



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL



**USO DO CIPIONATO DE ESTRADIOL NA INDUÇÃO DA OVULAÇÃO DE  
BÚFALAS CRIADAS EM VÁRZEA DA REGIÃO DE ITACOATIARA, AMAZONAS**

Manaus-AM

Março, 2020

JADERSON HOLANDA ALMEIDA WEILLER

**USO DO CIPIONATO DE ESTRADIOL NA INDUÇÃO DA OVULAÇÃO DE  
BÚFALAS CRIADAS EM VÁRZEA DA REGIÃO DE ITACOATIARA, AMAZONAS**

Orientador: Gustavo Yomar Hattori, Dr.

Coorientadores: Marcos Vinicius de Castro Ferraz Júnior, Dr

Fábio Jacobs Dias, Dr

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal-PPGCAN da Universidade Federal do Amazonas-UFAM como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Manaus-Amazonas

Março, 2020

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo autor.

W422c Weiller, Jaderson Holanda Almeida  
Uso do cipionato de estradiol na indução da ovulação de búfalas criadas em várzea da região de Itacoatiara, Amazonas / Jaderson Holanda Almeida Weiller, Gustavo Yomar Hattori. 2020  
44 f.: il.; 31 cm.

Orientador: Gustavo Yomar Hattori  
Coorientador: Marcos Vinicius de Castro Ferraz Júnior  
Coorientador: Fábio Jacobs Dias  
Tese (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Amazonas.

1. *Bubalus bubalis*. 2. ésteres de estradiol. 3. inseminação. 4. várzea. I. Hattori, Gustavo Yomar. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

## AGRADECIMENTOS

À DEUS, criador de tudo e de todas as coisas, que iluminou meus passos, que atendeu meus pedidos e lamentações, sendo Protetor e Amigo em todos os momentos.

À minha esposa (Libini da Silveira Weiller) e aos meus Pais (Alcides Weiller e Elenize Holanda de Almeida Weiller), que nunca deixaram de acreditar no meu potencial, que sempre me apoiaram em tudo e pelo orgulho que tem de mim, em especial a minha mãe que incentivou o início deste sonho, como também financiou todo o experimento.

As minhas irmãs (Stéphanie Holanda Almeida Weiller e Lícia Holanda de Almeida) que sempre estiveram ao meu lado, me ajudando nas dificuldades e apoiando nos momentos difíceis.

Ao Prof. Dr. Gustavo Yomar Hattori, pela paciência, apoio e confiança, me proporcionando aprendizado, experiência profissional e todas as oportunidades para ascender intelectualmente.

Aos médicos veterinários que auxiliaram durante o trabalho, Emílio Afonso e Jean Vaz, pela paciência e apoio, sendo parceiros, amigos, superando os momentos ruins e gozando dos bons momentos.

Aos bubalinocultores que contribuíram para realização do trabalho na Fazenda Imperial (João de Oliveira Martins e Manoel Antônio Lira Pena).

À todos os funcionários da Fazenda Imperial (gerente, vaqueiros e cozinheiros) que foram incansáveis durante os vários dias de trabalho.

À todas as pessoas, que contribuíram para que eu chegasse até aqui nesta jornada, por todo o apoio, auxílio, conselhos, amizade e companheirismo.

*É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito e nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.*

Theodore Roosevelt

## RESUMO

WEILLER, J.H.A. **Uso do Cipionato de Estradiol na indução da ovulação de búfalas criadas em várzea da região de Itacoatiara, Amazonas.** [Use of Estradiol Cypionate to induce ovulation in buffalo raised in floodplain areas of Itacoatiara, Amazonas]. 2020. 44f. Tese (Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal) – Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, 2020.

O objetivo desse trabalho foi determinar a eficiência do cipionato de estradiol (CE) como indutor de ovulação em um protocolo de inseminação artificial de tempo fixo, em búfalas criadas, de forma extensiva, em áreas de várzea de Itacoatiara, Amazonas, Brasil. Um total de 69 vacas búfalas mestiças foram selecionadas e divididas em dois lotes. No primeiro lote 39 búfalas receberam um dispositivo intravaginal de progesterona (P4; 1,0g) novo e 2,0mg im de BE, no D0. No D9 o dispositivo intravaginal de P4 foi removido e foram aplicados 0,53mg im de PGF2 $\alpha$  e 400UI im de eCG. De forma aleatória as búfalas foram divididas em dois grupos: o GCE (20 vacas) que recebeu 1mg de CE no D9, e o grupo GBE (19 vacas) que recebeu 1mg de BE 24h após, no D10. No D11 todas as búfalas foram submetidas a IATF 56h após a retirada do implante intravaginal de P4. A mesma metodologia foi utilizada no segundo lote, onde 30 búfalas foram divididas em GCE (14 vacas) e GBE (16 vacas). Para avaliação da dinâmica folicular, o diâmetro do maior folículo no ovário de 11 búfalas por tratamento foi avaliado no D0 e D9 ao D12 (intervalo de 24 horas) por ultrassonografia. Todos os animais do experimento foram submetidos à ultrassonografia para diagnóstico de gestação com mais de 30 dias após a inseminação artificial. Não houve diferença ( $P > 0,05$ ) no diâmetro folicular ( $9,6 \pm 0,89\text{mm}$  vs.  $10,7 \pm 1,12\text{mm}$ ;  $P = 0,06$ ), na taxa de ovulação (90,9% vs. 90,9%;  $P = 1$ ) e taxa de prenhez (58,8% vs. 62,9%;  $P = 0,79$ ), no entanto, búfalas do tratamento GCE apresentam menor tempo entre a remoção da P4 e a ovulação quando comparado com as búfalas do GBE (37,4h vs. 52,8h;  $P = 0,001$ ), respectivamente. Conclui-se que a implantação da IATF nas várzeas do Amazonas é viável e que utilização do CE no dia da retirada do implante intravaginal de P4 resulta em respostas semelhantes ao BE, sendo mais vantajoso visto que reduz o número de manejos e os gastos com a mão de obra.

Palavras-chave: *Bubalus bubalis*, ésteres de estradiol, inseminação, várzea

## ABSTRACT

Weiller, JHA. **Use of Estradiol Cypionate to induce ovulation in buffalo raised in floodplain areas of Itacoatiara, Amazonas.** [Use of Estradiol Cypionate to induce ovulation in buffalo raised in floodplain areas of Itacoatiara, Amazonas]. 2020. 44f. Thesis (Master in the Graduate Program in Animal Science) - Federal University of Amazonas (Amazonas University), Manaus, 2020.

The objective of this study was to determine the efficiency of estradiol cypionate (CE) as an ovulation inducer in a fixed-time artificial insemination protocol in buffaloes managed in floodplain areas of Itacoatiara, Amazonas, Brazil. A total of 69 crossbred buffalo cows were selected and distributed into two allotments. In the first allotment, 39 females received a new progesterone intravaginal device (P4; 1.0g) and 2.0mg im of BE, on D0. On D9 the intravaginal device of P4 was removed and 0.53mg im of PGF2 $\alpha$  and 400UI im of eCG were applied. The buffaloes were randomly divided into two groups: the GCE (20 cows) that received 1mg of EC on D9, and the GBE group (19 cows) that received 1mg of BE 24h later, on D10. In D11, all females were submitted to IATF 56h after the removal of the intravaginal P4 implant. The same methodology was used in the second allotment, where 30 females were distributed into GCE (14 cows) and GBE (16 cows). To assess follicular dynamics, the diameter of the largest follicle in the ovary of 11 buffaloes per treatment was evaluated at D0 and D9 at D12 (24-hour interval) by ultrasound. All animals in the experiment were submitted to ultrasound to diagnose pregnancy more than 30 days after artificial insemination. There was no difference ( $p > 0.05$ ) in follicular diameter ( $9.6 \pm 0.89\text{mm}$  vs.  $10.7 \pm 1.12\text{mm}$ ;  $p = 0.06$ ), in the ovulation rate (90.9% vs. 90, 9%;  $P = 1$ ) and pregnancy rate (58.8% vs. 62.9%;  $p = 0.79$ ), however, buffaloes from the GCE treatment have less time between P4 removal and ovulation when compared to GBE buffaloes (37.4h vs. 52.8h;  $P = 0.001$ ), respectively. Thus, it was concluded that the implantation of the IATF in the Amazon floodplains is feasible and that the use of the EC on the day of removal of the P4 intravaginal implant results in responses similar to the BE, being more advantageous since it reduces the number of managements and the expenses with the labor.

