivas. A eCG também favorece o desenvolvimento do corpo lúteo, pois possui uma meia-vida longa que permite sua conexão com os receptores de LH do CL, promovendo maior expressão gênica dos fatores angiogênicos VEGF e FGF2 e a multiplicação das células luteais grandes responsáveis para a produção de progesterona, essencial para a manutenção da gestação (SOUZA et al., 2009; ATLI et al., 2017).

Neste sentido, uma melhor compreensão da dinâmica folicular e luteal em búfalos (VECCHIO et al., 2012) se faz necessária para o desenvolvimento de novas técnicas e aprimoramento dos tratamentos atualmente utilizados para a manipulação do ciclo estral em animais cíclicos e acíclicos (YNDEE et al., 2011; BARUSELLI et al., 2013). Este estudo teve a finalidade de avaliar os efeitos da eCG, BE e GnRH na dinâmica folicular e características luteais de búfalas (*Bubalus bubalis*) em diferentes protocolos de sincronização da ovulação em tempo fixo.

OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a utilização da eCG associada ao BE ou ao GnRH sobre a dinâmica folicular e características luteais de búfalas, mestiças e lactantes, submetidas a diferentes protocolos de IATF.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a influência da eCG nas características morfofuncionais foliculares e luteínicas em búfalas mestiças durante diferentes protocolos de IATF, que utilizaram GnRH ou BE como indutores da ovulação.
- Avaliar os efeitos do BE ou GnRH no momento da ovulação de búfalas mestiças submetidas a diferentes protocolos de IATF.
- Avaliar o custo/benefício da utilização do BE ou do GnRH como indutores da ovulação em búfalas submetidas a diferentes protocolos de IATF.

2 HIPÓTESES

- A utilização da eCG, como suporte gonadotrófico, deve incrementar a dinâmica folicular e função luteal em búfalas mestiças.
- O BE pode substituir o GnRH como indutor da ovulação nos protocolos de IATF em búfalas mestiças submetidas a protocolos de IATF.
- Protocolos de IATF para bubalinos que utilizam o BE como indutor da ovulação tem melhor custo/benefício.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 FISIOLOGIA DO CICLO ESTRAL EM BUBALINOS

Os bubalinos exibem características sazonais na sua atividade reprodutiva, tornando-se sexualmente ativos em resposta à diminuição da duração do dia no final do verão e início do outono (CARVALHO et al., 2016). Esta mudança fisiológica é influenciada por padrões de liberação de melatonina (BORGHESE, 2005).

À medida que os dias se tornam mais curtos, elevam-se os níveis séricos de melatonina produzida e secretada na ausência de luz, e através de uma ação complexa no eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal é estimulada a secreção de GnRH pelo hipotálamo. Assim, as diferenças na duração do dia são reconhecidas e traduzidas em sinais que interferem diretamente na atividade sexual (DI FRANCESCO, 2010).

Nos trópicos, onde o fotoperíodo é pouco variável, as búfalas apresentam-se como poliétricos anuais capazes de se reproduzir ao longo do ano. O ciclo estral tem modulações anuais influenciadas pela pluviosidade, disponibilidade e a qualidade da forragem (PERERA, 2011), temperatura ambiental, interação social, data do parto e lactação (ROSA e BRYANT, 2003). Entretanto, nos ambientes subtropicais e em altas latitudes, o fator preponderante na influência da função reprodutiva em búfalos é o fotoperíodo (ZICARELLI, 1989, 1997; BARUSELLI, 1993).

Dessa forma, a medida que se afasta da linha do Equador, as fêmeas se tornam poliétricas sazonais (BARUSELLI, 2001, CAMPANILE et al., 2010) e aquelas com partos durante a estação não reprodutiva podem apresentar anestro pós-parto prolongado sem retomada da ovulação até a estação de reprodução subsequente (ZICARELLI, 2007).

As novilhas desta espécie, geralmente atingem a puberdade quando chegam a 55-60% do seu peso adulto, havendo grande variação entre 18 e 46 meses. Fatores que influenciam esta característica são genótipo, nutrição, manejo, ambiente social, clima, ano ou estação de nascimento e enfermidades (PERERA, 2011). Apesar de alcançarem a puberdade mais tardiamente que os bovinos, apresentam uma vida reprodutiva mais longa, o que tende a compensar esta desvantagem econômica inicial (BORGHESE, 2005).

A duração do ciclo estral nas búfalas assemelha-se a das vacas, variando de 16 a 28 dias, com média de 21 dias (CAMPANILE et al., 2010) e a duração média do estro é tipicamente de 8 a 20 horas (MOHAN et al., 2010). Já a ovulação ocorre em torno de 24-48h (média 34h) após

o início do estro, ou 6-21h (média 14 h) após o final do estro (KANAI et al., 1990; PERERA, 1999).

As fêmeas que estão ciclando durante a estação não favorável podem mostrar duração variável do estro, de 2 a 72 horas (ZICARELLI et al., 1988; BARUSELLI, 2001). Independentemente da estação ser favorável à reprodução ou não, as búfalas apresentam uma baixa expressão do estro em comparação com as fêmeas bovinas (OHASHI, 1994), que se caracteriza por um menor comportamento de monta associado ao estro e menor produção de muco (ROY E PRAKASH, 2009).

A retomada da atividade ovariana, verificada pela observação visual do primeiro estro ocorre em média $47,06 \pm 25,66$ dias do pós-parto, enquanto que a involução uterina verificada por palpação retal e exames ultrassonográficos foi de $27,5 \pm 7,77$ dias. Portanto, as causas de baixa eficiência reprodutiva podem ser atribuídas a interações entre o genótipo e o meio ambiente incluindo-se o clima, manejo nutricional e doenças (ROLIM FILHO et al., 2011).

3.1.1 Dinâmica Folicular

A dinâmica folicular é o processo contínuo de crescimento e regressão de um grupo de folículos antrais, um dos quais se desenvolve até atingir o estágio folicular pré-ovulatório. O estudo da dinâmica folicular durante o ciclo estral pode fornecer a base para melhorar a fertilidade, sincronizar o estro com mais precisão e aumentar a resposta ovulatória (NEGLIA et al., 2007).

Embora o ciclo de duas ondas seja o mais comum em búfalas (63,3%), ciclos de 3 e 1 onda também foram relatados (NEGLIA et al., 2007; BARUSELLI et al., 2013). Nas búfalas que apresentam 3 ondas foliculares no ciclo estral a fase lútea é mais longa e o intervalo entre ovulações é maior em comparação com ciclos que tem 2 ondas foliculares (CAMPANILE et al., 2010).

Segundo Baruselli e colaboradores (1997), os ciclos de duas e três ondas diferiram ($p < 0,05$) no que diz respeito ao diâmetro máximo no 1º folículo dominante ($1,51 \pm 0,24$ vs $1,33 \pm 0,18$ cm) e nos folículos ovulatórios ($1,55 \pm 0,16$ vs $1,34 \pm 0,13$ cm). Da mesma forma, ciclos de 2 e 3 ondas ainda diferiram sobre o tempo médio do intervalo entre ovulações ($22,27 \pm 0,89$ vs $24,50 \pm 1,88$ dias; $p < 0,01$), respectivamente, e sobre o tempo médio da fase luteal ($10,40 \pm 2,11$ vs $12,66 \pm 2,91$ dias; $p < 0,05$), indicando que o número de ondas por ciclo está associado com a fase luteal e com a duração do ciclo estral.

Outra característica das ondas foliculares das búfalas é o número de folículos recrutados por onda folicular em menor quantidade que na espécie bovina (GIMENES et al., 2009, CAMPANILE et al., 2010). Esta diferença parece estar associada a um pequeno reservatório de folículos primordiais em búfalas (10.000 a 20.000) comparado aos das fêmeas bovinas (100.000) (PERERA, 2011).

As características fundamentais do recrutamento, seleção, dominância e atresia folicular durante uma onda folicular em búfalos são semelhantes às descritas para bovinos (BARUSELLI et al., 1997; MANIK et al., 2002). Sendo que avaliações ultrassonográficas dos ovários indicaram que folículos pré-ovulatórios atingiram diâmetros de 1,30 a 1,60cm (MIRMAHMOUDI et al., 2014).

A concentração sérica de 17β -estradiol durante a fase folicular do ciclo estral também parece ser relativamente menor que no bovino, sugerindo-se que a intensidade reduzida do estro em búfalos estaria associada, pelo menos em parte, a esta baixa concentração (SEREN et al., 1995; ROY e PRAKASH, 2009). Entretanto, as concentrações de hormônios gonadotróficos no sangue de búfalos indicam que os padrões temporais de LH e FSH são basicamente semelhantes aos dos bovinos (ROY e PRAKASH, 2009), com um pico de LH pré-ovulatório ocorrendo no dia do cio e durante 7 a 12 horas.

As concentrações plasmáticas de FSH são maiores no início do ciclo estral e diminuem durante a fase lútea. Durante o período pós-parto, os níveis plasmáticos de FSH são baixos, sem variação significativa. Enquanto que as concentrações circulantes de LH atingem um pico no início do estro, seguido por uma diminuição acentuada, permanecendo baixa durante a fase lútea (PRESICCE et al., 2004).

Uma informação precisa a respeito da seleção folicular em búfalas ainda não está bem esclarecida. Entretanto, segundo Gimenes e colaboradores (2011), o desvio folicular ocorre 2,6 dias após a ovulação em novilhas bubalinas, quando os diâmetros do folículo dominante e do subordinado foram de 0,72 e 0,64cm, respectivamente. Não sendo detectadas alterações significativas nas concentrações plasmáticas de FSH ou LH, observando-se que a aquisição da capacidade ovulatória ocorreu quando o folículo dominante atingiu 0,85cm de diâmetro.

Em estudos com bubalinos em ciclos estrais regulares, os folículos dominantes atingiram um tamanho de 1,30 a 1,50cm antes da ovulação, sugerindo-se ainda que em condições normais seus folículos adquiriram a capacidade de ovular em torno de 0,5 a 0,8cm de diâmetro, mas que estes deveriam sofrer um maior desenvolvimento, a fim de secretar estradiol suficiente para produzir um *feedback* positivo e induzir o pico pré-ovulatório de LH (BARUSELLI et al., 1997; NEGLIA et al., 2007).

3.1.2 Dinâmica Luteal

O corpo lúteo (CL), uma glândula endócrina transitória, desempenha um papel central na regulação de vários processos reprodutivos, como o controle do ciclo estral, desenvolvimento embrionário, implantação e a manutenção da gestação (BAITHALU et al., 2013).

Durante o curso do ciclo estral, os tecidos luteais exibem mudanças estruturais e funcionais drásticas, incluindo um impressionante crescimento tecidual, seguido por regressão, mudanças na densidade do leito vascular e na secreção de progesterona (CHOUHAN et al., 2014).

O desenvolvimento da função lútea em mamíferos requer a formação de novos vasos capilares que invadem as células da teca da parede folicular. O CL maduro é um tecido endócrino altamente vascularizado, e o número de células endoteliais microvasculares neste tecido excede 50% do número total de células (CHOUHAN et al., 2015).

Entre várias moléculas implicadas como mediadores da angiogênese no CL, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) parece desempenhar um papel crítico na regulação do crescimento vascular, desenvolvimento e função do CL em várias espécies, como ratos, saguis, humanos, bovinos, suínos e bubalinos (CHOUHAN et al., 2015).

Nos mamíferos, o CL é composto principalmente por células esteroideogênicas e não esteroideogênicas, responsáveis pela produção de progesterona (SALES e ARAÚJO, 2010). As células esteroideogênicas incluem as células luteais grandes (CLG) e células luteais pequenas (CLP) tendo sido relatadas como originárias de células da teca e granulosa, respectivamente. Durante o desenvolvimento do CL com o avanço dos estágios do ciclo estral e a gestação, há transformação da CLP em CLG (ALILA e DOWND, 1991).

O corpo lúteo na espécie bubalina é de menor diâmetro do que o dos bovinos, muitas vezes não se projetando na superfície ovariana e comumente apresenta-se menos evidente. Imagens ultrassonográficas indicam corpos lúteos maduros de 1,20 a 1,70cm de diâmetro (PERERA, 2011). As mudanças nas concentrações de P4 no sangue e no leite durante o ciclo estral são semelhantes às dos bovinos, mas o platô de concentração é relativamente menor (DOBSON e KAMONPATANA, 1986; PERERA et al., 1987; SINGH et al., 2001).

Durante o ciclo estral, os níveis de progesterona são basais imediatamente após a ovulação, aumentam entre os 4 a 7 dias subsequentes e atingem níveis máximos por volta do 15º dia após o início do estro (DE RENSIS e LÓPEZ-GATIUS, 2007). O CL secreta progesterona por cerca de 15 dias e as concentrações séricas máximas de 5 a 12 ng/mL entre o

6° e o 16° dia (SEREN et al., 1995). O primeiro CL pós-parto geralmente desencadeia uma fase lútea curta (6 a 13 dias) e concentração circulante relativamente baixas de progesterona. Os ciclos estrais curtos, menor que 18 dias, na retomada da ovulação pós-parto ocorrem em torno de 25 a 45% das fêmeas (CAMPANILE et al., 2010).