Keywords: *Bubalus bubalis*, estradiol esters, insemination, floodplain

**LISTA DE FIGURAS**

- Figura 1.** Diagrama esquemático de dois protocolos hormonais de IATF à base de progesterona. O protocolo BE com o benzoato de estradiol e o protocolo CE com o cipionato de estradiol, ambos utilizados para indução da ovulação.....17
- Figura 2.** Diâmetro Folicular (mm) aferido por ultrassonografia no D9 ao D12 nos subgrupos das búfalas submetidas à indução da ovulação com CE ou BE.....19

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Valores gastos com a mão-de-obra (4 vaqueiros) para a realização da IATF com protocolos de P4 que utilizam CE e BE como indutores da ovulação, levanto em conta que o valor pago pela diária de um vaqueiro na região é de R\$45,00.....	14
<b>Tabela 2.</b> Composição química (%) dos capins Marreca ( <i>Leersia hexandra</i> Sw.) e Colônia ( <i>Brachiaria mutica</i> ), predominantes na área de várzea da Fazenda Imperial.....	15
<b>Tabela 3.</b> Taxa de prenhez (%) por exame ultrassonográfico após IATF das búfalas submetidas aos tratamentos de indução da ovulação com CE ou BE.....	20
<b>Tabela 4.</b> Sinais Clínicos do Cio (%) no momento da IA das búfalas submetidas aos tratamentos de indução da ovulação com CE ou BE.....	20
<b>Tabela 5.</b> Custo total para implantação da IATF na Fazenda Imperial, divididos em valores de custo permanente e de custo de consumo.....	20
<b>Tabela 6.</b> Custos em reais dos protocolos de IATF, que utilizaram o CE ou o BE como indutores da ovulação, por animal e por cada grupo dependendo da quantidade de animais que cada um possui.....	21

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral.....</b>	<b>3</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>4</b>
<b>3.1</b>	<b>Bubalinocultura na Amazônia.....</b>	<b>4</b>
<b>3.2</b>	<b>Estacionalidade Reprodutiva .....</b>	<b>6</b>
<b>3.3</b>	<b>Ciclo Estral e Dinâmica Folicular .....</b>	<b>7</b>
<b>3.4</b>	<b>Inseminação Artificial em Tempo Fixo em Búfalos .....</b>	<b>9</b>
<b>3.5</b>	<b>Uso do protocolo à base de Progesterona e Estrógeno .....</b>	<b>11</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>14</b>
<b>4.1</b>	<b>Local do Experimento e Seleção dos Animais.....</b>	<b>14</b>
<b>4.2</b>	<b>Delineamento Experimental .....</b>	<b>16</b>
<b>4.3</b>	<b>Avaliações Ultrassonográficas .....</b>	<b>17</b>
<b>4.4</b>	<b>Análise Estatística.....</b>	<b>18</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>19</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>22</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>25</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>26</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Os búfalos domésticos (*Bubalus bubalis*) são animais de origem asiática que foram introduzidos no Brasil com o objetivo de ocupar os chamados “vazios sanitários”, regiões em que, por suas características naturais, a criação de bovinos não se desenvolvia bem. Por serem animais rústicos e de fácil adaptação, sobrevivendo em diversos ambientes, com grandes variações climáticas e de relevo, a criação de búfalos vem crescendo consideravelmente na região Amazônica devido às condições geográficas que proporcionam um habitat com excelentes condições.

Na região do Médio Amazonas, a criação de búfalos é explorada, em sua maior parte, por pequenos produtores, com baixo uso de tecnologia e destina-se fundamentalmente à produção de carne, leite e derivados, possuindo características de sistemas extensivos em propriedades com áreas mistas de várzea e terra firme. Área de várzea é o local onde os búfalos são criados no período da vazante dos rios. Nessas áreas é disponibilizada grande quantidade de forragem oriunda de pastagens naturais. Já no período das enchentes, os animais são transportados à área de terra firme, local não alagável, onde a oferta de forragem é escassa.

Diferente dos bubalinos criados em outras regiões do Brasil, onde o comportamento da atividade reprodutiva é sazonal, os animais criados próximo da zona equatorial, na região Amazônica, se comportam como poliestrual contínuo. A atividade reprodutiva na região está relacionada com a oferta de forragem e não com a sazonalidade. Esse é o fator determinante para que tanto a reprodução dos bubalinos, como a distribuição dos nascimentos dos bezerros seja observada durante todo o ano, quando os animais não apresentam anestro nutricional.

Contudo, um dos desafios existentes na região Amazônica é o aperfeiçoamento da eficiência reprodutiva e do melhoramento genético através de biotécnicas aplicadas a reprodução animal, tendo como entrave as propriedades com criações extensivas e com baixa oferta de alimentos durante determinado período do ano. Dentre as biotécnicas, a Inseminação Artificial (IA) é considerada uma das técnicas mais utilizadas entre os animais domésticos. Entretanto, em bubalinos, a IA tem seu uso limitado por fatores relacionados à dificuldade de identificação do cio. Os sinais clínicos do estro em fêmea bubalina são discretos, como o corrimento do muco vaginal que só é detectado na búfala em estro quando feita a massagem da vagina por palpação retal.

Para evitar esse problema em bubalinos, desde o final da década de noventa, foram realizadas pesquisas com o objetivo de avaliar a eficácia de diferentes protocolos de sincronização da ovulação para Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF). Os objetivos

desses protocolos são sincronizar a fase luteínica, o crescimento folicular e a ovulação, facilitando o manejo e permitindo que a IA propriamente dita seja programada para um determinado dia e hora.

Os protocolos hormonais mais utilizados para IATF são o Ovsynch e os baseados em Progesterona. O protocolo de Ovsynch possui maior eficiência em fêmeas que estejam ciclando, enquanto o protocolo à base de progesterona possui eficiência em fêmeas que estejam ciclando ou em anestro. Entretanto, o custo do protocolo a base de progesterona é mais elevado do que o do protocolo de Ovsynch.

O protocolo baseado em progesterona consiste na inserção do dispositivo intravaginal de Progesterona (P4) associado à administração de Benzoato de Estradiol (BE) no dia 0. Após nove dias o dispositivo intravaginal é removido e é administrado Prostaglandina (PGF2) e Gonadotrofina Coriônica Equina (eCG). No dia 10 é administrado o BE, como indutor da ovulação, e 56 horas após a retirada do implante de progesterona, no dia 11, é realizada a IATF.

Apesar do protocolo hormonal à base de progesterona ser o mais eficiente, ainda são necessários estudos para encontrar outros protocolos alternativos com custos de implantação mais baratos e que necessitem de menos dias de manejo. Estudos sobre o uso do Cipionato de Estradiol (CE), como indutor da ovulação, são necessários para avaliar sua utilização na indução da ovulação em protocolos para bubalinos à base de progesterona e verificar a eficiência deste protocolo em vacas bubalinas criadas de forma extensiva nas áreas de várzea. O resultado deste estudo, além de contribuir com a ciência, irá contribuir com a implantação da IATF em bubalinos no Estado do Amazonas.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Comparar a eficiência do cipionato de estradiol (CE) e do benzoato de estradiol (BE) como indutores de ovulação num protocolo de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) à base de progesterona em búfalas criadas em várzea no Estado do Amazonas.

### **2.2. Objetivos específicos**

Avaliar a eficiência do protocolo a base de progesterona em vacas bubalinas criadas de forma extensiva em áreas de várzea da região de Itacoatiara, Amazonas.

Avaliar a dinâmica folicular, a taxa de ovulação, sinais clínicos do cio e as taxas de prenhez nas vacas búfalas submetidas à IATF.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Bubalinocultura na Amazônia

Os búfalos são animais da família Bovidae, subfamília Bovinae e espécie *Bubalus bubalis*. Esses animais vêm sendo utilizados como recurso animal de grande importância em muitos países da Ásia (Índia, Paquistão, Tailândia, China e Vietnã), Europa (Itália) e na América Latina (Brasil, Argentina, Colômbia, Venezuela e Peru) (PERERA, 2011).

A criação de búfalos foi difundida mundialmente, devido à superioridade econômica que pode apresentar em relação a outros ruminantes domésticos, principalmente no que diz respeito à rusticidade e adaptação às várias condições climáticas e manejo (LOURENÇO JUNIOR, 2005). Segundo Mirmahmoudi e Prakash (2012) a importância econômica na exploração desses animais reside também, nas vantagens proporcionadas quanto à fertilidade, longevidade, eficiência de conversão alimentar e aptidão para a produção de leite, carne e trabalho.