Segundo Baithalu e colaboradores (2013), a população de células luteais totais em CL de búfalas foi menor do que a relatada anteriormente em vacas, o que pode ser responsável pela menor capacidade secretora de progesterona do CL nas búfalas. Aumento no diâmetro do CL do 5° ao 10° dia e concentração de P4 do 10° ao 25° dia após a inseminação artificial (IA) relatada como maior em búfalas gestantes do que não gestantes, indicam a importância do diâmetro adequado do CL para manutenção da gestação (VECCHIO et al., 2012).

Um cenário típico para búfalas que entram no período de transição para o anestro sazonal é um declínio progressivo na atividade de CL em ciclos sucessivos antes do anestro (VECCHIO et al., 2012). Outra importante observação foi relatada por Di Francesco e colaboradores (2012) ao compararem a época de reprodução com o período de transição. Segundo estes autores, durante o período de transição uma proporção relativamente baixa de búfalos tem função de CL e concentrações de progesterona necessárias para estabelecer uma gestação. Os valores totais de P4 entre os animais na estação favorável e no período de transição, independente se gestante ou não, foram de $4,6 \pm 0,3$ e $1,6 \pm 0,1$ ng/mL no dia 10 após IA ($p < 0,001$) e de $3,4 \pm 0,2$ e $1,8 \pm 0,2$ ng/mL no dia 20 após IA ($p < 0,001$), respectivamente.

Em um estudo conduzido por Russo e colaboradores (2010), em búfalas no período de transição, o diâmetro do CL determinado pela ultrassonografia em modo B não estava intimamente relacionado à secreção de P4 ou a gestação à inseminação artificial. No mesmo estudo, um fluxo sanguíneo apropriado em torno do 10° dia após IA, indicou ótima função do CL e foi correlacionado ao aumento da probabilidade de gestação nos bubalinos.

Desta forma, o estudo da dinâmica luteal durante o ciclo estral e gestação pode potencializar o uso de agentes luteotrópicos seletivos em um tipo particular de células luteais para aumentar a produção de P4 (BAITHALU et al., 2013). Assim como, estas informações favoreceram na condução de novas estratégias para reduzir as mortalidades embrionárias precoce e tardia, bem como sua utilização no diagnóstico precoce da prenhez (RUSSO et al., 2010; VECCHIO et al., 2012).

3.2 CONTROLE FARMACOLÓGICO DO CICLO ESTRAL NA IATF

A baixa expressão do estro e um intervalo entre partos prolongado comprometem a eficiência reprodutiva das fêmeas bubalinas, principalmente durante as estações de dias longos quando a fertilidade diminui drasticamente. Para melhorar a eficiência reprodutiva, vários protocolos de sincronização do estro e da ovulação foram desenvolvidos (DE RENSIS e LÓPEZ-GATIUS, 2007).

Os estudos iniciais sobre a sincronização do estro em búfalos foram baseados naqueles desenvolvidos para bovinos, visando induzir a luteólise prematura usando prostaglandinas ou prolongando a fase lútea usando progestágenos (PERERA, 2011). Além disso, uma manipulação mais precisa do desenvolvimento folicular pode ser necessária para alcançar uma melhor sincronização da ovulação e melhorar a fertilidade (DE RENSIS e LÓPEZ-GATIUS, 2007).

Assim, terapias hormonais para indução de estro e da ovulação nas búfalas são estratégias importantes para a superação da sazonalidade reprodutiva, perda de qualidade e disponibilidade da foragem, alterações na pluviosidade e lactação. Esses tratamentos hormonais foram desenvolvidos para controlar a função folicular e lútea, sincronizar o estro e a ovulação e, mais importante, eliminar a detecção de estro pela inseminação artificial em um tempo pré-fixado (IATF) (PERERA et al., 2011; CARVALHO et al., 2016).

3.2.1 Controle da onda folicular

O desenvolvimento folicular e a ovulação em búfalos podem ser controlados pelo uso de diferentes combinações hormonais. A utilização do GnRH já foi amplamente comprovada na manipulação do desenvolvimento ovariano em bovinos. Sua administração desencadeia um pico de LH durante o ciclo estral, promovendo a ovulação de um folículo ovulatório ou induzindo a luteinização e/ou atresia de folículos em estágio de pré-dominância (DE RENSIS e LOPÉZ-GATIUS, 2007).

Os relatos indicam que a administração de GnRH nas búfalas induzem a ovulação em 60 a 86% dos animais tratados (BARUSELLI, 2001; DE ARAUJO BERBER et al., 2002) e o intervalo entre a administração de GnRH e a ovulação é de $33 \pm 8,3$ h. Tornando-se preponderante, assim como no bovino, a presença de um folículo dominante no momento do tratamento para a indução da ovulação (BARUSELLI et al., 2001).

Vários protocolos de sincronização de estro e ovulação para bovinos e bubalinos foram desenvolvidos, permitindo o uso da IATF sem a detecção de estro (DE RENSIS e LOPÉZ-GATIUS, 2007). O Ovsynch é um destes protocolos consistindo em duas aplicações de hormônio liberador gonadotrófico (GnRH) combinado com a administração única de PGF2 α utilizado em búfalas cíclicas para sincronização da ovulação e IATF (GUPTA et al., 2015).

Estudos foram realizados para avaliar a eficiência do protocolo Ovsynch (Dia 0: GnRH; Dia 7: PGF2 α ; e Dia 9: GnRH e IATF 16 horas após a segunda injeção de GnRH) em bubalinos (BARUSELLI et al., 1999, 2003; DE ARAUJO BERBER et al., 2002). Nestes experimentos, as fêmeas cíclicas responderam aos tratamentos hormonais com aproximadamente 50% de prenhez na IATF durante a estação reprodutiva. Além disso, taxas de gestação entre 40% a 60% foram relatadas em outros estudos com o protocolo Ovsynch em búfalas cíclicas sincronizadas durante a estação favorável a reprodução (NEGLIA et al., 2003; PAUL e PRAKASH, 2005; ALI e FAHMY, 2007).

No entanto, protocolos semelhantes resultaram em uma resposta ovulatória reduzida ao serem instituídos em animais no anestro (SOUZA et al., 2015). Segundo estes autores, as fêmeas sem um CL no início do protocolo apresentaram resposta insatisfatória ao primeiro (42,0% vs. 89,8%) e segundo (52,0% vs 87,8%) tratamentos com GnRH, e essas falhas ovulatórias resultaram em menor taxa de gestação após IATF (20,0% vs. 65,3%, respectivamente) em comparação aos animais com CL.

Em contraste, a sincronização com a progesterona parece ter maior potencial nos bubalinos, assim como nos bovinos, particularmente para o tratamento durante o anestro sazonal (SINGH et al., 1988; CARVALHO et al., 2013; VECCHIO et al., 2013). O uso de P4, na forma de dispositivo de liberação controlada intravaginal juntamente com GnRH, mostrou resultados promissores em termos de fertilidade em búfalos (NASEER et al., 2011).

Outra forma de controle do desenvolvimento folicular são os protocolos a base de progesterona (P4) e benzoato de estradiol (BE). Essa combinação no início do protocolo induz a atresia folicular pela supressão da liberação de FSH e LH, e então a emergência sincronizada de uma nova onda folicular em resposta à liberação subsequente de FSH em bubalinos (BARUSELLI et al., 2007).

Em estudo realizado por Carvalho e colaboradores (2014), concluiu-se que as concentrações reduzidas de P4 circulante obtidas a partir de dispositivos intravaginais reutilizados, com diferentes concentrações de P4, durante o protocolo de sincronização de IATF foram efetivas no controle da dinâmica folicular ovariana em búfalas no período de anestro estacional. Além disso, esses baixos níveis de P4 não proporcionaram efeitos prejudiciais sobre

o diâmetro do folículo dominante, momento da ovulação, taxa de ovulação e taxa gestacional aos 30 dias em fêmeas lactantes submetidas ao protocolo de sincronização de IATF.

Desta forma, a exposição de búfalas em anestro a P4 estimularia o crescimento e a maturação de um folículo dominante, aumentando a liberação de LH e a indução de receptores de LH, e isso resultaria no aumento da secreção de E2 e nas taxas de ovulação. Evidenciando uma melhor alternativa aos períodos de anestro sazonal o uso de progestágenos aos protocolos de sincronização da ovulação (CARVALHO et al., 2016).

3.2.2 Término da fase luteínica

A duração da fase lútea do ciclo estral pode ser modificada pela administração de PGF2 α ou pelo uso de implantes de progesterona. Em búfalas, o efeito da administração de PGF2 α é muito semelhante ao observado em bovinos, sua utilização a partir do 5º dia do ciclo estral provoca a regressão do corpo lúteo. Subsequentemente, a progesterona decai rapidamente para concentrações basais dentro de 24h, resultando em indução de estro e ovulação (DE RENSIS e LOPÉZ-GATIUS, 2007).

A administração submucosa intravaginal de baixas doses de PGF2 α é tão eficaz na indução de luteólise quanto a intramuscular (im) convencional (CHOHAN, 1998). Os tratamentos com uma ou duas doses de PGF2 α em búfalos induzem o estro e a ovulação em cerca de 60 a 80% dos animais durante a época de reprodução (DE RENSIS e LÓPES-GATIUS, 2007).

Todas as fêmeas responderam ao protocolo de Heatsynch (uma aplicação de PGF2 α) com expressão de estro para o qual as ovulações foram induzidas em 80% das búfalas. O intervalo médio de tempo da ovulação após injeção de PGF2 α foi de 74 \pm 2 horas (68 a 84h) (MOHAN et al., 2009). Enquanto que, Paul e Prakash (2005), relataram que a ovulação ocorreu em 90% das fêmeas em 23,3 \pm 1,3 horas (intervalo 20 a 32h) após o tratamento com o segundo GnRH.

Os intervalos médios entre o início da aparição dos sinais de estro e a ovulação, relatados por Mirmahmoudi e Prakash (2014), foram de 13,8 \pm 0,9 e 13,4 \pm 1,0 horas após a primeira e segunda injeções de GnRH, respectivamente em protocolo Doublesynch (duas aplicações de PGF2 α). De um ponto de vista prático, os autores sugeriram que a IA poderia ser realizada 20 a 24h após a injeção de GnRH à medida que as ovulações foram registradas 23.2h do protocolo estabelecido.

A eficácia do tratamento com prostaglandinas em búfalas para regredir um CL funcional tem sido relatada como dependente da concentração plasmática de progesterona, do tamanho do CL e do status folicular ovariano antes da administração da prostaglandina (PRESICCE, 2007)

Assim, o intervalo de tempo entre o tratamento com PGF2 α e o início do estro no búfalo varia de acordo com o estágio de desenvolvimento folicular no momento da administração da PGF2 α . Os animais tratados quando os folículos estão no estágio de pré-dominância do desenvolvimento exibem estro 4 a 6 dias mais tarde, enquanto os animais tratados na presença de um folículo dominante exibem estro 2 a 3 dias após a administração de PGF2 α . Dessa forma, como os intervalos entre o tratamento, o estro e a ovulação variam após a administração de PGF2 α , um protocolo de inseminação artificial em tempo fixo não pode ser aplicado (DE RENSIS e LÓPEZ-GATIUS, 2007).

Protocolos envolvendo o uso de progestágenos para sincronizar o estro e a ovulação em búfalos são limitados, em comparação aos baseados em prostaglandinas. Estes regimes, por vezes, incluem a utilização de ésteres de estradiol no momento da introdução do implante de P4 e/ou PGF2 α no dia anterior a remoção do progestágeno (PRESICCE, 2007).

A ovulação geralmente ocorre 40-96 horas após a remoção do implante e o estro tem sido observado em 80-93% dos animais tratados. Também relata-se que o intervalo entre a remoção do dispositivo de progesterona e o estro pode variar de 43 a 117h e a taxa de prenhez após o tratamento varia de 20 a 50% (DE RENSIS e LÓPEZ-GATIUS, 2007). Ramoun e colaboradores (2017) relataram que o tempo ideal para IA foi entre 48 e 60 horas utilizando o implante vaginal/GnRH e, entre 60 e 72 horas no protocolo apenas com o implante para aumentar a fertilidade em búfalas.

3.2.3 Indução da ovulação (BE e GnRH)

Nos mais variados protocolos de sincronização do estro e IATF ocorrem a incorporação do GnRH, hCG, LH ou ésteres de estradiol para controlar o crescimento folicular e sincronizar a ovulação (CARVALHO et al., 2017). A administração do GnRH em bubalinos induz a ovulação em 80% das fêmeas, alcançando níveis satisfatórios durante a sincronização da ovulação nos protocolos de IATF (CARVALHO et al., 2007, 2014; MARUGAVEL et al., 2009).

O objetivo no uso de indutores da ovulação é promover um *feedback* positivo no eixo hipotalâmico-hipofisário, o pico pré-ovulatório de LH e a sincronização da ovulação

(JACOMINI et al., 2014). Portanto, se faz muito importante conhecer a janela temporal da ovulação para otimizar a eficiência da IA nos protocolos de IATF. Em algumas pesquisas a ovulação variou de 65 a 78h após remoção do implante de P4 (NASEER et al., 2011; CARVALHO et al., 2014, CARVALHO et al., 2017) ou de 22 a 23h após 1ª e 2ª dose de GnRH, respectivamente, em protocolo Doublesynch (MIRMAHMOUDI e PRAKASH, 2014).