Na Amazônia, durante muito tempo, a produção de carne foi considerada a principal atividade da bubalinocultura. Atualmente, a exploração leiteira começa a ganhar importância, considerando-se a potencialidade dessa espécie em produzir leite com baixos custos e elevado rendimento na industrialização, bem como a demanda da população por seus derivados (CASSIANO et al., 2003). De acordo com os mesmos autores, a produção leiteira nas fazendas da região Norte, possui média de 1.460,8 kg por lactação/búfala, sendo considerada baixa quando comparada à média nacional, que é em torno de 1.863,5 kg, ou a média de outros estados, como da Bahia que gira em torno de 2.555,7 kg por lactação de 305 dias.

A pecuária bubalina, nas últimas décadas, tem apresentado crescimento, com bom resultado e rentabilidade, gerando elevação de renda para o produtor, além de empregos, nos vários segmentos da cadeia produtiva (LOURENÇO JUNIOR, 2005). Segundo Bernardes (2007), o búfalo vem sendo criado usualmente em pequenas e médias propriedades, e, os maiores rebanhos do Brasil são encontrados principalmente na região Norte.

O rebanho bubalino brasileiro possui 1.351.631 cabeças e na região Norte é onde se concentra a maior parte desse quantitativo com cerca de 890.000 cabeças. O Estado do Amazonas apresenta o quinto maior rebanho do Brasil com aproximadamente 80.000 cabeças. (BRASIL, 2018). No Brasil são reconhecidas quatro raças: Carabao, Murrah, Jafarabadi e Mediterrâneo (CAMARGO JUNIOR et al., 2012).

A região amazônica possui uma pecuária bubalina com características extensivas face às grandes áreas de pastagens nativas de várzeas, localizadas às margens do rio Amazonas e de seus afluentes, que possuem elevado potencial de produção de forragem de bom valor

nutritivo (VALE et al., 1990). As principais limitações das pastagens de várzea são as dificuldades de manejo dos rebanhos na estação das cheias, quando as áreas de pastagem permanecem praticamente inundadas. Nesse período os animais passam a ser manejados nas áreas de topografia elevada, onde ocorrem menor disponibilidade e qualidade de forragem (TOWNSEND et al., 2012).

A partir da década de 60, a bubalinocultura na Amazônia, que vinha sendo baseada apenas em pastagens nativas, começou a ser desenvolvida, também, em pastagens cultivadas de terra firme, ou em sistemas integrando as duas condições (LOURENÇO JUNIOR, 2005).

Atualmente, a maior parte do rebanho bubalino é mantida em sistema de integração entre várzea e terra-firme, onde durante os meses de setembro a fevereiro os animais ocupam áreas de várzea, e de março a agosto são mantidos em áreas de pastagens de topografia elevada (terra firme), em virtude do ciclo de cheias dos rios (CASSIANO et al., 2004).

Na região amazônica, onde é pequena a diferença de luminosidade ao longo do ano e o clima é tropical úmido, Vale (1997) observou que o bubalino se comporta como poliestival contínuo, ou seja, o comportamento reprodutivo da atividade sazonal é menos pronunciado.

Desta forma, nas condições de clima tropicais, onde as variações de fotoperíodo e temperatura são mínimas, é possível haver distribuição de nascimentos durante todo o período do ano. Estudo realizado por Camargo Junior et al. (2012), concluiu que os búfalos apresentaram, para as condições de pastagens nativas de terra inundável e de terra firme da Amazônia, bom desempenho reprodutivo. Garcia (2006) verificou que problemas reprodutivos estão diretamente relacionados diretamente com o estado nutricional da fêmea e com a oferta de alimento.

Cassiano *et al.* (2003) verificaram em uma população de bubalinos na região Amazônica, que a média da idade a primeira cria (IPC) foi de 35 meses. Por sua vez, Rolim Filho (2006) encontrou o valor do IPC igual a  $39,52 \pm 7,54$ , com valores mínimo e máximo de 23,31 e 64,55 meses, respectivamente.

Para o intervalo de partos (IP), Cassiano *et al.* (2003) relataram intervalos de 13 meses. Rolim Filho (2006) observou médias de IP em relação à época de parição de  $17,09 \pm 4,71$  e  $18,89 \pm 4,27$  meses para a época mais chuvosa e menos chuvosa, respectivamente. Camargo Junior et al. (2012) encontrou uma média de IP de  $16,54 \pm 3,74$  meses e valores mínimo e máximo de 11,33 e 28,31 meses. Os valores de IP obtidos para a região amazônica com base nos estudos citados variam de 13 a 19 meses dependendo do período de chuva.

### **3.2. Estacionalidade Reprodutiva**

O anestro é um problema reprodutivo comumente encontrado em bovinos e bubalinos, consistindo em um distúrbio funcional do ciclo reprodutivo, caracterizado pela ausência dos sinais evidentes do estro, que afeta a produtividade do rebanho (KUMAR et al., 2014). Segundo os mesmos autores, esse problema reprodutivo é multifatorial, podendo ser fisiológico ou estar relacionado a outros fatores, tais como: às variações de fotoperíodo, alimentação inadequada, estresse ambiental, patologias uterinas ou a práticas de manejo inadequadas.

A fertilidade em búfalos é considerada menor do que em bovinos, em determinadas regiões, devido à sazonalidade reprodutiva (DROST, 2007). Vários trabalhos realizados em diferentes países enfatizam que a eficiência reprodutiva nos bubalinos é mais influenciada por fatores ambientais do que genéticos, tornando limitado o uso de biotecnologias (RIBEIRO NETO et al., 2007). Phogat et al. (2016) considera que a reprodução dos búfalos é influenciada negativamente por fatores como a luminosidade ao longo do ano, com registro de ocorrência de ciclos estrais irregulares.

Nas regiões mais distantes da linha do Equador, o búfalo se comporta como animal poliestrual sazonal de dias curtos, com interrupção da ciclicidade durante o verão, quando o tempo de luminosidade diária é maior. Contudo, nas regiões próximas a linha do Equador, as fêmeas bubalinas ciclam durante todo o ano, desde que a nutrição seja adequada (BARUSELLI et al., 2003).

Búfalos possuem uma eficiente conversão alimentar quando comparados aos bovinos, permitindo que a espécie bubalina mantenha uma excelente produtividade em sistemas de criação limitantes para outras espécies. Porém, estudo mostrou que búfalas pós-parto, que passaram por um equilíbrio energético negativo, tiveram ondas foliculares com folículos dominantes pequenos e apresentaram atraso na ovulação (CAMPANILE et al., 2010).

A subnutrição é uma causa prevalente de anestro em búfalas, normalmente observada em rebanhos criados livres nas áreas tropicais, associado à escassez de alimentos e por forragens de baixa qualidade (KUMAR et al., 2014).

O estado nutricional dos animais afeta o crescimento folicular, a maturação e a ovulação (DISKIN, 2003). Segundo Bearden et al. (2004), os minerais desempenham um papel intermediário na ação dos hormônios e enzimas a nível celular e sua deficiência afeta o desempenho reprodutivo das fêmeas.

Estudos realizados por Campanile et al. (2010), mostraram que novilhas búfalas alimentadas com dietas de baixa energia não apresentaram mudanças significativas na

circulação de hormônios reprodutivos e no desenvolvimento folicular, porém produziram ovócitos de qualidade inferior. Contudo, dietas ricas em energia são necessárias para novilhas búfalas reduzirem a idade ao primeiro parto (ZICARELLI, 2007). A puberdade em búfalas é atingida quando a fêmea alcança cerca de 60% do peso corporal de uma fêmea adulta e seu atraso está relacionado com o manejo nutricional inadequado (WARRIACH et al., 2012).

O estado corporal das búfalas interfere nos índices de fertilidade obtidos em inseminação artificial (IA) e no aparecimento de cio, pois búfalas que estavam com escore de condição corporal (ECC) muito baixo na ocasião do parto demoravam em manifestar estro e conseqüentemente, tinham sua fertilidade reduzida, quando comparadas a outras em bom estado corpóreo (BHALARU et al., 1987). Segundo Baruselli et al. (2001), para avaliar o ECC uma escala de 1 à 5 é utilizada, onde 1 corresponde a animais caquéticos e 5 a animais obesos.

O ECC em búfalas inseminadas com o protocolo de Ovsynch influenciou a taxa de prenhez (TP), onde fêmeas com  $ECC < 3$  apresentaram taxa de prenhez de 31,4% e em fêmeas com ECC mais elevado foi observado aumento na taxa de prenhez (ECC de 3,5 = 52,3% de TP e  $ECC > 4$  = 57,1% de TP) (BARUSELLI et al., 1999).

Baruselli (2000) verificou a interferência do ECC na taxa de concepção das búfalas inseminadas artificialmente e concluiu que os animais com escore corporal  $\leq 2,5$  obtiveram taxa de prenhez de 20% e aqueles com escore corporal de  $> 2,5$  obtiveram taxa de prenhez de 50%.