O uso do BE, como indutor da ovulação, apresenta algumas vantagens em comparação ao GnRH, que inclui custo, programação mais prática de manejos antes da IATF, maior tônus uterino e relativa facilidade de inseminação (MIRMAHMOUDI et al., 2014). Por isto, também fornece exposição a concentrações mais altas de estradiol durante o proestro e estro, o que provavelmente cria um melhor ambiente uterino para o desenvolvimento embrionário (BRIDGES et al., 2012).

Ao avaliar a elevação do LH após administração do BE ou acetato de buserelina (análogo do GnRH) com ou sem dispositivo de P4 em búfalas ovariectomizadas, Jacomini e colaboradores (2014) verificaram que não houve correlação entre o tipo de indutor e a pré-exposição a P4. Porém, a pré-exposição a P4 antecipou em 6h o pico de LH quando o indutor foi o BE, o que não se observou no uso do análogo de GnRH. Adicionalmente, o BE proporcionou um maior pico de LH pré-ovulatório o que indicou, segundo estes autores, ser uma alternativa viável para os protocolos de sincronização da ovulação em bubalinos.

Carvalho e colaboradores (2012) também avaliaram a possibilidade de substituir o GnRH, como indutor da ovulação, por BE no protocolo IATF nos bubalinos. Os resultados indicaram uma satisfatória resposta folicular, taxa de ovulação e taxa de prenhez nas fêmeas sincronizadas durante a estação não favorável a reprodução.

Em estudo recente, Carvalho e colaboradores (2017) compararam o BE e o GnRH como indutores da ovulação na IATF, durante a estação não reprodutiva, em novilhas e vacas bubalinas. Estes autores concluíram que o estradiol é o tratamento de escolha em protocolos a base de progesterona para sincronizar a ovulação fora da estação reprodutiva. No tratamento proposto, não houve diferença estatística entre os indutores, bem como foi enfatizada a diferença econômica entre ambos, favorecendo o uso do BE.

3.2.4 Suporte gonadotrófico (eCG)

Durante a estação não reprodutiva, a taxa de ovulação pode estar comprometida nas búfalas em anestro após o uso de um protocolo baseado em P4. Portanto, estimular o crescimento do folículo dominante com gonadotrofinas pode ser uma estratégia para aumentar

as taxas de ovulação e gestação com a sincronização dos protocolos de ovulação em búfalas no anestro, tanto em vacas quanto novilhas (CARVALHO et al., 2016).

Concentrações pré-ovulatórias elevadas de estradiol resultaram em aumento do sucesso da fertilização, influenciando a sobrevivência dos embriões e o ambiente uterino (PERRY et al., 2014). Portanto, isso destaca a importância de promover o desenvolvimento de folículos ovulatórios saudáveis durante os protocolos de IATF, o que aumentaria a probabilidade de ovulação e concepção após a IATF (MONTEIRO et al., 2018).

O tratamento com dispositivos P4 intravaginais seguido por eCG na remoção do dispositivo tem sido usado para aumentar o diâmetro do folículo ovulatório, taxa de ovulação, taxa de crescimento CL e concentrações de P4 durante o diestro inicial após sincronização da ovulação e taxas de gestação após IATF em bubalinos durante a estação não reprodutiva (BARUSELLI et al., 2013; CARVALHO et al., 2013).

Sendo que, dados recentes demonstraram a necessidade de maior crescimento folicular durante o protocolo de IATF para atingir ovulação e taxas satisfatórias de gestação em búfalos (MONTEIRO et al., 2016). Stella e colaboradores (2018) concluíram que a administração de eCG após a remoção de um implante auricular em búfalas da raça Murrah em lactação favoreceu o desenvolvimento folicular, indicando sua adição ao protocolo de sincronização para um retorno pós-parto mais eficiente às atividades reprodutivas.

A eCG também favorece o desenvolvimento do corpo lúteo, pois possui uma meia-vida longa que permite sua conexão com os receptores de LH do corpo lúteo, promovendo maior expressão gênica dos fatores angiogênicos VEGF e FGF2 e a multiplicação das células luteais grandes responsáveis para a produção de progesterona, essencial para a manutenção da gestação (SOUZA et al., 2009; ATLI et al., 2017).

Desta forma, Monteiro e colaboradores (2018) concluíram que búfalas leiteiros criados em condições tropicais de pastejo podem apresentar eficiência reprodutiva semelhante após os protocolos de IATF, mesmo com sazonalidade reprodutiva marcante. Indicando a utilização do protocolo baseado em P4/E2/eCG para melhorar a eficiência reprodutiva em búfalas lactantes submetidas a programas de IATF durante a estação reprodutiva e não reprodutiva.

3.3 ULTRASSONOGRAFIA EM MODO B E *DOPPLER* NA AVALIAÇÃO FOLICULAR E LUTEÍNICA

Segundo Ginther (1986), na década de 80, o diagnóstico por ultrassonografia foi o avanço tecnológico mais contundente no que se refere a clínica reprodutiva de grandes animais desde a palpação transretal e o ensaio imunoenzimático para hormônios circulantes.

Não seria possível imaginar os diversos avanços e descobertas acerca da dinâmica ovariana, função uterina e viabilidade fetal sem o advento da ultrassonografia durante as últimas três décadas. O alcance desta tecnologia ultrapassou os centros de pesquisa chegando as atividades comerciais da pecuária, proporcionando melhorias no diagnóstico clínico e na eficiência reprodutiva de rebanhos de corte e leite (PUGLIESI et al., 2017).

A ultrassonografia convencional no modo brilho (modo B, escala de cinza), foi a mais utilizada inicialmente, sendo aquela onde há a visualização de imagem bidimensional dos órgãos e tecidos estudados. Sua utilização, ao longo dos anos, foi pautada por uma melhor avaliação de matrizes para iniciar os programas de IATF e da qualidade de receptoras para os programas de transferência de embriões em tempo fixo (TETF) (PUGLIESI et al., 2017).

Além disso, o uso da ultrassonografia modo B em tempo real ampliou o conhecimento sobre a dinâmica folicular em bubalinos, permitindo desenvolvimento de novas técnicas e o aprimoramento dos atuais tratamentos para manipulação do ciclo estral (YNDEE et al., 2011; BARUSELLI et al., 2013). Da mesma forma, contribui para estudos da morfofuncionalidade do CL (BAITHALU et al., 2013; CHOUHAN et al., 2014) e na otimização do manejo reprodutivo através da determinação da idade gestacional e do parto, além de certas condições patológicas do trato reprodutivo em búfalas (STELLETA et al., 2018).

Uma nova ferramenta avaliativa começou a ser utilizada recentemente no sistema reprodutivo da fêmea bovina e equina ao longo do ciclo estral e durante a gestação. Trata-se da ultrassonografia *Doppler*, que consiste na avaliação da funcionalidade de órgãos e tecidos através das alterações da perfusão sanguínea (PUGLIESI et al., 2017). Os aparelhos utilizados têm como referência a diferença entre a frequência de ondas refletidas em estruturas que estão se movimentando, com a frequência emitida pelo transdutor, assim obtém-se o deslocamento de frequência *Doppler* (SZATMARI et al., 2001).

A ultrassonografia *Doppler* tem aplicabilidade em três modos distintos: 1) Modo Espectral, que consiste na projeção de um gráfico bidimensional em função do tempo, dado pela diferença da frequência detectada, formando a onda *Doppler* durante o ciclo cardíaco na avaliação do fluxo sanguíneo de artérias. O software do próprio ultrassom calcula alguns índices

(índices de resistência e pulsatilidade), que são utilizados para avaliar a perfusão sanguínea do tecido alvo. 2) Modo *Color-Doppler*, as diferenças de frequências são traduzidas na forma de pontos coloridos na tela do equipamento sobre uma imagem em modo B convencional. As diferenças positivas, que tem o fluxo no sentido do transdutor, são geralmente em tons de vermelho a amarelo, enquanto que as negativas, fluxo sanguíneo em sentido contrário ao transdutor, são indicadas por tons de azul a verde. 3) Modo *Power-Doppler*, por fim é o que possibilita a mensuração da intensidade do fluxo sanguíneo, indicado pelo número de células sanguíneas se deslocando no vaso por unidade de tempo. A imagem apresenta a coloração diferente de acordo com a intensidade do fluxo no local analisado. Sua utilização pode ser indicada em estruturas com baixo fluxo sanguíneo, à exemplo da parede folicular (BOLLWEIN et al., 2016).

Outro exemplo, são as avaliações de viabilidade do corpo lúteo que podem ser realizadas mediante observação da vascularização dessa glândula, sendo esta uma das estruturas mais vascularizadas do organismo animal. Após a ovulação e concomitantemente as células da teca e da granulosa terem se diferenciado em grandes e pequenas células produtoras de progesterona, uma enorme rede de vasos começa a ser formada. Esta neoformação de vasos é essencial para dar suporte à produção de progesterona, que tanto é necessária para manutenção de uma possível gestação (GINTHER et al., 2007).

Nos modos *Color* e *Power-Doppler* podemos estimar as representações coloridas da perfusão sanguínea pela proporção tecidual com sinais coloridos ou pelo cálculo da quantidade de pixels coloridos. Outra opção é dada pela avaliação subjetiva através de uma escala de zero a quatro para a área em visualização (SILVA e GINTHER, 2010).

Estudos com búfalas, Papa e colaboradores (2007) relataram fortes correlações positivas entre a expressão do fator de crescimento endotelial vascular e a densidade vascular, com concentrações plasmáticas de progesterona. Sugerindo a ideia de que a angiogênese e a função do CL também estão intimamente relacionadas nesta espécie. Bem como, Russo e colaboradores (2009) que destacaram um fluxo sanguíneo satisfatório para o CL no 10º dia após a IA, seria ideal para a função do CL e chances de prenhez em búfalas.

Utilizando a função *Color-Doppler* (índices de resistência e pulsatilidade), Neglia e colaboradores (2012) avaliaram o fluxo sanguíneo do folículo pré-ovulatório e do CL de búfalas submetidas a IA e tratadas com um análogo da PGF2 α . Estes autores concluíram que o tratamento proposto não influenciou o fluxo sanguíneo dessas estruturas.

Assim, a ultrassonografia se mantém como técnica fundamental na monitoração do manejo reprodutivo seja no modo B ou *Doppler*. A inserção da ultrassonografia *Doppler* como

um método não invasivo e em tempo real é uma estratégia inovadora e de grande potencial para melhorar a fertilidade de programas reprodutivos, cabendo ainda mais estudos para o conhecimento do real ganho dessa técnica (PUGLIESI et al., 2017).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAL E ANIMAIS

O estudo foi realizado de acordo com preceitos éticos recomendados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), após aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Bahia (CEUA) sob o número 27/2018.

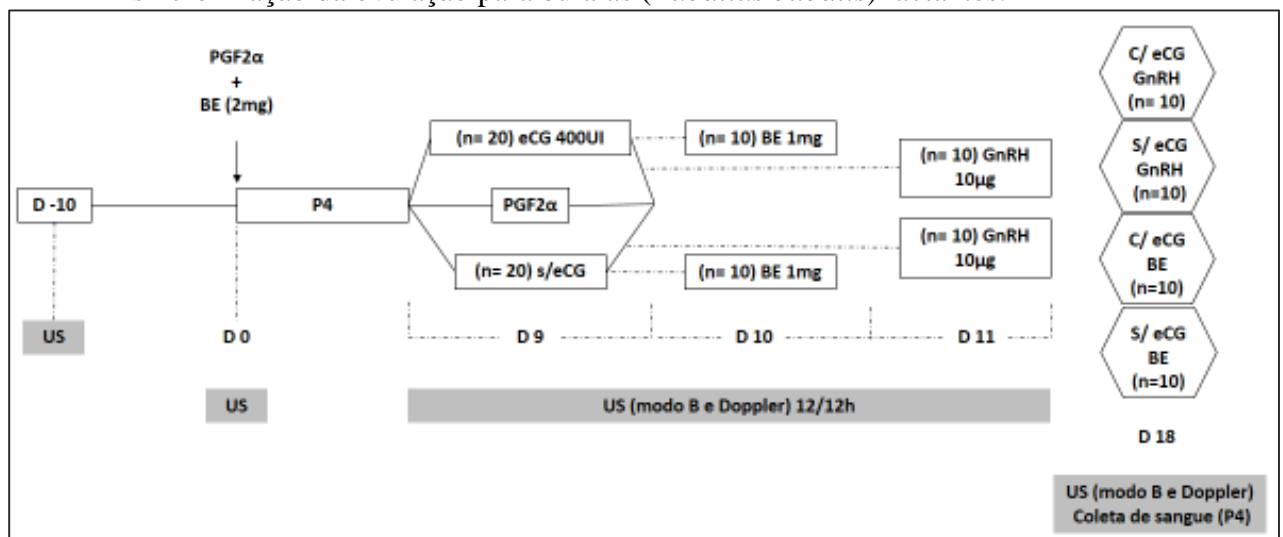
O experimento foi realizado na Fazenda Experimental de Entre Rios-BA localizada a uma latitude 11°56'31" Sul, longitude 38°05'04" Oeste, estando a uma altitude de 162 metros, entre os meses de Outubro e Novembro. A propriedade faz parte da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia (EMEVZ/UFBA). Foram utilizadas 40 búfalas multíparas e lactantes da raça Mediterrâneo, as quais foram mantidas em piquetes com pastagem predominante de capim Pangola (*Digitaria decumbens*) com sal mineral e água *ad libitum*. Os animais foram selecionados, após exame ginecológico por ultrassonografia transretal, utilizando-se um transdutor linear com frequência de 7,5 MHz (Mindray, Z5 VET, Shenzhen, China), a fim de se avaliar a presença de anormalidades reprodutivas que inviabilizassem sua utilização no experimento. Além disso, as búfalas foram avaliadas quanto ao escore de condição corporal, escala de um a cinco, sendo considerados aptos a participarem do experimento aqueles que se apresentaram, no momento da avaliação escore de condição corporal (ECC) na categoria três (ALAPATI et al., 2010) e ausência de anormalidades reprodutivas. Todos os animais obedeceram ao protocolo de vacinas obrigatórias, estabelecidas pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, e contavam com calendário de vermifugação atualizado.

4.2 PROTOCOLO DE SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO

Os animais foram submetidos ao seguinte protocolo de sincronização (Figura 1): em um dia aleatório do ciclo estral (D0) todos os animais receberam um dispositivo intravaginal de progesterona 1,0g (P4, DIB®, ZOETIS, São Paulo, Brasil) associado a 2mg de BE por via intramuscular (im) (BE, Gonadiol®, São Paulo, Brasil) e 0,5mg de cloprostenol sódico (im)

(Sincrosin®, Vallée S/A Produtos Veterinários, Montes Claros/MG, Brasil). No D9, ocorreu a retirada do implante intravaginal de P4 e foi administrado 0,5mg de cloprostenol sódico (im) em todos os animais (n=40). De forma aleatória, no D9, foi administrado em 20 animais 400UI (im) de eCG (NOVORMON®, MSD Saúde animal, São Paulo, Brasil), permanecendo 20 fêmeas sem a administração de eCG. Do grupo com eCG, 10 animais receberam 1,0mg (im) de BE no D10 (24h após a remoção dos implantes) e outros 10 receberam 10µg de um análogo do GnRH (im) (acetato de buserelina, Sincroforte®, Ourofino Agronegócio, São Paulo, Brasil) no D11 (48h após remoção dos implantes). Da mesma forma, os 20 animais não tratados com eCG receberam 1,0mg im de BE no D10 e 10µg de um análogo do GnRH im no D11. Assim, foram constituídos quatro grupos experimentais: C/eCG+GnRH (n=10), S/eCG+GnRH (n=10), C/eCG+BE (n=10) e S/eCG+BE (n=10).

Figura 1 - Diagrama de atividades para estudo da dinâmica folicular e luteal do protocolo de sincronização da ovulação para búfalas (*Buballus bubalis*) lactantes.



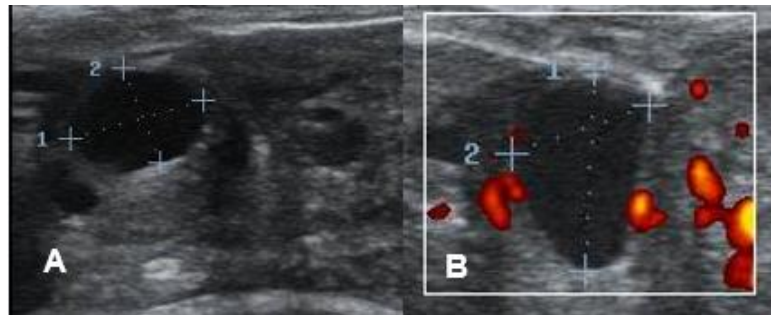
Fonte: Arquivo pessoal

4.3 AVALIAÇÕES ULTRASSONOGRÁFICAS

Foi utilizado o aparelho de ultrassom portátil (Mindray, Z5 VET, Shenzhen, China) equipado com transdutor linear com frequência de 7,5MHz para realização dos exames ultrassonográficos durante avaliação ovariana nos dias D -10, D0, e para registro dos folículos de maior diâmetro no D9 (retirada do dispositivo intravaginal de P4), no D10 (indução com BE) e no D11 (indução com GnRH). Inicialmente os ovários foram localizados por palpação transretal seguindo a ordem de avaliação, primeiro ovário direito e depois o ovário esquerdo,

sendo visibilizados de forma lenta e continua para o registro de imagens, Figura 2, por ultrassonografia em modo B e modo *Power-Doppler*. A partir do momento D9 foram realizadas as ultrassonografias das estruturas foliculares dos quatro tratamentos, com repetições do exame a cada 12h.

Figura 2 - Avaliações ultrassonográficas em modo B (A) e *Power-Doppler* (B) para obtenção das medidas do diâmetro folicular e vascularização da parede do folículo.



Fonte: Arquivo pessoal

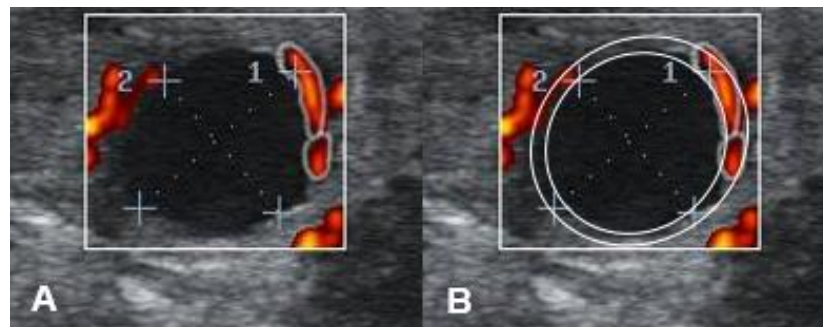
4.3.1 Dinâmica Folicular

Os ovários foram localizados e avaliados por ultrassonografia em modo B e a imagem dos dois maiores folículos foi congelada para determinação do maior folículo no dia nove (DFold9), no dia dez (DFold10) e no dia onze (DFold11) do protocolo de sincronização, através da função *Caliper* do próprio aparelho. Para verificar o diâmetro do folículo pré-ovulatório (DFOV) foi congelada a imagem do maior folículo previamente ao seu desaparecimento em decorrência da ovulação. A taxa de crescimento do folículo ovulatório (TXFol) foi obtida pela diferença entre o DFOV e o DFold9 dividido pelo período de crescimento em dias e expresso na unidade de centímetros por dia (cm/dia). Já o momento de ovulação (MOV) compreendeu o intervalo entre a retirada do implante intravaginal de P4 e a ovulação.

Ainda, foi empregada a ultrassonografia modo B para mensuração da área total da parede do folículo de maior diâmetro no dia nove (AFold9), no dia dez (AFold10) e no dia onze (AFold11) do protocolo de sincronização, assim como no momento em que identificado o folículo pré-ovulatório foi calculado a área total da parede do folículo pré-ovulatório (AFOV). A ovulação foi definida pelo desaparecimento do folículo pré-ovulatório presente no exame anterior com consequente formação do CL. As imagens dos folículos foram armazenadas também com recurso *Power-Doppler* ativado para quantificar a área de vascularização da parede do folículo pré-ovulatório (VFOV).

Os dados obtidos pela ultrassonografia modo B e *Power-Doppler* foram submetidos a avaliação objetiva segundo Ghetti (2012). Para tanto, foi calculado a área total da parede do folículo em cada animal, utilizando uma função do próprio aparelho. Posteriormente, foi realizado o cálculo da área de vascularização utilizando o cursor para se determinar a área de vascularização na parede do folículo (Figura 3). O percentual de vascularização na área da parede do folículo pré-ovulatório (% VFOV) foi obtido pela razão entre a área de vascularização e área total da parede folicular.

Figura 3 - Avaliações ultrassonográficas em modo B e *Power-Doppler*. (A) Cálculo da área de vascularização da parede folicular utilizando-se o cursor e função do próprio aparelho. (B) e cálculo da área total da parede folicular utilizando-se a função elipse do próprio aparelho.



Fonte: Arquivo pessoal

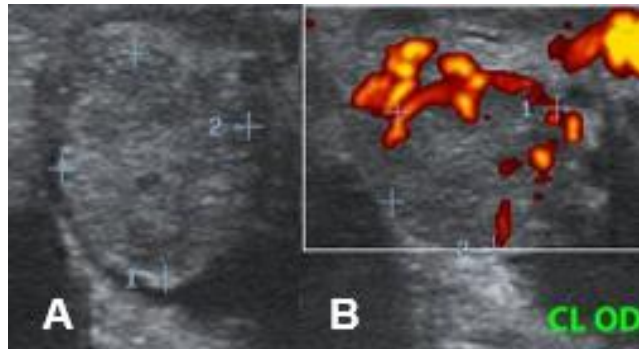
4.3.2 Função Luteal (morfologia e dosagens de P4)

A morfologia do CL foi avaliada pela ultrassonografia ovariana em modo B e modo *Power-Doppler*. A estrutura luteal foi escaneada de forma lenta e continua nos momentos D18 do protocolo de IATF, que correspondia ao 7º dia após ovulação.

As imagens luteais em ultrassonografia modo B foram congeladas para determinação das medidas de diâmetro do CL (DCL) e da área total do CL (ACL) (Figura 4). Nos CLs cavitários, a área da cavidade foi calculada e subtraída da área total do CL.

Ainda sob essas imagens realizou-se a avaliação objetiva em modo *Power-Doppler* do CL, de acordo com Arêas (2012), na quais foi calculada a área total do CL (ACL) em cada animal, empregando uma função do próprio aparelho. No cálculo da área de vascularização do CL (VCL) utilizou-se o cursor para verificar a vascularização indicada, posteriormente foi feita a subtração desse valor pela ACL. A determinação do percentual de vascularização na área do CL (% VCL) aconteceu por meio da razão entre a área de vascularização e área total do CL.

Figura 4 - (A) Avaliação ultrassonográfica em modo B para determinação do CL (cm), utilizando-se a função *Caliper*. (B) Avaliação *Power-Doppler* para cálculo da área total e cálculo da área de vascularização do CL, utilizando-se funções do próprio aparelho.



Fonte: Arquivo pessoal

As amostras para avaliação da função luteal foram obtidas por venopunção caudal lateral, realizadas no momento D18, do protocolo de IATF. Tubos de vácuo de 10mL sem anticoagulante (VACUTAINER®, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, EUA) foram utilizados nas coletas e acondicionados em caixa térmica com gelo reciclável, mantidos em temperatura média de 4°C. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 3.000G por 10 minutos para separação do soro, transferidas para microtubos de polietileno, alíquotadas e armazenadas a - 20°C até o momento da realização dos ensaios hormonais.

As análises da concentração de P4 foram realizadas pela metodologia de quimioluminescência, utilizando o imunoensaio *Access Immunoassay Systems Progesterone* (Beckman Coulter®, Fullerton, CA, USA), no Laboratório de Imunologia do Instituto de Ciências da Saúde (ICS) da UFBA. O coeficiente de variação intra-ensaio e inter-ensaio foi de 6,25% e 8,95%, respectivamente e a sensibilidade do ensaio foi de 0,016ng/mL.

4.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise da dinâmica folicular foram avaliados os seguintes parâmetros: DFold9 (cm) – diâmetro do folículo dominante no dia 9, DFold10 (cm) – diâmetro do folículo dominante no dia 10, DFold11 (cm) – diâmetro do folículo dominante no dia 11, DFOV (cm) - diâmetro do folículo pré-ovulatório, TXFol (cm/dia) - taxa de crescimento do folículo ovulatório, AFold9 (cm²) - área total da parede do folículo dominante no dia 9, AFold10 (cm²) - área total da parede do folículo dominante no dia 10, AFold11 (cm²) - área total da parede do folículo dominante no dia 11, AFOV (cm²) - área total da parede do folículo pré-ovulatório, VFOV (cm²) - área de vascularização da parede do folículo pré-ovulatório, %VFOV -

percentual de vascularização na área da parede do folículo pré-ovulatório e Momento da ovulação (MOV) (horas) - tempo entre a remoção do dispositivo de progesterona e a ovulação.

No que se refere a avaliação funcional e estrutural dos corpos lúteos (CL) considerou-se as seguintes variáveis: DCLD18 (cm) - diâmetro do CL no dia 18 do protocolo, ACLD18 (cm²) - área do CL no dia 18 do protocolo, VCLD18 (cm²) - área de vascularização do CL no dia 18 do protocolo, % VCLD18 - percentual de vascularização do CL no dia 18 do protocolo e P4D18 (ng/mL) - dosagem sérica de progesterona no dia 18 do protocolo.