Em um estudo realizado no Pasquitão, observou-se que a baixa ingestão de energia associada a um baixo ECC ( $ECC < 2,75$ ), causa a baixa eficiência reprodutiva em búfalos (QURESHI et al., 2002). De acordo com esses autores, a ingestão de energia metabolizável no pré-parto em quantidade ideal resultam na acumulação de reservas energéticas corporais, garantindo o retorno do ciclo estral e conseqüentemente o aumento das taxas de concepção. Já a ingestão baixa de energia leva a inatividade ovariana e o anestro.

### **3.3.Ciclo Estral e Dinâmica Folicular**

O ciclo estral compreende os eventos reprodutivos que ocorrem entre dois períodos consecutivos de receptividade sexual ou ovulações e que são regulados por mecanismos endócrinos e neuroendócrinos que se integram e geram uma dinâmica folicular que permite o desenvolvimento de um folículo maduro capaz de ovular e produzir uma célula capaz de ser fecundada (PERERA, 2011).

O ciclo estral pode ser dividido em fases folicular e luteínica, assim classificados com base na estrutura morfológica que domina cada fase, isto é, folículos e corpo lúteo, respectivamente (SINGH et al., 2000). Segundo os mesmos autores, cada fase é composta por dois estágios: a fase folicular apresenta duração curta, corresponde a aproximadamente 20% do ciclo estral e compreende o proestro e o estro; e a fase luteínica que equivale a 80% da duração do ciclo estral e compreende o metaestro e o diestro.

O período de proestro é caracterizado pelo declínio nos níveis de progesterona devido à regressão do corpo lúteo, pelo desenvolvimento folicular e pelo aumento dos níveis de estradiol no sangue, ocorrendo a liberação hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) pelo hipotálamo que estimula a secreção do hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH), os quais em elevados níveis no sangue induzem o desenvolvimento dos folículos e estimulam sua maturação, aumentando a produção de estradiol e dando início a fase de estro (ROELOFS et al., 2006).

O estro é a fase de maior destaque, este é o estágio mais conhecido do ciclo estral, pois ele é caracterizado pelo comportamento de receptividade sexual e pelos sinais característicos do estro: útero túrgido, cérvix relaxada, vagina e vulva com sinais de hiperemia e edema, além do corrimento de muco (BARUSELLI et al., 2007).

O metaestro é considerado o período final do estro tendo como característica principal a ovulação (ROELOFS et al., 2006). Após a ruptura do folículo as células da parede interna do folículo se proliferam dando origem a uma nova estrutura, denominada corpo lúteo (FERREIRA et al., 2009). Os eventos subsequentes de reorganização do tecido luteal, com posterior aumento do fluxo sanguíneo ovariano e do peso do corpo lúteo, levam ao aumento gradativo da síntese de progesterona caracterizando o período de diestro (ANDRADE et al., 2012).

A sumarização acima foi estabelecida inicialmente para bovinos, mas, hoje se sabe que são semelhantes em bubalinos (PERERA, 2011). A duração do ciclo estral na búfala varia de 16 a 33 dias, com maior concentração entre 21 a 24 dias (DROST, 2007). O estro em fêmeas bubalinas dura cerca de 5 a 27 horas (média de 20h), a ovulação ocorre entre 24 a 48 horas após o início do estro, em média 6 a 21 horas após o fim do estro (CAMPANILE et al., 2010).

A foliculogênese é um processo contínuo de crescimento e atresia dos folículos ovarianos que se inicia na vida fetal, passa pela puberdade e continua na vida reprodutiva até a senilidade. Desta forma, a dinâmica folicular ovariana revela-se como um processo cíclico, podendo ser caracterizado a partir do processo de ativação, em quatro fases distintas: recrutamento (emergência), desvio (divergência), dominância e atresia, sendo cada uma delas

controlada por mecanismos específicos (ANDRADE et al., 2012). O estudo da dinâmica folicular durante o ciclo estral pode ajudar a elucidar os fenômenos que interferem na sincronização do ciclo estral e da ovulação e colaborar, assim, para o incremento da fertilidade (BORGES, 2001).

Os primeiros estudos realizados por meio de monitoramento ultrassonográfico em bubalinos para acompanhamento da dinâmica folicular foram realizados por Manik et al. (1994), Taneja et al. (1996) e Baruselli et al. (1997). Segundo Taneja et al. (1996), com a ultrassonografia, que é uma técnica de avaliação não incisiva e em tempo real, permitindo detectar as estruturas ovarianas e, acompanhar o seu desenvolvimento por meio de mensurações regulares. Pesquisa que utilizou a ultrassonografia comprovou que o crescimento folicular ocorre em formas de ondas (MANIK et al., 1994) e que em bubalinos o número de ondas foliculares por ciclo estral pode chegar ao número três (BARUSELLI et al., 1997).

O desenvolvimento dos folículos antrais é caracterizado pelas fases de recrutamento, crescimento, seleção e dominância (SINGH et al., 2000). Segundo o autor, com o crescimento e o aumento na expressão de receptores para FSH na granulosa e para LH na teca, os folículos se tornam responsivos a estes hormônios, e desenvolvem um antro, constituindo o principal alvo do monitoramento ultrassonográfico realizado nos estudos da dinâmica folicular.

Para búfalas com duas ondas foliculares em cada ciclo estral, a taxa de crescimento e o diâmetro do maior folículo foram significativamente menores em novilhas do que em vacas, tanto para a primeira onda folicular (1,3 mm em comparação com 1,7 mm por dia e 10,5 mm em comparação com 13,3 mm, respectivamente) e segunda onda folicular (1,0 mm em comparação com 1,3 mm por dia e 11 mm em comparação com 13,8 mm, respectivamente) (PERERA, 2011).

Gimenes et al. (2011) relatam que a divergência folicular em novilhas bubalinas ocorreu 2,6 dias após a emergência quando o folículo dominante atinge 7,2 mm e o maior folículo subordinado atinge 6,4 mm, já a capacidade ovulatória foi adquirida quando o folículo dominante atingiu cerca de 8,5 mm.

### **3.4. Inseminação Artificial em Tempo Fixo em Búfalos**

A inseminação artificial (IA) é a biotécnica aplicada à reprodução animal em que o sêmen é depositado no aparelho reprodutor da fêmea, com o auxílio de materiais e instrumentos específicos, em condições que permitam obter a fecundação (BARUSELLI et al., 2007).

Esta técnica é amplamente utilizada para difusão de material genético superior de machos, a introdução de novos materiais genéticos por importação de sêmen congelado a um custo insignificante em comparação com a importação de animais vivos, a utilização de sêmen congelado mesmo após a morte de touro e de controle das doenças venéreas (SINGH et al., 2016). Segundo Beber et al. (2002), de todas as biotécnicas aplicadas à reprodução animal, a IA é a mais antiga, a mais simples e a de maior impacto na reprodução animal, porém esta técnica ainda é pouco utilizada em búfalos.

Uma das limitações do uso da IA nos bubalinos é a dificuldade de detecção visual do estro pelo vaqueiro e de determinar o melhor momento para a IA, tendo em vista que o comportamento de estro da fêmea bubalina é mais discreto que o da fêmea bovina, com relatos de grande concentração de estros no período noturno, o que caracteriza, assim, a dificuldade de detecção deste e o relativo comprometimento do manejo reprodutivo (SINGH et al., 2016).

Em fêmeas bubalinas, o comportamento sexual é caracterizado pelo hábito de fêmeas montarem ou deixarem-se montar no período de estro são pouco evidentes e os sinais clínicos como o corrimento do muco vaginal é mais discreto, sendo detectado na búfala em estro somente quando é feita a massagem da vagina por palpação retal (ALI e FAHMY, 2007).

A dificuldade de realização da IA em função da necessidade de acompanhamento do cio, Baruselli et al. (2003) adaptou à espécie bubalina o protocolo de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) utilizada em bovinos. Como o próprio nome indica, a técnica de IATF tem por objetivo o controle da ovulação, permitindo que a IA seja programada para um determinado dia e hora (CARVALHO et al. 2016).

Para facilitar o manejo e aumentar a eficiência da IA foram desenvolvidos protocolos que dispensam a necessidade de detecção do estro, com o objetivo de sincronizar a fase luteínica, o crescimento folicular e a ovulação, permitindo o uso da inseminação artificial em tempo fixo, mesmo em animais que não estão apresentando sinais de estro (BARUSELLI et al., 2009).

Baruselli et al. (1999) desenvolveram estudos para avaliar a eficiência de protocolo Ovsynch (D0, GnRH; D7, PGF<sub>2α</sub>; D9, GnRH; IA após 16 horas) em búfalas. Esta experiência confirmou que as búfalas responderam ao tratamento hormonal e que cerca de 80% dos animais apresentaram uma ovulação sincronizada dentro de 12h após aplicação do segundo GnRH. Além disso, uma taxa de prenhez de 50% foi obtida nas búfalas durante época favorável a reprodução. Em outros estudos, taxas de prenhez satisfatórias de aproximadamente 40 a 60% (NEGLIA et al, 2003; PAUL e PRAKASH, 2005; ALI e

FAHMY, 2007; CHAIKUN et al., 2010) foi conseguido com o protocolo Ovsynch no período de reprodução favorável.

Outro estudo avaliou a eficácia do dispositivo intravaginal de progesterona associado com o protocolo Ovsynch para IATF em búfalas, verificando que a taxa de prenhez foi semelhante entre os animais tratados com Ovsynch (55,4%) e com Ovsynch + P<sub>4</sub> (57,5%) (BARUSELLI et al., 2003). Porém, estudo realizado por De Rensis et al. (2005), observou um aumento na taxa de concepção quando progesterona foi utilizado com o protocolo Ovsynch em búfalos cíclicos.

No entanto, quando o protocolo foi utilizado em Ovsynch búfalas em anestro, os resultados foram inferiores aos obtidos com búfalas cíclicas. Estudo realizado por Souza et al. (2015) verificou que búfala sem um corpo lúteo responderam pobremente ao primeiro (42,0 vs 89,8%) e segundo (52,0 vs 87,8%) tratamentos de GnRH, resultando numa menor taxa de prenhez depois da IATF em comparação com os animais com um corpo lúteo. Taxas de prenhez de 7 a 30% foram encontradas em outros estudos que avaliaram o protocolo de Ovsynch durante a estação reprodutiva desfavorável (DE RENSIS et al., 2005; ALI e FAHMY, 2007; BARUSELLI, 2007).

Diferentes protocolos de sincronização do estro desenvolvidos para a IATF têm sido utilizados para a redução do anestro pós-parto, porém os resultados obtidos ainda estão em conflito, pois as diferenças de programas de sincronização, a idade dos animais, os efeitos sazonais e os níveis de nutrição são aceitos como uma razão para estas discrepâncias (YOTOV et al., 2012).

Atualmente é possível sincronizar a ovulação para a IATF de búfalas durante todo o ano com eficiência, mesmo em localidades onde búfalas apresentam estacionalidade reprodutiva (CARVALHO et al. 2017). Os mesmos autores afirmam que o protocolo de Ovsynch pode ser usado durante a estação reprodutiva favorável em búfalas ciclando e, o protocolo à base de progesterona e estrógeno pode ser utilizado durante todo o ano, principalmente na estação reprodutiva desfavorável em búfalas em anestro.

A utilização do protocolo à base de progesterona e estradiol pode possibilitar a distribuição mais homogênea dos partos e da produção de leite durante todo o ano, porém o custo do protocolo é mais elevado do que o protocolo de Ovsynch (BARUSELLI et al., 2007).

### **3.5. Uso do protocolo à base de Progesterona e Estrógeno**

Em razão da baixa eficiência do protocolo de Ovsynch para a IATF fora da estação reprodutiva e da marcada estacionalidade dos partos, que dificulta a produção homogênea de

leite durante todo o ano, Baruselli et al. (2009) realizou estudos com a finalidade de sincronizar o crescimento folicular e a ovulação, utilizando tratamentos que associavam dispositivos intravaginais ou auriculares contendo progesterona (P4) e progestágenos com  $PGF_{2\alpha}$  e estrógenos.

Em protocolos de IATF, o implante de progesterona inibe a liberação dos hormônios hipofisários (LH e FSH), diminui o desenvolvimento folicular e a ovulação até o momento desejado. Com a retirada do implante, a concentração de progesterona sérica declina rapidamente, com isso, o animal entra em estro. A administração de eCG, nesse caso, estimula o desenvolvimento folicular e potencializa a ação sincronizante dos progestágenos (MONTEIRO et al., 2014).

A inclusão da eCG nos protocolos de indução da ovulação está relacionada ao aumento da taxa de concepção por tornar mais presente e preciso o pico pré-ovulatório do LH, incrementar o crescimento dos folículos, tornando-os mais responsivo aos indutores da ovulação e aumentar a taxa de ovulação, principalmente dos animais em anestro (BARUSELLI et al., 2006).

Altas taxas de prenhez foram obtidas no protocolo de IATF à base de P4 com a aplicação de eCG na remoção do dispositivo intravaginal durante estação reprodutiva desfavorável (MONTEIRO et al., 2014). Assim, Carvalho et al. (2011), considerou que a administração de eCG no momento da remoção do dispositivo de P4 melhora a eficiência reprodutiva de búfalas em lactação submetidas a programas de IATF.

Os protocolos baseados em progesterona desenvolvidos para búfalas consistem na inserção de um dispositivo intravaginal liberador de progesterona associado à injeção intramuscular de estradiol (E2 – benzoato de estradiol - BE) em um dia aleatório do ciclo estral (D0), nove dias mais tarde (D9), o dispositivo/implante é removido e as doses de prostaglandina ( $PGF_{2\alpha}$ ) e eCG são aplicadas, e 48 horas mais tarde (D11), a ovulação é induzida pela administração de GnRH, realizando a IATF 16 horas mais tarde (BARUSELLI et al., 2003).

Estudos realizados por Carvalho et al. (2012) avaliaram a utilização do benzoato de estradiol (BE) para induzir a ovulação, em vez de GnRH, no protocolo IATF para búfalas à base de progesterona. Segundo o autor, as búfalas foram tratadas com BE, 24 ou 36h após a remoção do dispositivo de P4, e GnRH, 48h após remoção do dispositivo de P4, concluindo que a indução da ovulação com BE ou GnRH resultaram em respostas semelhantes quanto a taxa de ovulação (78,7%; 82,0%; 84,1%, respectivamente) e taxa de prenhez (51,3%; 45,5%; 46,4%, respectivamente). O baixo custo e a resposta similar, quando comparado o BE para indução da ovulação, sugere que este tratamento seja uma alternativa aceitável para a substituição do GnRH em protocolos de IATF à base de P4 (CARVALHO et al., 2016).

Como observado em fêmeas búfalas, ovulação e taxa de prenhez semelhantes foram relatadas após o uso de BE ou GnRH para a indução da ovulação em protocolo de IATF à base de P4 em novilhas búfalas durante estação reprodutiva desfavorável. (CARVALHO et al., 2017).

O efeito da administração do benzoato de estradiol e do cipionato de estradiol (CP), na indução e sincronização da ovulação de búfalas submetidas ao protocolo de IATF, durante estação reprodutiva desfavorável foi realizado com objetivo de avaliar utilização do CP para redução do número de manejos e do custo de implantação do protocolo (CARVALHO et al., 2018). O mesmo autor não encontrou diferença entre os grupos experimentais em relação a taxa de ovulação (70,4% vs. 62,1%), porém menor taxa de prenhez (36,2% vs. 49,5%) foi observada para os animais do grupo que utilizou o BE em comparação ao grupo em que foi utilizado o CE, concluindo que a indução da ovulação com uso do CP é um tratamento alternativo para substituição do BE em protocolos de IATF à base de P4.

Esses estrógenos produzem diferentes perfis de circulação de estradiol, provavelmente devido diferenças na esterificação da molécula, o que leva a alterações na polaridade e no peso molecular das estruturas e, portanto, modifica a absorção e o metabolismo no organismo (TORRES et al., 2010). Em estudos realizados com bovinos foi possível observar que o CE permanece biodisponível na forma sistêmica por maior tempo e quando administrado juntamente com a retirada do implante de progesterona, mantêm níveis plasmáticos suficientes para estimular o pico de LH após a queda dos níveis de P4 (PALHÃO et al., 2014).

Fator importante do uso de ésteres de estradiol é que em resposta à sua ação, na fase de pró-estro e estro, em decorrência do estímulo do FSH e LH da hipófise anterior, ocorre à presença da contratilidade uterina e do muco como respostas fisiológicas que o útero sofre permitindo um ambiente uterino favorável para os espermatozoides atingirem o local de fecundação (PERERA, 2011).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Local do Experimento e Seleção dos Animais

O experimento foi conduzido na Fazenda Imperial, localizada as margens do Rio Urubu (Latitude: 02° 59' 58,5" S; Longitude: 58° 29' 59,2" O), próximo ao município de Itacoatiara no Estado do Amazonas, Brasil.