O plano experimental adotado foi Delineamento Inteiramente Casualizado e os dados foram analisados utilizando-se o *Statistical Package for Social Science* (SPSS) versão 13.0 (SPSS, 2004), seguindo-se a seguinte sequência: 1) As médias e desvios padrão foram obtidos pela análise descritiva; 2) As comparações das médias das variáveis estudadas entre os grupos experimentais foram realizadas, primeiramente, pela distribuição da normalidade pelo teste de *Shapiro-Wilk*. Apenas a variável MOV não apresentou distribuição normal, neste caso foi aplicado o teste de *Kruskal-Wallis*. Para demais variáveis realizou-se a análise de variância (ANOVA) e, para comparação entre os grupos experimentais o teste de *Tukey*; 4) Para a comparação do DFol e AFol entre os tratamentos ao longo da dinâmica folicular foi utilizado o ANOVA de medidas repetidas. Para todas as análises executadas o nível de significância adotado foi de 5%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se que três animais, perderam os dispositivos intravaginais de P4, no momento da sua retirada, estando excluídos das avaliações. Também foi verificado que dez animais não responderam aos protocolos de IATF e não ovularam, desta forma, esses foram excluídos das avaliações referentes às seguintes características: DFOV, AFOV, VFOV, %VFOV e MOV, ficando assim definidos os grupos experimentais: S/eCG+GnRH (n= 6), C/eCG+GnRH (n= 7), S/eCG+BE (n= 7) e C/eCG+BE (n= 7). A taxa de ovulação geral do experimento foi 73%.

Não foi verificada diferença significativa entre os tratamentos de IATF C/eCG ou S/eCG, associados ao GnRH ou BE como indutores da ovulação, para nenhuma das características foliculares avaliadas durante os momentos da dinâmica (Tabela 1). Avaliando-se a variável diâmetro folicular ao longo do tempo entre os tratamentos, a mesma apresentou um comportamento semelhante não sendo observada diferença estatística entre grupos conforme ilustra a Figura 5. Da mesma forma, a variável área da parede folicular também não apresentou diferença estatística apresentando variação semelhante (Figura 6), indicando que os protocolos utilizados estimularam de forma equitativa o crescimento folicular.

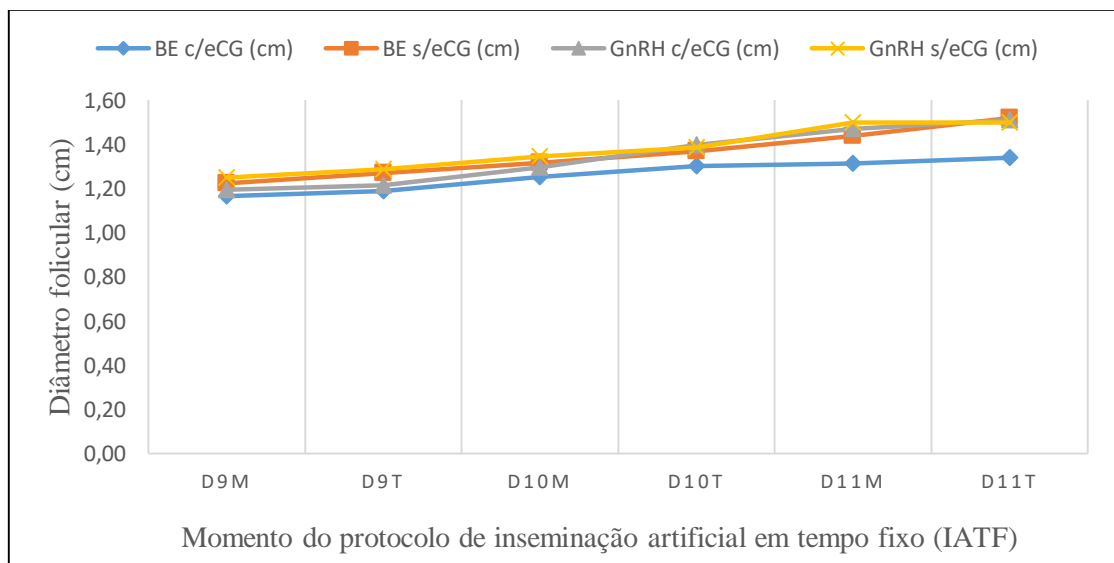
Tabela 1 - Efeitos dos protocolos propostos para sincronização (S/eCG+GnRH, C/eCG+GnRH, S/eCG+BE e C/eCG+BE) sobre as características foliculares avaliadas por ultrassonografia em modo B e *Power Doppler*.

Variáveis	Tratamentos				P valor	Totais Média ± S (n= 27)
	S/eCG + GnRH (média ± S) (n= 6)	C/eCG + GnRH (média ± S) (n= 7)	S/eCG + BE (média ± S) (n= 7)	C/eCG + BE (média ± S) (n= 7)		
DFol D9 (cm)	1,23 ± 0,22	1,13 ± 0,22	1,15 ± 0,19	1,18 ± 0,23	0,387	1,19 ± 0,21
DFol D10 (cm)	1,36 ± 0,20	1,26 ± 0,28	1,25 ± 0,23	1,20 ± 0,21	0,811	1,29 ± 0,23
DFol D11 (cm)	1,53 ± 0,07	1,49 ± 0,14	1,39 ± 0,26	1,33 ± 0,18	0,495	1,46 ± 0,19
DFOV (cm)	1,57 ± 0,06	1,54 ± 0,13	1,49 ± 0,15	1,38 ± 0,17	0,100	1,51 ± 0,15
AFol D9 (cm ²)	0,52 ± 0,09	0,52 ± 0,09	0,51 ± 0,07	0,51 ± 0,13	1,000	0,53 ± 0,09
AFol D10 (cm ²)	0,63 ± 0,08	0,65 ± 0,06	0,68 ± 0,09	0,64 ± 0,13	0,807	0,66 ± 0,09
AFol D11 (cm ²)	0,69 ± 0,07	0,69 ± 0,04	0,76 ± 0,11	0,66 ± 0,14	0,501	0,71 ± 0,09
AFOV (cm ²)	0,72 ± 0,06	0,70 ± 0,05	0,75 ± 0,11	0,70 ± 0,11	0,671	0,73 ± 0,09
TXFol (cm/dia)	0,10 ± 0,03	0,11 ± 0,04	0,09 ± 0,02	0,07 ± 0,04	0,300	0,09 ± 0,03
MOV (horas)	76,00 ± 6,20	75,43 ± 5,86	66,86 ± 9,44	66,86 ± 13,61	0,142	70,76 ± 9,94
VFOV (cm ²)	0,20 ± 0,08	0,23 ± 0,08	0,24 ± 0,10	0,20 ± 0,05	0,757	0,22 ± 0,07
%VFOV (%)	28,57 ± 10,82	32,68 ± 10,37	30,93 ± 9,41	29,55 ± 9,12	0,922	31,18 ± 8,83

DFolD9 - diâmetro do folículo dominante no dia 9, DFolD10 - diâmetro do folículo dominante no dia 10, DFolD11 - diâmetro do folículo dominante no dia 11, AFolD9 - área total da parede do folículo dominante no dia 9, AFolD10 - área total da parede do folículo dominante no dia 10, AFolD11 - área total da parede do folículo dominante no dia 11 e TXFol - taxa de crescimento do folículo ovulatório. DFOV - diâmetro do folículo pré-ovulatório, AFOV - área total da parede do folículo pré-ovulatório, VFOV - área de vascularização da parede do folículo pré-ovulatório, %VFOV - percentual de vascularização na área da parede do folículo pré-ovulatório, MOV - tempo entre a remoção do dispositivo de progesterona e a ovulação.

Segundo Gimenes e colaboradores (2011), a aquisição da capacidade ovulatória do folículo dominante de novilhas Murrah ocorreu ao atingir 0,85cm de diâmetro. No presente estudo, os diâmetros dos folículos dominantes no D9 foram de $1,23 \pm 0,22$, $1,13 \pm 0,22$, $1,15 \pm 0,19$, $1,18 \pm 0,23$ (cm) entre os grupos S/eCG+GnRH, C/eCG+GnRH, S/eCG+BE e C/eCG+BE, respectivamente. Outro fator analisado é que a taxa de crescimento do folículo ovulatório (cm/dia), também foi semelhante entre os grupos ($P= 0,300$), o que indica que nos tratamentos utilizados para sincronização os folículos desenvolveram capacidade ovulatória e taxa de crescimento satisfatória. Em estudo de Carvalho e colaboradores (2013), também foram obtidas taxas de crescimento foliculares semelhantes entre grupos tratados C/eCG e S/eCG de 0,13 e 0,15 (cm/dia), respectivamente.

Figura 5 - Média do diâmetro folicular a partir do dia nove (D9) do programa de IATF até a ovulação nos quatro distintos protocolos de sincronização (S/eCG+GnRH, C/eCG+GnRH, S/eCG+BE e C/eCG+BE).



M= Manhã; T= Tarde

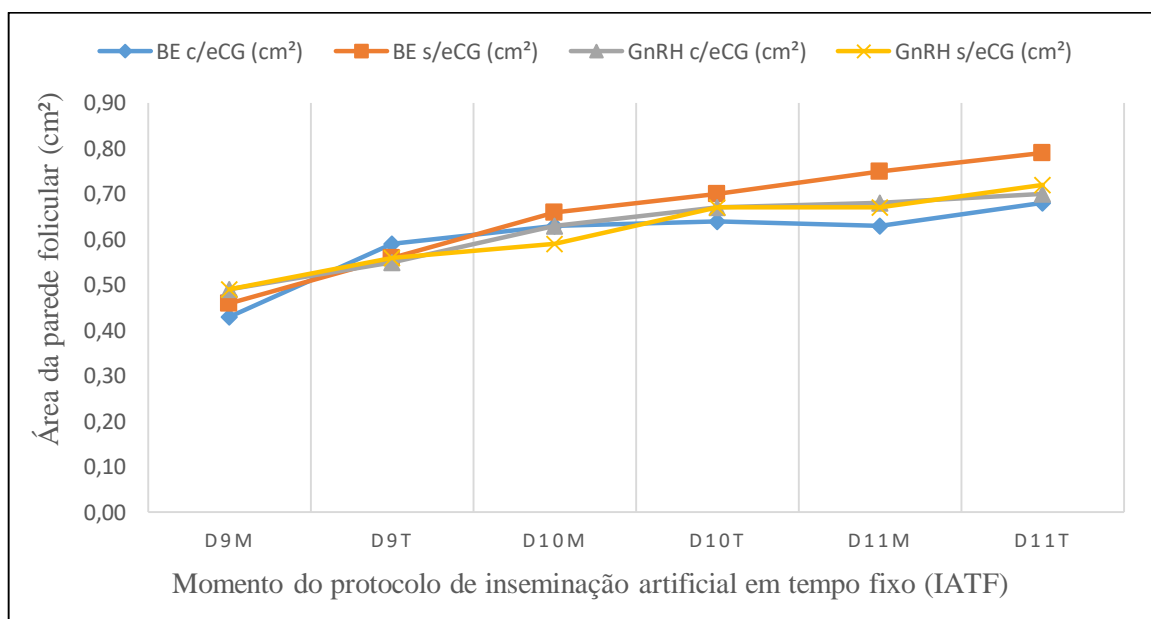
Baruselli e colaboradores (1997), ao analisar a dinâmica folicular de búfalas em ciclos estrais regulares, relataram que os folículos dominantes atingiram um diâmetro médio de 1,30 a 1,50 (cm). No estudo aqui proposto não houve diferença estatística entre os diâmetros dos folículos ovulatórios ($P= 0,100$), tendo os valores ($1,57 \pm 0,06$, $1,54 \pm 0,13$, $1,49 \pm 0,15$, $1,38 \pm 0,17$ cm) entre os grupos experimentais semelhantes aos da pesquisa acima. Da mesma forma, há semelhança entre os valores apontados por Mirmahmoudi e colaboradores (2014) que obtiveram diâmetros de 1,30 a 1,60 (cm), porém utilizando protocolo Estradoublesynch.

Da mesma forma, Carvalho e colaboradores (2017) utilizando protocolos em búfalas com a mesma base hormonal deste experimento (P4/BE+eCG) relataram diâmetros dos

folículos ovulatórios semelhantes aos do presente estudo, 1,31, 1,37, 1,37 cm (grupos com diferentes indutores da ovulação BE24, BE36, GnRH48, respectivamente), obtendo taxas de prenhez satisfatórias. Vale ressaltar que estes autores realizaram o experimento na época não favorável a reprodução, mostrando a importância do suporte gonadotrófico da eCG para esta ocasião. Entretanto, Monteiro e colaboradores (2018), ao aplicar a mesma base hormonal (P4/BE+eCG) nos protocolos de IATF durante ambas as estações reprodutivas, favorável e desfavorável, concluíram que o eCG é uma alternativa viável para as duas situações.

Entretanto Carvalho e colaboradores (2013), relataram que o uso da eCG elevou os diâmetros máximos do folículos pré-ovulatórios ao final dos protocolos de sincronização, porém foram utilizadas búfalas em anestro sazonal, diferentemente desta pesquisa. Estes autores ressaltaram que fêmeas em anestro tem liberação pulsátil de LH insuficiente para as fases finais de desenvolvimento folicular e ovulação, favorecendo o uso da eCG nos protocolos de IATF nessas condições.

Figura 6 - Média da área da parede folicular a partir do dia nove (D9) do programa de IATF até a ovulação nos quatro distintos protocolos de sincronização (S/eCG+GnRH, C/eCG+GnRH, S/eCG+BE e C/eCG+BE).