O local do experimento é classificado como uma propriedade mista, por possuir área de várzea e terra firme. Nesta propriedade os animais permanecem cerca de 8 meses do ano nas áreas de várzea e 4 meses em área de terra firme. A propriedade possui cerca de 1.066,5 ha de área total, sendo 102 ha de pastagem cultivada em área de terra firme e 190,5 ha de pastagem nativa em área de várzea.

As búfalas (*Bubalus bubalis*) utilizadas no experimento foram provenientes de duas propriedades localizadas no Município de Itacoatiara e de uma propriedade localizada no Município de Boa Vista do Ramos, ambos os municípios do Estado do Amazonas, Brasil. No período da seleção das búfalas, as instalações da fazenda onde o experimento foi realizado passaram por reformas, sendo construída uma estrutura alternativa de madeira para contenção dos animais.

Todas as despesas para implantação da IATF na Fazenda Imperial foram registradas e seus valores estão descritos na Tabela 1.

**Tabela 1.** Custo total (R\$) para implantação da IATF na Fazenda Imperial, divididos em valores de custo permanente e de custo de consumo.

Tipos de Custo	Custos	
	Itens	Valor (R\$)
Permanente	Reforma do Curral e Brete	12.000,00
	Botijão e Kit de Inseminação	2.650,00
Consumo	Exames de Brucelose e Tuberculose	2.800,00
	Mão-de-obra	1.620,00
	Recarga de Nitrogênio	300,00
	Sêmen Congelado de Búfalo	3.200,00
	Materiais em Geral	640,00
	Protocolo hormonal	2.042,44
	Aluguel de Ultrassom	1.500,00
	Exame Bromatológico	114,00

---

Total	26.866,44
-------	-----------

---

Um total de 112 vacas búfalas mestiças foram selecionadas e transportadas para a Fazenda Imperial, no início do mês de janeiro de 2019, período do ano considerado chuvoso e que ocorre o início da enchente dos rios. Somente búfalas criadas em área de várzea, entre 20 a 50 dias pós-parto, e com ECC  $\geq$  3 foram selecionadas. Todas as fêmeas foram identificadas e submetidas aos exames de Brucelose e Tuberculose.

Os touros búfalos presentes na Fazenda Imperial foram mantidos durante todo o experimento, em um curral localizado na área de terra firme, isolados das fêmeas selecionadas para não interferir no resultado do experimento.

Após 30 dias da chegada dos animais, em fevereiro de 2019, foram realizados exames ginecológicos através da palpação retal e da ultrassonografia (transdutor linear de 5.0 MHz, Mindray DP 2200 VET, China), e as fêmeas diagnosticadas com prenhez foram separadas do rebanho e retornaram as propriedades de origem.

Do total de 112 búfalas mestiças selecionou-se 69 vacas búfalas vazias em lactação. Esses animais selecionados foram mantidos em sistema extensivo utilizando pastagens nativas de várzea, com predominância do capim-Marreca (*Leersia hexandra* Sw.) e do capim-Colônia (*Brachiaria mutica*) durante todo o experimento. Sal mineral foi ofertado diariamente em cochos localizados próximos ao curral.

A pastagem do local foi caracterizada com auxílio de um quadrado de 1 m<sup>2</sup>, lançado 5 vezes, ao acaso, para avaliação da massa de forragem e da composição botânica. A análise química da forragem foi realizada após as amostras coletadas serem secadas em estufa de ventilação a 55°C por 72 horas e moídas em moinho tipo Willey com peneira de crivo de 1mm, para então serem analisadas quanto aos teores de matéria seca (MS), matéria mineral (MM) e proteína bruta (PB), segundo Association of Official Analytical Chemists (1990), e de fibra detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) de acordo com Van Soest et al. (1991). A análise da composição química das forragens mostrou o predomínio de capins com cerca de 5% de PB e com FDN de cerca de 70% (tabela 2).

**Tabela 2.** Composição química (%) dos capins Marreca (*Leersia hexandra* Sw.) e Colônia (*Brachiaria mutica*), predominantes na área de várzea da Fazenda Imperial.

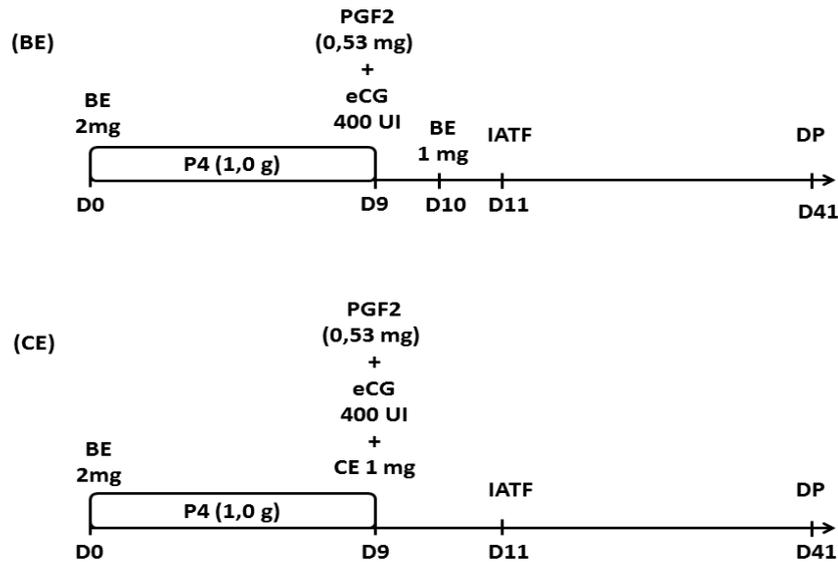
Parâmetros	Capim Marreca	Capim Colônia
MS	42,20	42,30
MM	7,50	7,90
PB	5,02	4,30
FDN	75,30	67,40
FDA	43,70	41,80

(MS = matéria seca; MM = matéria mineral; PB = proteína bruta; FDN = fibra em detergente neutro; FDA = fibra em detergente ácido).

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), sob o número 062/2018.

#### 4.2.Delineamento Experimental

As 69 búfalas foram divididas em dois lotes, devido à quantidade de implante intravaginal (40 unidades) adquirido para o início do experimento, que ocorreu no mês de fevereiro de 2019. No primeiro lote, 39 búfalas receberam um dispositivo intravaginal de progesterona (1,0g, P4) novo e 2,0mg intramuscular (im) de BE pela manhã, em dia aleatório do ciclo estral (D0). No D9 pela manhã, foi realizada a remoção do dispositivo intravaginal de P4 e a aplicação de 0,53mg im de PGF2 $\alpha$  (Cloprostenol sódico) e 400UI im de eCG. De forma aleatória as búfalas foram divididas em Grupo Cipionato de Estradiol (GCE) e Grupo Benzoato de Estradiol (GBE). No D9 as 20 búfalas do GCE receberam pela manhã 1,0mg im de CP (Cipionato de Estradiol) e 24 horas mais tarde, no D10, apenas as 19 búfalas do GBE receberam 1,0mg im de BE. Todas as búfalas do primeiro lote foram submetidas a IATF 56h após a retirada do implante intravaginal de progesterona (D11, pela tarde). Os dois protocolos hormonais de IATF utilizados são ilustrados na Figura 1.



**Figura 1.** Diagrama esquemático de dois protocolos hormonais de IATF à base de progesterona. O protocolo BE com o benzoato de estradiol e o protocolo CE com o cipionato de estradiol, ambos utilizados para indução da ovulação. Fonte: Elaborado pelo autor.

No segundo lote, 30 búfalas foram divididas em GCE (14 vacas) e GBE (16 vacas) e submetidas à IATF utilizando os mesmos procedimentos descritos no primeiro lote, porém com um dispositivo intravaginal de progesterona previamente utilizado por nove dias. As inseminações foram realizadas por dois profissionais experientes usando sêmen congelado de um touro búfalo que possui fertilidade avaliada e garantida por uma central de coleta e comercialização de sêmen.

Para determinar o estro e avaliar a reação positiva ao efeito da terapia hormonal, no momento da inseminação (D11), foram utilizados os seguintes critérios nas 69 búfalas: presença de corrimento vaginal, o aumento do tônus uterino e a facilidade da passagem do aplicador de sêmen na cérvix.

#### 4.3. Avaliações Ultrassonográficas

Para avaliação da dinâmica folicular, tempo para a ovulação e taxa de ovulação, os folículos nos ovários de 11 búfalas por tratamento foram avaliados no D0 e D9 ao D12 (intervalo de 24 horas) por ultrassonografia (transdutor linear de 5.0 MHz, Mindray DP 2200 VET, China).

O intervalo de 24 horas usado para as avaliações ultrassonográficas da dinâmica folicular se deu devido as áreas extensas de várzea, que dificultaram a reunião do rebanho durante os dias do experimento. Além do mais, a estrutura alternativa de contenção fez com

que o tempo de permanência dos animais no curral fosse maior e para reduzir o estresse foi adotado o aumento de tempo das búfalas na pastagem, sendo realizado o manejo apenas uma vez ao dia.

#### **4.4. Análise Estatística**

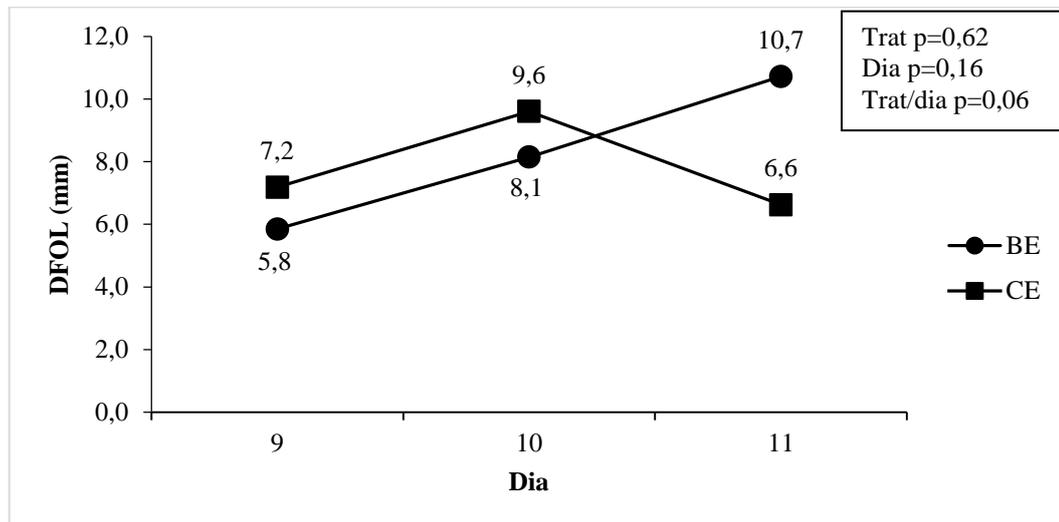
Todos os animais do experimento foram submetidos à ultrassonografia para diagnóstico de gestação com mais de 30 dias após a inseminação artificial.

O delineamento em blocos casualizados foi adotado para análise dos dados, utilizando como bloco o grupo simultâneo de IATF. O tempo para a ovulação foi analisado pelo procedimento MIXED e as variáveis taxa de ovulação, sinais do estro e taxa de prenhez foram analisadas pelo procedimento GLIMMIX (usando como opção a distribuição binominal). O tamanho do maior folículo foi analisado utilizando medidas repetidas no tempo através do procedimento MIXED, utilizando a matriz *compound symmetric*. Todos os dados foram analisados pelo programa estatístico SAS 9.3.

## 5. RESULTADOS

Após a implementação dos protocolos de sincronização de ovulação, o diâmetro folicular nas búfalas foi de  $10,15 \pm 1,00\text{mm}$ . As médias encontradas para os grupos CE e BE foram  $9,6 \pm 0,89\text{mm}$  e  $10,7 \pm 1,12\text{mm}$ , respectivamente. Na comparação entre os tratamentos não foi encontrada diferença significativa ( $P = 0,064$ ).

Não houve diferença significativa entre os grupos experimentais para as variáveis da taxa de ovulação, cada grupo apresentou uma taxa de ovulação de 90,9% ( $P = 1$ ). Uma diferença significativa no momento da ovulação (37,4h vs. 52,8h;  $P=0,001$ ) foi observada, para GCE e GBE, respectivamente, sendo observado um maior intervalo entre a remoção do dispositivo de P4 e o momento da ovulação no subgrupo BE em comparação ao subgrupo CE (Figura 2).



**Figura 2.** Diâmetro Folicular (mm) aferido por ultrassonografia no D9 ao D12 nos subgrupos das búfalas submetidas à indução da ovulação com CE ou BE.

Embora houvesse diferenças entre o momento da ovulação, ocorrendo entre o D10 e o D11 no GCE e com maior frequência entre o D11 e no D12 no GBE, a taxa de prenhez não teve uma diferença significativa entre os dois grupos. De 69 búfalas submetidos à inseminação artificial, resultaram em 42 vacas prenhes, com uma taxa de prenhez global de 60,86%. Ao considerar separadamente os dois protocolos diferentes para a sincronização da ovulação, a taxa de prenhez foi de 58,8% e 62,9% ( $P = 0,79$ ), para o GCE e GBE, respectivamente (Tabela 3).

**Tabela 3.** Taxa de prenhez (%) por exame ultrassonográfico após IATF das búfalas submetidas aos tratamentos de indução da ovulação com CE ou BE.

	Tratamento		Total
	GCE	GBE	
Nº	34	35	69
Nº de Fêmeas Prenhes	20	22	42
Taxa de Prenhez (%)	58,82	62,85	60,86

No D11 foram avaliados, durante a inseminação artificial, os sinais clínicos do cio (presença de corrimento vaginal, o aumento do tônus uterino e a facilidade da passagem do aplicador de sêmen na cérvix) não havendo diferença significativa entre os grupos experimentais (Tabela 4).

**Tabela 4.** Sinais Clínicos do Cio (%) no momento da IA das búfalas submetidas aos tratamentos de indução da ovulação com CE ou BE.

Sinais Clínicos do Cio (%)	Tratamento		Total
	GCE	GBE	
Presença de Corrimento Vaginal	32,4	51,4	41,9
Passagem pela Cérvix	91,2	91,4	91,3
Aumento do Tônus Uterino	94,1	91,4	92,7

Avaliando os custos da utilização do CE como indutor da ovulação verificou-se que o preço deste protocolo foi R\$0,65 centavos maior que o valor do protocolo de P4 que utiliza o BE como indutor da ovulação (Tabela 5).

**Tabela 5.** Custos (R\$) dos protocolos de IATF, que utilizaram o CE ou o BE como indutores da ovulação, por animal e por cada grupo dependendo da quantidade de animais que cada um possui.

Tratamento	Quantidade de Animais	Custos (R\$)	
		Protocolo/Vaca	Protocolo/Grupo
CE	34	29,93	1.017,64
BE	35	29,28	1.024,80

Os valores gastos com a mão-de-obra foram bem maiores na implantação da IATF que utilizou o protocolo de P4 com o BE como indutor da ovulação, já que 4 dias de manejo são necessários em comparação ao CE em que o protocolo de IATF é desenvolvido apenas em 3 dias de manejo. Neste experimento foram utilizadas a mão-de-obra de 4 vaqueiros por dia de manejo, custando a diária de cada um o valor de R\$45,00 (Tabela 6).

**Tabela 6.** Valores gastos (R\$) com a mão-de-obra (4 vaqueiros) para a realização da IATF com protocolos de P4 que utilizam CE e BE como indutores da ovulação, levanto em conta que o valor pago pela diária de um vaqueiro na região é de R\$45,00.

Tratamento	Quantidade de manejos	Custos (R\$)	
		Mão-de-obra/dia	Mão-de-obra/grupo
CE	3	180,00	540,00
BE	4	180,00	720,00

## 6. DISCUSSÃO

Carvalho et al. (2018) avaliou o efeito da administração do BE e do CE na indução e sincronização da ovulação de búfalas lactantes submetidas ao protocolo de IATF durante estação reprodutiva desfavorável, não encontrando diferença entre os grupos experimentais (GBE vs. GCE) para a variável de diâmetro do folículo ovulatório e a taxa de ovulação. No presente estudo foi encontrado padrão similar, mesmo sendo realizado em condições de ambiente e manejo totalmente diferentes.

Andrade et al. (2012) e Sales et al. (2012) não encontraram diferença significativa em relação ao diâmetro do folículo ovulatório e a taxa de ovulação entre os tratamentos que utilizaram BE e CE como indutores da ovulação em bovinos. Como observado nos estudos citados, tanto em bubalinos, como em bovinos, apresentando resultados similares ao presente estudo, à substituição do BE pelo CE como indutor da ovulação não compromete os índices reprodutivos do protocolo de P4.