M= Manhã; T= Tarde

Neste estudo, apesar da variação nos diferentes protocolos entre os momentos da ovulação ($76,00 \pm 6,20$ e $75,43 \pm 5,86$ horas, S/eCG+GnRH e C/eCG+GnRH, respectivamente) ($66,86 \pm 9,44$ e $66,86 \pm 13,61$ horas, S/eCG+BE e C/eCG+BE, respectivamente) não foi verificado diferença estatística entre os grupos experimentais ($P= 0,142$). Também ficou evidente que nos grupos apenas com BE e somente GnRH, associados ou não ao eCG, os valores do MOV foram semelhantes.

Carvalho e colaboradores (2013) relataram um MOV de 69,8 e 70,0 horas, ao utilizarem GnRH+eCG e GnRH, respectivamente, semelhante aos relatados neste estudo, 76,00 e 75,43 horas, para os grupos S/eCG+GnRH e C/eCG+GnRH, respectivamente, obtendo elevadas taxas de ovulação. Enquanto que Carvalho e colaboradores (2017) obtiveram momentos de 70,0, 78,4 e 73,6 horas ao trabalharem com três grupos experimentais e os mesmos indutores desta pesquisa BE24, BE36 e GnRH48, respectivamente.

Os autores acima, ressaltaram que tanto BE, quanto GnRH, produziram resultados muito próximos no que se refere ao crescimento folicular, sincronização e indução da ovulação, o que corrobora com o presente estudo. No mesmo sentido, Carvalho e colaboradores (2012) avaliaram a possibilidade de substituir o GnRH, como indutor da ovulação, por BE nos protocolos de IATF em bubalinos, obtendo-se resultados que indicaram uma satisfatória resposta folicular, taxa de ovulação e taxa de prenhez.

Outros fatores também indicaram que o BE é uma opção favorável para substituir o GnRH como indutor da ovulação. Foram relatadas vantagens no uso BE, como melhoria na expressão do estro (YOUSUF et al., 2015), maior pico de LH (JACOMINI et al., 2014), melhor tônus uterino e melhor custo/benefício (MIRMAHMOUDI et al., 2014).

No estudo da dinâmica folicular apresentado, foram avaliados os parâmetros da área da parede folicular dos folículos pré-ovulatórios com o recurso *Power-Doppler*. Não foi verificada diferença estatística entre as variáveis VFOV e %VFOV (Tabela 1) entre os protocolos de IATF, indicando não haver interferência dos tratamentos sobre a vascularização da parede dessas estruturas.

Utilizando a função *color-Doppler*, calculando-se os índices de resistência e pulsatilidade, Neglia e colaboradores. (2012) avaliaram o fluxo sanguíneo do folículo pré-ovulatório de búfalas gestantes e não gestantes submetidas a IATF, concluindo que o tratamento proposto não influenciou no fluxo sanguíneo do folículo pré-ovulatório.

Verifica-se uma escassez de estudos avaliando por meio da ultrassonografia modo *Doppler* o desenvolvimento folicular em búfalas, que segundo Acosta e colaboradores (2003) foi relacionado a formação de vasos sanguíneos na camada folicular de células da teca para atender as crescentes demandas metabólicas do folículo em crescimento. Assim, a análise da área de vascularização tem potencial para fornecer maiores informações sobre a viabilidade folicular e maturidade oocitária, como descrito em fêmeas bovinas (SIDDIQUI et al., 2009; GINTHER et al, 2014).

Desta forma, pode-se confirmar que as tentativas de ajustes no proestro por meio da inclusão da eCG foram ineficientes em incrementar os parâmetros morfológicos do folículo dominante e pré-ovulatório nos tratamentos hormonais propostos.

Na Tabela 2 encontram-se descritas as características luteínicas avaliadas por ultrassonografia em modo B e modo *Power-Doppler*, no D18 dos protocolos de IATF utilizados. Não foi observada a influência dos tratamentos hormonais utilizados sobre as variáveis da área do CL (ACL) e vascularização do CL (VCL e %VCL). Observou-se uma diferença estatística significativa ($P=0,047$) entre os grupos S/eCG+BE e C/eCG+BE quanto ao diâmetro do CL (DCL) de $1,62 \pm 0,11$ e $1,78 \pm 0,12$ cm, respectivamente. Porém, esta diferença não se correlacionou com as concentrações séricas de P4 em ambos os grupos ($3,26 \pm 0,57$ e $3,87 \pm 0,56$ ng/mL).

Os diâmetros do CL relatados neste estudo ($1,75 \pm 0,10$, $1,71 \pm 0,09$, $1,62 \pm 0,11$, $1,78 \pm 0,12$ cm) encontram-se de acordo com os relatados por outros autores tanto em protocolos à base de P4/BE+eCG, 1,84 e 1,90 cm (MONETEIRO et al., 2018), quanto em protocolos Ovsynch em bubalinos, 1,70 cm (VECCHIO et al., 2012), 1,86 cm (DI FRANCESCO et al., 2012) e 1,64 cm (RUSSO et al., 2010). O mesmo acontece aos dados da área do CL ($2,31 \pm 0,27$, $2,23 \pm 0,33$, $2,04 \pm 0,19$, $2,42 \pm 0,29$ cm²) em relação a outros autores, 2,40 cm² (VECCHIO et al., 2012), 2,72 cm² (DI FRANCESCO et al., 2012) e 2,84 cm² (NEGLIA et al., 2012).

Tabela 2 - Efeitos dos protocolos propostos para sincronização (S/eCG+GnRH, C/eCG+GnRH, S/eCG+BE e C/eCG+BE) sobre as características luteais avaliadas por ultrassonografia em modo B e *Power-Doppler* e dosagens de progesterona (P4) no dia 18 do protocolo de IATF.

Variáveis	Tratamentos				P valor	Totais Média ± S (n=27)
	S/eCG + GnRH (média ± S) (n= 6)	C/eCG + GnRH (média ± S) (n= 7)	S/eCG + BE (média ± S) (n=7)	C/eCG + BE (média ± S) (n= 7)		
DCL D18 (cm)	$1,75 \pm 0,10^{ab}$	$1,71 \pm 0,09^{ab}$	$1,62 \pm 0,11^a$	$1,78 \pm 0,12^b$	0,047	$1,72 \pm 0,12$
ACL D18 (cm ²)	$2,31 \pm 0,27$	$2,23 \pm 0,33$	$2,04 \pm 0,19$	$2,42 \pm 0,29$	0,096	$2,27 \pm 0,30$
VCL D18 (cm ²)	$0,97 \pm 0,19$	$0,77 \pm 0,32$	$0,91 \pm 0,30$	$0,84 \pm 0,23$	0,570	$0,87 \pm 0,26$
%VCL D18 (%)	$42,58 \pm 9,90$	$33,97 \pm 11,33$	$44,02 \pm 11,26$	$34,68 \pm 7,70$	0,333	$38,65 \pm 10,46$
P4 D18 (ng/mL)	$2,80 \pm 0,70^a$	$4,09 \pm 0,94^b$	$3,26 \pm 0,57^{ab}$	$3,87 \pm 0,56^{ab}$	0,017	$3,53 \pm 0,84$

DCLD18 - diâmetro do CL no dia 18 do protocolo, ACLD18 - área do CL no dia 18 do protocolo, VCLD18 - área de vascularização do CL no dia 18 do protocolo, %VCLD18 - percentual de vascularização do CL no dia 18 do protocolo, P4D18 - dosagem sérica de progesterona no dia 18 do protocolo. Letras distintas na mesma linha indicam diferença estatística significativa ($p<0,05$).

Foi verificada uma diferença estatística significativa ($P=0,017$) para a concentração de P4 entre os grupos S/eCG+GnRH e C/eCG+GnRH, com médias de $2,80 \pm 0,70$ e $4,09 \pm 0,94$ ng/mL, respectivamente. O que corrobora com algumas vantagens descritas na utilização da eCG como suporte gonadotrófico, relatando-se sua ação de contribuir para aumento nas concentrações P4 e taxa de crescimento do CL, em protocolos de à base de P4+eCG em búfalas (MARUGAVEL et al., 2009; CARVALHO et al., 2012). Carvalho e colaboradores (2013), concluíram que a administração da eCG após a retirada do implante de P4 em búfalas lactantes, na estação não reprodutiva, incrementou a taxa de crescimento do CL, a concentração inicial de P4 e a taxa de gestação após IATF. Estes achados condizem com a presente pesquisa quanto ao DCL dos grupos S/eCG+BE e C/eCG+BE, e a P4 dos grupos S/eCG+GnRH e C/eCG+GnRH, que apresentaram diferença estatística, como descrito anteriormente. Porém, o efeito do fotoperíodo não se aplica nas condições deste experimento, verificando-se que nos trópicos o ciclo estral tem modulações anuais influenciadas pela pluviosidade, disponibilidade e a qualidade da forragem (PERERA, 2011), temperatura ambiental, interação social, data do parto e lactação (ROSA e BRYANT, 2003). Isto sugere que houve uma influência parcial da eCG sobre as características luteínicas nos grupos experimentais utilizados.

Assim sendo, Marugavel e colaboradores (2009) concluíram que a utilização da eCG em protocolos à base de P4, em búfalas lactantes e acíclicas incrementaram as taxas de ovulação e de prenhez em condições tropicais. Adicionalmente ao que foi observado por outros autores, que indicaram o eCG nos tratamentos hormonais pós retirada dos implantes de P4 com influência positiva nas taxas de crescimento do CL, concentrações de P4 durante o diestro inicial após sincronização da ovulação e taxas de gestação após IATF de búfalas em anestro (novilhas e vacas) (BARUSELLI et al., 2013; CARVALHO et al., 2016, MONTEIRO et al., 2018).

Entretanto, esta condição de aplicação da eCG em animais acíclicos, com escore de condição corporal baixo e criados a pasto (BÓ et al., 2013; RENSIS e LÓPEZ-GATIUS, 2014), pode justificar a parcial ação da eCG no presente estudo. Haja vista, que os animais utilizados encontravam-se em condição cíclica confirmada pela presença do CL e adequado escore de condição corporal (média, ECC = 3,0), pressupondo suficiente suporte gonadotrófico para o desenvolvimento da dinâmica folicular e luteal.

No estudo apresentado não ocorreu a influência dos protocolos de IATF utilizados sobre as características vasculares dos CL avaliados pela ultrassonografia em modo *Power-Doppler*. Não foram encontrados até o momento estudos que utilizaram a mesma base protocolar dos

tratamentos aqui propostos, com avaliação morfofuncional por ultrassonografia *Power-Doppler* do CL em bubalinos pela avaliação objetiva segundo Ghetti (2012).

Neglia e colaboradores. (2012) avaliaram o fluxo sanguíneo da parede do CL de búfalas submetidas a IA calculando-se os índices de resistência e pulsatilidade e tratadas com um análogo da $PGF2\alpha$, utilizando protocolo Ovsynch. Estes autores concluíram que o tratamento proposto não influenciou no fluxo sanguíneo dessas estruturas. Estudos com búfalas, Papa e colaboradores (2007) relataram fortes correlações positivas entre a expressão do fator de crescimento endotelial vascular e a densidade vascular, com concentrações plasmáticas de progesterona. Sugerindo a ideia de que a angiogênese e a função do CL também estão intimamente relacionadas nesta espécie. Bem como, Russo e colaboradores (2009) que destacaram um fluxo sanguíneo satisfatório para o CL no 10º dia após a IA, seria ideal para a função do CL e chances de prenhez em búfalas.

Da mesma forma, ao avaliarem o desenvolvimento da função do CL, durante a duas primeiras semanas após a IA e a evolução da gestação, Vecchio e colaboradores (2012), também com o uso do *color-Doppler*, sugeriram um modelo para futuros estudos básicos sobre a endocrinologia da gestação precoce em búfalas e que haveria potencial para que a funcionalidade do CL, avaliada com este equipamento, fosse desenvolvida como um preditor da prenhez. Afirmando a necessidade de mais estudos com o recurso *Doppler* na avaliação do fluxo sanguíneo de bubalinos submetidos à protocolos de IATF.

De forma complementar ao que foi exposto, a avaliação luteal realizada durante o experimento proporciona a confirmação de que os protocolos testados foram capazes de promover a formação de corpos lúteos com adequados parâmetros estruturais e funcionais.

Na Tabela 3 encontra-se demonstrado o valor (R\$) de cada protocolo por animal e os percentuais (%) de cada fármaco na composição dos custos dos diferentes protocolos de IATF utilizados para o experimento. Nos tratamentos em que a eCG foi associada aos protocolos, houve um aumento expressivo nos custos do protocolo por animal, observado pelo percentual de participação deste hormônio nos seguintes grupos, C/eCG+GnRH com 38,42% e C/eCG+BE com 47,55%. Caso seja utilizado o BE como indutor da ovulação, nas condições deste experimento, poderíamos utilizar o protocolo S/eCG+BE onde não foram verificadas diferenças nas concentrações de P4 e apresentou melhor custo/benefício. Do contrário, utilizando-se o GnRH como indutor da ovulação, escolheríamos o protocolo C/eCG, que apresentou diferença significativa nas concentrações séricas de P4 entre os grupos que utilizaram GnRH.

Tabela 3 - Demonstrativo do impacto dos fármacos utilizados nos custos dos protocolos de IATF dos grupos experimentais, indicando o custo total do protocolo para um animal e os percentuais de cada hormônio no valor total por protocolo.

Variáveis/Hormônios	Protocolo			
	S/eCG+GnRH	C/eCG+GnRH	S/eCG+BE	C/eCG+BE
Valor/animal (R\$)	25,64	41,64	17,65	33,65
Perc. da eCG (%)	-	38,42	-	47,55
Perc do indutor (%)	GnRH 32,17	GnRH 19,81	BE 1,47	BE 0,77
Perc. do Implante de P4 (%)	37,71	23,22	54,79	28,74
Perc. da PGF2 α (%)	28,08	17,29	40,79	21,40

Perc.= Percentual.

Não foi incluído o valor do impacto (%) para a dosagem de 2mg de BE utilizado no D0 do protocolo de IATF.

Outro fator que se destaca na Tabela 4 é o custo que cada indutor da ovulação imprime por protocolo animal. De forma muito destacada, o uso do BE em detrimento ao GnRH é recomendado, sendo explicada pelo seu impacto financeiro de apenas 1,47% e 0,77% nos grupos S/eCG+BE e C/eCG+BE, frente a 32,17% e 19,81% nos grupos S/eCG+ GnRH e C/eCG+ GnRH; respectivamente.

Finalmente, Ao considerar as avaliações morfofuncionais dos componentes foliculares e luteais, e observar o custo/benefício pode-se indicar como melhor protocolo o S/eCG+BE, diante das condições deste experimento. Este protocolo proporcionou desenvolvimento folicular, sincronização e ovulação satisfatórias, além de fundamentar o desenvolvimento do CL e, conseqüentemente apresentar uma adequada concentração de P4.

6 CONCLUSÕES

Concluiu-se que:

Não ficou evidenciado que o suporte gonadotrófico com eCG influenciou nas características foliculares de búfalas lactantes submetidas a um protocolo de IATF.

Ao se trabalhar com GnRH como indutor da ovulação, recomenda-se a sua associação com o eCG, visto que a agregação deste fármaco impactou positivamente nas concentrações de P4.

Apesar da eCG ter aumentado o diâmetro do CL das fêmeas tratadas com BE, este incremento não correspondeu há um conseqüente aumento da P4.

A utilização da eCG associado ao BE ou ao GnRH não influenciou o momento da ovulação de búfalas mestiças, lactantes submetidas a diferentes protocolos de IATF.

Protocolos que utilizam BE ou GnRH associados ao eCG possibilitaram eficientes sincronização e indução da ovulação em búfalas lactantes submetidas a um protocolo de IATF. Devendo-se levar em consideração também o fator custo/benefício favorável ao uso do BE.

Nas condições em que foi executado o experimento, indica-se o uso do protocolo S/eCG+BE, principalmente, pelo quesito custo/benefício.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, T. J.; HAYASHI, K. G.; OHTANI, M.; MIYAMOTO, A. Local changes in blood flow within the preovulatory follicle wall and early corpus luteum in cows. **Reproduction**, v. 125, n. 5, p. 759-767, 2003.
- ALAPATI, A.; KAPA, S.R.; JEEPALYAM, S.; RANGAPPA, S.M.P.; YEMIREDDY, K.R. Development of the body condition score system in Murrah buffaloes: validation through ultrasonic assessment of body fat reserves. **Journal of Veterinary Science**, n.11, v.1, p. 1-8, 2010.
- ALI, A.; FAHMY, S. Ovarian dynamics and milk progesterone concentrations in cycling and non-cycling buffalo-cows (*Bubalus bubalis*) during ovsynch program. **Theriogenology**, v. 68, p. 23-28, 2007.
- ALILA HW, DOWD JP. The control of corpus luteum function in domestic ruminants. **Oxford Reviews of Reproductive Biology**, v. 13, p. 203-237, 1991.
- ARÊAS, V. S. **Uso de Doppler colorido na avaliação funcional do corpo lúteo em bovinos**. 2012. 78f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES, 09 de Julho de 2012.
- ATLI, M.O.; MEHMET KAYA, K.M.S.; AYDILEK, N.; GÜZELOĞLU, A.; WILTBANK, M.C. Toll-like receptor 2 and 4 expression in the bovine corpus luteum during the different stages of the estrous cycle. **Animal Reproduction**, v. 14, p. 1270-1277, 2017.
- BAITHALU, R.K.; SINGH, S.K.; GUPTA, C.; RAJA, A.K.; SAXEN, A.; KUMARA, Y.; SINGH, R.; AGARWAL, S.K. Cellular and functional characterization of buffalo (*Bubalus bubalis*) corpus luteum during the estrous cycle and pregnancy. **Animal Reproduction Science**, v. 140, p. 138-146, 2013.
- 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, p. 160-176, 2013. Special Issue 1.
- BARUSELLI, P.S. Control of follicular development applied to reproduction biotechnologies in buffalo. In: **Proceedings I Congresso Nazionale Sull'Allevamento del Bufalo**, Eboli (SA), Italy, p. 128-146, 2001.
- BARUSELLI, P.S. Manejo Reprodutivo de Bubalinos. **SAA/Coordenadoria da Pesquisa Agropecuária**: Instituto de Zootecnia/EEZ - Vale do Ribeira, São Paulo, 46 p., 1993.
- BARUSELLI, P.S.; CARVALHO, N.A.T.; GIMENES, L.U.; CREPALDI, G.A. Fixed- timed artificial insemination in buffalo. **Italian Journal of Animal Science**, v. 6, p. 107-118, 2007.
- BARUSELLI, P.S.; MADUREIRA, E.H.; BARNABE, V.H.; BARNABE, R.C.; BERBER, R.C.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. 431-42, 2003.

- BARUSELLI, P.S.; MADUREIRA, E.H.; VISINTIN, J.A.; BARNABE, R.C.; AMARAL, R. Timed insemination using synchronization of ovulation in buffalo. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 23, p. 360-362, 1999.
- 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, p. 1531-1547, 1997.
- BERNARDES, O. Bubalinocultura no Brasil: situação e importância econômica. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 31, n. 3, p. 293-298, jul./set. 2007.
- BOLLWEIN, H.; HEPPELMANN, M.; LÜTTGENAU, J. Ultrasonographic *Doppler* use for female reproduction management. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 32, p.149-164, 2016.
- BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S.; MAPLETOFT, R. J. Synchronization techniques to increase the utilization of artificial insemination in beef and dairy cattle. **Animal Reproduction**, v. 10, p. 137-142, 2013.
- BORGHESE, A. Buffalo Production and Research. In: **Reu Technical Series 67**, Chapter I, p. 1-40. Food and Agriculture Organization, Rome, Italy, 2005.
- BRIDGES, G.A.; MUSSARD, M.L.; PATE, J.L.; OTT, T.L.; HANSEN, T.R.; DAY, M.L. Impact of preovulatory estradiol concentrations on conceptus development and uterine gene expression. **Animal Reproduction Science**, v. 133, p.16-26, 2012.
- 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, p.1-11, 2010.
- CARVALHO, N.A.T.; NAGASAKU, E.M.; VANNUCCI, F.S.; TOLEDO, L.M.; BARUSELLI, P.S. Ovulation and conception rate 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.; BARUSELLI, P.S. Strategies to overcome seasonal anestrus in water buffalo. **Theriogenology**, v. 86, p.200-206, 2016.
- CARVALHO, N.A.T.; SOARES, J.G.; PORTO FILHO, R.M.; GIMENES, L.U.; SOUZA, D.C. NICHI, 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 p.423-428, 2013.
- CARVALHO, N.A.T.; SOARES, J.G.; SOUZA, D.C.; MAIO, J.R.G.; SALES, J.N.S.; MARTINS JÚNIOR, B.; MACARI, R.C.; D'OCCHIO, M.J.; BARUSELLI, P.S. Ovulation synchronization with estradiol benzoate or GnRH in a timed artificial insemination protocol in buffalo cows and heifers during the nonbreeding season. **Theriogenology**, v. 87, p.333-338, 2017.

CARVALHO, N.A.T.; SOARES, J.G.; SOUZA, D.C.; MAIO, J.R.G.; SALES, J.N.S.; MARTINS, B.J.; MACARI, R.C.; BARUSELLI, P.S. Ovulation synchronization with EB or GnRH in buffalo TAI during the non breeding season. In: **Proceedings of the XXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões**. Foz do Iguaçu, Paraná, Brazil, v. 9, p.523-523, 2012.

CARVALHO, N.A.T.; SOARES, J.G.; SOUZA, D.C.; VANNUCCI, F.S.; AMARAL, R.; MAIO, J.R.G.; SALES, J.N.S.; SÁ FILHO, M.F.; BARUSELLI, P.S. Different circulating progesterone concentrations during synchronization of ovulation protocol did not affect ovarian follicular and pregnancy responses in seasonal anestrous buffalo cows. **Theriogenology**, v. 81, p.490-495, 2014.

CHOHAN, K.R: Estrus synchronization with lower dose of PGF2 alpha and subsequent fertility in subestrous buffalo. **Theriogenology**, v. 50, p.1101-1108, 1998.

CHOUHAN, V.S.; DANGI, S.S.; BABITHA, V.; VERMA, M.R.; BAG, S.; SINGH, G.; SARKAR, M. Stimulatory effect of luteinizing hormone, insulin-like growth factor-1, and epidermal growth factor on vascular endothelial growth factor production in cultured bubalineluteal cells. **Theriogenology**, v. 84, p. 1185-1196, 2015.

CHOUHAN, V.S.; DANGI, S.S.; GUPTA, M.; BABITHA, V.; KHAN, F.A.; PANDA, R.P.; YADAV, V.P.; SINGH, G.; SARKAR, M. Stimulatory effect of vascular endothelial growth factor on progesterone production and survivability of cultured bubaline luteal cells. **Animal Reproduction Science**, v. 148, p.251-259, 2014.

DE ARAUJO BERBER, R.C.; 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.

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

DI FRANCESCO S. Effect of season on reproductive performances in buffalo species (*Bubalus bubalis*). Italy: Universita' Degli Studi Di Napoli Federico II; 2010.

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, p.1839-1845, 2012.

DOBSON, H.; KAMONPATANA, M. A review of female cattle reproduction with special reference to a comparison between buffaloes, cows and zebu. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 77, p.1-36, 1986.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QA>. Acessado em: 5 Nov 2018.

GHETTI, A. M. Caracterização por *Doppler* Colorido do Padrão Vascular em folículos dominantes pré e pós aspiração e efeito do benzoato de estradiol nos folículos residuais subsequentes. 2012. 79f. **Dissertação** (Mestrado) - Universidade Federal Fluminense, Niteroi-RJ, 24 de Abril de 2012.

GIMENES, L.U.; CARVALHO, N.A.T.; SÁ FILHO, M.F.; VANNUCCI, V.; TORRES-JÚNIOR, J.R.S.; AYRES H.; FERREIRA, V.; TRINCAE, L.A.; SARTORELLI, E.S.; BARROS, C.M.; BELTRANG, 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, p.175-179, 2011.

GIMENES, L.U.; FANTINATO NETO, P.; ARANGO, J.S.P.; AYRES, H.; BARUSELLI, P.S. Follicular dynamics of *Bos indicus*, *Bos taurus* and *Bubalus bubalis* heifers treated with norgestomet ear implant associated or not to injectable progesterone. **Animal Reproduction**, v. 6, n.1, p256, 2009.

GINTHER, O.J. Ultrasonic imaging and reproductive event in the mare. Cross Plains, **WI Equiservices, Inc.**, p.1-12, 1986.

GINTHER, O.J.; SILVA, L.A.; ARAUJO, R.R.; BEG, M.A. Temporal associations among pulses of 13, 14-dihydro-15-keto-PGF₂α, luteal blood flow, and luteolysis in cattle. **Biology of Reproduction**, v.76, p.506–13, 2007.

GINTHER, O. J. How ultrasound technologies have expanded and revolutionized research in reproduction in large animals. **Theriogenology**, v. 81, p. 112-125, 2014.

GUPTA, K. K.; SHUKLA, S. N.; INWATI, P.; SHRIVASTAVA, O. P. Fertility response in postpartum anoestrus buffaloes (*Bubalus bubalis*) using modified Ovsynch based timed insemination protocols. **Veterinary World**, v. 8, p.316-319, Março/2015.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Disponível em: https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2017_v45_br_informativo.pdf. Acessado em: 06 Fev 2019.

JACOMINI, J.O.; MACEDO, CARVALHO, N.A.T.; SALES, J.N.S.; BARUSELLI, P.S. LH surge in response to the treatment with GnRH analog or estradiol in ovariectomized buffaloes with or without progesterone pre-exposition. **Livestock Science**, v. 160, p.194-198, 2014.

KANAI, Y.; ABDUL-LATIEF, T.; ISHIKAWA, N.; SHIMIZU, H. Behavioural and hormonal aspects of the oestrous cycle in swamp buffaloes reared under temperate conditions. In: **Domestic Buffalo Production in Asia. International Atomic Energy Agency**, Vienna, Austria, p. 113-120, 1990.

MANIK, R.S.; PALTA, P.; SINGLA, S.K.; SHARMA, V. Folliculogenesis in buffalo (*Bubalus bubalis*): **Reproduction Fertility Development**, v. 14, p.315-325, 2002.

MARUGAVEL, 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, p.1120-1126, 2009.

MIRMAHMOUDI, R.; PRAKASH, B.S. Temporal changes in endogenous estrogens and expression of behaviors associated with estrus during the periovulatory period in doublesynch treated murrah buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Iranian Journal of Applied Animal Science**, v. 4, n. 3, p. 499-504, 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, p. 153-159, 2012.
- MIRMAHMOUDI, R.; SOURI, M.; PRAKASH, B.S. Endocrine changes, timing of ovulation, ovarian follicular growth and efficacy of a novel protocol (Estradoublesynch) for synchronization of ovulation and timed artificial insemination in Murrah buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, v. 81, p. 237-242, 2014.
- MOHAN, K; KUMAR, V.; SARKAR, M.; PRAKASH, B.S. Temporal changes in endogenous estrogens and expression of behaviors associated with estrus during the periovulatory period in Murrah buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Tropical Animal Health and Production**, v. 42, n.1, p.21-26, 2010.
- MOHAN, K.; SARKAR, M.; PRAKASH, B.S. Efficiency of Heatsynch Protocol in Estrous Synchronization, Ovulation and Conception of Dairy Buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Asian-Australian Journal of Animal Science**, v. 22, n.6, p.774-780, June/2009.
- MONTEIRO, B.M.; SOUZA, D.C.; VASCONCELLOS, G.S.F.M.; CARVALHO, N.A.T.; BARUSELLI, P.S. Effect of season on dairy buffalo reproductive performance when using P4/E2/eCG-based fixed-time artificial insemination management. **Theriogenology**, v. 119, p.275-281, 2018.
- MONTEIRO, B.M.; SOUZA, D.C.; VASCONCELLOS, G.S.F.M.; CORRÊA, T.B.; VECCHIO, D.; SÁ FILHO, M.F. Ovarian responses of dairy buffalo cows to timed artificial insemination protocol, using new or used Progesterone devices, during the breeding season (autumn-winter). **Animal Science Journal**, v. 87, p.13-20, 2016.
- NASEER, Z.; AHMAD, E.; SINGH, J.; AHMAD, N. Fertility following CIDR based synchronization regimens in anoestrous Nili-Ravi buffaloes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, p.814-817, 2011.
- NEGLIA, G.; GASPARRINI, B.; PALO, R.D.; ROSA, C.D.; 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.; GASPARRINI, B.; SALZANO, A.; VECCHIO, D.; DE-CARLO, E.; Cimmino, R. Relationship between the ovarian follicular response at the start of an Ovsync-TAI program and pregnancy outcome in Mediterranean River buffalo. **Theriogenology**, v. 86, p.2328-2333, 2016.
- NEGLIA, G.; NATALE, A.; ESPOSITO, G.; SALZILLO, F.; ADINOLFI, L.; ZICARELLI, L.; FRANCILO, M. Follicular dynamics in synchronized Italian Mediterranean buffalo cows. **Italian Journal of Animal Science**, v. 6, p.611-614, 2007. Supplement. 2
- NEGLIA, G.; VECCHIO, D.; RUSSO, M.; DI PALO, R.; PACELLI, C.; COMIN, A.; GASPARRINI, B.; CAMPANILE, G. Efficacy of PGF2a on Pre-ovulatory Follicle and Corpus Luteum Blood Flow. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, p.26-31, 2012.
- OHASHI, O.M. Estrous detection in buffalo cow. **Buffalo Journal**, v. 2, p.61-64, 1994.

- PAPA, P.C.; MOURA, C.E.B.; ARTONI, L.P.; FATIMA, L.A.; CAMPOS, D.B.; MARQUES, J.E.B.; BARUSELLI, P.S.; BINELLI, M.; PFARRER, C.; LEISER, R. VEGF system expression in different stages of estrous cycle in the corpus luteum of non-treated and superovulated water buffalo. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 33, p.379-389, 2007.
- PAUL, V.; PRAKASH, B.S. Efficacy of the ovsynch protocol for synchronization of ovulation and fixed-time artificial insemination in Murrah buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, v. 64, p.1049-1060, 2005.
- PERERA, B.M.A.O. Reproduction in Domestic Buffalo. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, n. 2, p. 200-206, 2008.
- PERERA, B.M.A.O. Reproduction in water buffalo: comparative aspects and implications for management. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 54, p.157-168, 1999.
- PERERA, B.M.A.O. Reproductive cycles of buffalo. **Animal Reproduction Science**, v. 124, p.194-199, 2011.
- PERERA, B.M.A.O., DE SILVA, L.N.A., KURUWITA, V.Y., KARUNARATNE, A.M. Postpartum ovarian activity, uterine involution and fertility in indigenous buffaloes at a selected village location in Sri Lanka. **Animal Reproduction of Science**, v. 14, p.115-127, 1987.
- PERRY, G.A.; SWANSON, O.L.; LARIMORE, E.L.; PERRY, B.L.; DJIRA, G.D.; CUSHMAN, R.A. Relationship of follicle size and concentrations of estradiol among cows exhibiting or not exhibiting estrus during a fixed-time AI protocol. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 48, p. 15-20, 2014.
- PRESICCE, G.A. Reproduction in the Water Buffalo. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, n. 2, p.24-32, 2007.
- PRESICCE, G.A.; SENATORE, E.M.; BELLA, A.; DE SANTIS, G.; BARILE, V.L.; DE MAURO, G.J.; TERZANO, G.M.; STECCO, R.; PARMEGGIANI, A. Ovarian follicular dynamics and hormonal profiles in heifer and mixed-parity Mediterranean Italian buffaloes (*Bubalus bubalis*) following an estrus synchronization protocol. **Theriogenology**, v. 61, p.1343-1355, 2004.
- PUGLIESI, G.; REZENDE, R.G.; SILVA, J.C.B.; LOPES, E.; NISHIMURA, T.K.; BARUSELLI, P.S.; MADUREIRA, E.D.; BINELLI, M. Uso da ultrassonografia *Doppler* em programas de IATF e TETF em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 41, n.1, p.140-150, jan./mar. 2017.
- RAMOUN, A.A.; EMARA, A.M.; HELEIL, B.A.; DARWEISH, S.A.; ABOU-GHAIT, H.A. Hormonal profile and follicular dynamics concurrent with CIDR and insulin modified Ovsynch TAI programs and their impacts on the fertility response in buffaloes. **Theriogenology**, v. 104, p.205-210, 2017.
- RENSIS, F.; LÓPEZ-GATIUS, F. Use of equine chorionic gonadotropin to control reproduction of the dairy cow: A review. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, p. 177-182, 2014.

- ROLIM FILHO, S.T.; RIBEIRO, H.F.L.; VALE, W. G.; PICANÇO, N.S.; BARBOSA, E.M.; FERREIRA, R.N.; SIMÕES, A.R. Involução uterina, atividade ovariana, primeiro cio pós-parto e distúrbios reprodutivos em búfalas. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 12, n.2, p.221 -227, abr./jun. 2011.
- ROSA HJD, BRYANT MJ. Seasonality of reproduction in sheep. **Small Ruminant Research**, v. 48, p.155-71, 2003.
- ROY, K.S.; PRAKASH, B.S. Plasma progesterone, oestradiol-17beta and total oestrogen profiles in relation to oestrous behaviour during induced ovulation in Murrah buffalo heifers. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 93, p. 486-495, 2009.
- RUSSO, 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.
- RUSSO, 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, 2009.
- SALLES, M.G.F.; ARAÚJO, A.A. Corpo lúteo cíclico e gestacional: revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.34, n.3, p.185-194, jul./set. 2010.
- SEREN, E.; PARMEGGIANI, A.; CAMPANILE, G. The control of ovulation in Italian buffalo. In: **Proc. of the Symposium Reproduction and Animal Breeding: Advances and Strategy**, Milan, Italy, p. 265-275, 1995.
- SIDDIQUI, M. A. R.; ALMAMUN, M.; GINTHER, O. J. Blood flow in the wall of the preovulatory follicle and its relationship to pregnancy establishment in heifers. **Animal Reproduction Science**, v.113, p. 287-292, 2009a.
- SILVA, L.A; GINTHER, O.J. Local effect of the conceptus on uterine vascular perfusion during early pregnancy in heifers. **Reproduction**, v.139, p.453-463, 2010.
- SINGH, B.; DIXIT, V.D.; SINGH, P.; GEORGIE, G.C.; DIXIT, V.P. Plasma inhibin levels in relation to steroids and gonadotrophins during oestrous cycle in buffalo. **Reproduction in Domestic Animals**, v.36, p.163-167, 2001.
- SINGH, G.; DHALIWAL, G.; SHARMA, R.; BISWAS, R. Treatment of summer anestrous buffalo (*Bubalus bubalis*) with progesterone releasing intravaginal device plus pregnant mare serum gonadotropin. **Theriogenology**, v.29, p.1201-1206, 1988.
- SOUZA, A.H.; VIECHNIESKI, S.; LIMA, F.A.; SILVA, F.F; ARAÚJO, R.; BÓ, G.A.; WILTBANK, M.C.; BARUSELLI, P.S. Effects of equine chorionic gonadotropin and type of ovulatory stimulus in a timed-AI protocol on reproductive responses in dairy cows. **Theriogenology**, v.72, p.10-21, 2009.
- SOUZA, D.C.; CARVALHO, N.A.T.; SOARES, J.G.; MONTEIRO, B.M.; MADUREIRA, E.H.; BARUSELLI, P.S. Effect of the presence of corpus luteum in lactating buffaloes on the

response to the Ovsynch protocol during the breeding season (preliminary results). In: **Proc 29th annual meet brazilian embryo technol soc**, v.12, p. 629, 2015.

SPSS, Statistical Package for Social Science. SPSS 13.0 for Windows Student Version, Chicago, EUA, 2004.

STELLA, E.D.; RAMOS, A.A.; RUEDIGER, F.R.; DANTAS, A.; YAMADA, P.H.; CODOGNOTO, V.M.; SALGADO, L.C.; BROCHINE, S.; OBA, E. Evaluation of buffaloes' follicular dynamics and stress state under different ovulation synchronization protocols. **Animal Reproduction**, v.15, n.2, p.102-107, Apr./Jun. 2018.

STELLETTA, C.; TEKİN, K.; ÇİL, B.; ÖZTUTAR, F.; STELLETTA, F.; DAŞKIN, A. Ultrasonografical Monitoring as Diagnostic Tool for Reproductive Management in Female Buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, v.24, n.4, p.577-582, 2018.

SZATMÁRI, V.; SÓTONYI, P.; VÖRÖS, K. Normal Duplex Doppler waveforms of major abdominal blood vessels in dogs: a Review. **Veterinary Radiology Ultrasound**, v.42, p.93-107, 2001.

VECCHIO, D.; NEGLIA, G.; GASPARRINI, B.; RUSSO, M.; PACELLI, C; PRANDI, A.; D'OCCHIOE, M.J.; CAMPANILE, G. Corpus luteum development and function and relationship to pregnancy during the breeding season in the Mediterranean buffalo. **Theriogenology**, v.77, p. 1811-1815, 2012.

VECCHIO, D.; ROSSI, P.; NEGLIA, G.; LONGOBARDI, V.; SALZANO, A.; BIFULCO, G. Comparison of two synchronization protocols for timed artificial insemination in acyclic Italian Mediterranean Buffalo cows out of the breeding season. In: **Proceedings of the 10th World Buffalo Congress**, Phuket Thailand, v.6, n.8, p. 42, 2013.

YINDEE, M.; TECHAKUMPHU, M.; LOHACHIT, C.; SIRIVAIDYAPONG, S.; NACHIANGMAI, 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, p.91-96, 2011.

YOUSUF, M. R.; MARTINS, J.P.N.; HUSNAIN, A.; RIAZ, U.; RIAZ, H.; SATTAR, A.; JAVED, K.; AHMAD, N. Effect of oestradiol benzoate on oestrus intensity and pregnancy rate in CIDR treated anoestrus nulliparous and multiparous buffalo. **Animal Reproduction Science**, v. 159, p. 104-108, 2015.

ZICARELLI, L. Reproductive seasonality in buffalo. In: **Proc. Third Course on Biotechnology of Reproduction in Buffaloes**, v. 2, Caserta, Italy, p. 29-52, 1997.

ZICARELLI, L.; CAMPANILE, G.; ESPOSITO, L.; INFASCELLI, F. Durata del calore (intertempo tra il suo inizio e la sua fine) ed ovulazione nella bufala in funzione del momento stagionale: confronto tra estri spontanei e indotti con alfaprostol. **Rivista Zootechnica Veterinaria**. v. 16, p. 33-55, 1988.

ZICARELLI, L. Utility of progesterone assay in the buffalo cows. In: **Proc. of the 2th National meeting "Studio della efficienza riproduttiva degli animali di interesse zootecnico"**, Bergamo, Italy, p. 165-175, 1989.

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.