O diâmetro do folículo ovulatório observado nas búfalas deste estudo ( $9,6 \pm 0,89\text{mm}$  vs.  $10,7 \pm 1,12\text{mm}$ ;  $P = 0,06$ ), nos grupos GCE e GBE respectivamente, diferenciaram dos encontrados por Carvalho et al. (2018) ( $13,4 \pm 0,5\text{mm}$  vs.  $13,0 \pm 0,5\text{mm}$ ;  $P=0,72$ ). Como observado em estudos realizados por Presicse et al. (2004), que encontrou o diâmetro do maior folículo com média de 11,0mm para vacas primíparas e 13,8mm para múltíparas, e por Gimenes et al. (2011), que destacou a aquisição da capacidade ovulatória em novilhas búfalas ocorrendo quando o diâmetro do folículo atinge 8,5mm de diâmetro, é possível concluir que diâmetro do folículo ovulatório encontrado no presente estudo pode estar relacionado a idade das búfalas utilizadas, que em sua maioria eram vacas primíparas.

Tal resultado também pode estar relacionado aos resultados do estudo realizado por Campanile et al. (2010), o qual observou que búfalas pós-parto que passaram por um equilíbrio energético negativo, tiveram ondas foliculares com folículos dominantes pequenos. Diferente dos trabalhos realizados em outras regiões, onde em muitas das vezes os animais são mantidos em um sistema intensivo de produção, sendo ofertadas dietas balanceadas e forragens com teor de PB acima de 9% durante todo o ano, no presente estudo aos animais foram ofertadas apenas extensas pastagens nativas de várzea, com predominância dos capins marreca (*Leersia hexandra* Sw.) e colônia (*Brachiaria mutica*), ambos apresentando teores de PB inferiores a 7%, resultados que são considerados por Mison (1990) como limitante à produção animal, por implicarem em menor consumo voluntário, redução na digestibilidade e balanço nitrogenado negativo. Contudo, os búfalos possuem uma eficiente conversão

alimentar quando comparados aos bovinos, permitindo que mantenham uma excelente produtividade em sistemas de criação limitantes (CARVALHO et al., 2010).

Do ponto de vista da produção pecuária mais intensificada, a baixa disponibilidade de forragem de baixo valor nutricional, bem como, ao regime de cheias e vazantes, são os principais fatores que limitam os sistemas pastoris em áreas de várzea (TOWNSEND et al., 2012). Entretanto, no período das vazantes dos rios, quando ocorreu o estudo, foi encontrada disponibilidade de forragem nessas áreas, que mesmo sendo pobre nutricionalmente quando comparada a outras forragens cultivadas, esteve presente em grandes quantidades garantindo que as búfalas apresentassem um ECC ideal ( $\geq 3$ ) para a realização da IATF, tornando viável esta biotécnica nas áreas de várzea. Estudos comprovam que o ECC influencia diretamente na taxa de prenhez, sendo considerado um ECC  $> 2,5$  o ideal para a realização da IATF com o alcance de taxas de prenhez de 50% (BARUSELLI, 2000).

No que se refere ao crescimento folicular, verificou-se maior taxa de crescimento folicular entre a administração de PGF2 $\alpha$  e a IATF em ambos os grupos, porém, resultados diferentes foram observados em relação ao momento da ovulação, onde neste estudo houve diferença significativa entre a remoção do dispositivo de P4 e o momento da ovulação entre os tratamentos CE e BE. Padrão similar em relação ao momento da ovulação foi encontrado em trabalho realizado com bovinos, onde maior intervalo entre a remoção do dispositivo de P4 e o momento da ovulação, foi observado com o uso do BE como indutor da ovulação (MARTINEZ et al., 2002). Carvalho et al. (2018) não encontrou diferença em relação ao momento da ovulação entre os tratamentos com BE e CE como indutores da ovulação.

Carvalho et al. (2018) observaram que a taxa de prenhez dos bubalinos apresentou uma menor taxa de concepção (36,2% vs. 49,5%;  $P=0,04$ ) para os animais do GBE em comparação ao GCE, respectivamente. Fato este que não ocorreu neste experimento, onde verificou-se ausência de diferença significativa entre os dois tratamentos. Taxas de prenhez elevadas foram encontradas em ambos os grupos, com índices superiores aos encontrados por Carvalho et al. (2018), que realizou seu trabalho em estação reprodutiva desfavorável na região Sudeste. Tal diferença pode estar relacionada pelas características climáticas da região Amazônica por não apresentar variações de fotoperíodo e os animais estarem no período em que o trabalho foi desenvolvido, em áreas de várzea e no período chuvoso, onde dificilmente iriam sofrer com estresse ambiental devido à abundância de água, alimento e sombra.

Em relação à reutilização dos implantes intravaginais de progesterona utilizadas no presente estudo, Monteiro et al. (2016), avaliando a reutilização dos implantes em vacas búfalas mostraram que o tratamento com um dispositivo novo ou usado de progesterona

durante a época de reprodução fornece controle suficiente de crescimento folicular para evitar ovulação prematura e assegurar respostas foliculares satisfatórias ao protocolo P4, não afetando a taxa de prenhez.

Neto et al. (2016) avaliou a correlação da IATF com a contratilidade uterina e a presença de muco no dia da inseminação em relação a taxa de prenhez de búfalas mestiças criadas em sistema extensivo em área de várzea no Estado do Amapá, em condições semelhantes ao do presente estudo. De acordo com esses autores, essas fêmeas foram submetidas a um protocolo a base de P4 e E2, sendo que 43,75% dos animais apresentaram muco, 97,9% das búfalas apresentaram útero contraído e a taxa de prenhez foi de 47,9%. A avaliação dos sinais clínicos do cio em búfalas, principalmente da contratilidade uterina, é considerada por Queiroz (2003), como um sinal significativo de reação positiva ao efeito da terapia hormonal. Avaliando estes sinais foi possível observar que os tratamentos com CE e BE apresentaram reação positiva ao tratamento hormonal, sendo observada a contratilidade uterina com maior frequência em ambos os tratamentos.

Apesar do custo do protocolo de IATF que utiliza o CE como indutor da ovulação ser mais elevado, cerca R\$0,65 por animal quando comparado ao protocolo que utiliza o BE, ele reduziu o número de manejo de 4 para 3, baixando o custo de implantação da IATF, como observado por Carvalho et al. (2018) em pesquisa realizadas com bubalinos e por Andrade et al. (2012) e Sales et al. (2012) em pesquisas realizadas com bovinos.

Estudos sobre a aplicação da técnica IATF com CE por implante vaginal de P4 na região amazônica é promissor, mas precisa ser estudado quanto a questão nutricional das fêmeas, principalmente no período de cheia da região. Os resultados obtidos indicam viabilidade, permitindo que pequenos e médios produtores possam acessar esse tipo de biotecnologia para melhorar a qualidade genética e a produção de bubalinos na região de Itacoatiara (AM).

## **7. CONCLUSÃO**

A implantação da IATF com o uso do cipionato de estradiol na indução da ovulação é promissora na região, pois com apenas três dias de manejo, seria facilitado o deslocamento do profissional e o manejo do rebanho em vista das dificuldades encontradas nas áreas de várzea da região, além da obtenção de grande lucro com a produção e venda de animais melhorados geneticamente.

A utilização do cipionato de estradiol comparado ao benzoato de estradiol é mais vantajosa visto que reduz o custo de implantação e obteve a mesma performance no protocolo de IATF.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI, A.; FAHMY, S. Ovarian dynamics and milk progesterone concentrations in cycling and non-cycling buffalo-cows (*Bubalus bubalis*) during Ovsynch program. **Theoriogenology**, v.68, p.23-28, 2007.

ANDRADE, B.H.A.; FERRAZ, P.A.; RODRIGUES, A.S.; LOIOLA, M.V.G.; CHALHOUB, M.; RIBEIRO FILHO, A.L. Eficiência do cipionato de estradiol e do benzoato de estradiol em protocolos de indução da ovulação sobre a dinâmica ovariana e taxa de concepção de fêmeas nelore inseminadas em diferentes momentos. **Archives of Veterinary Science**, v.17, n.4, p.70-82, 2012.

BARUSELLI, P. S.; MUCCIOLO, R. G.; VISITIN, J. A.; VIANA, W. G.; ARRUDA, R. P.; MADUREIRA, E. H.; OLIVEIRA, C. A.; MOLERO FILHO, J. R. Ovarian Follicular dynamics during the estrus cycle in buffalo (*Bubalus Bubalis*). **Theriogenology** v.47, p.1531-1547, 1997.

BARUSELLI, P. S.; MADUREIRA E. H.; BARNABE, R. C; BARNABE, J. A.; VISITIN, J. A.; OLIVEIRA C. A.; AMARAL, R. Follicular dynamic during the fixed time artificial insemination protocol in buffalo. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.2, 1999.

BARUSELLI, P. S. Controle Farmacológico do ciclo estral e da superovulação em bubalinos. **In: Simpósio sobre o controle do ciclo estral em ruminantes**. São Paulo: Fundação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/USP, p.332, 2000.

BARUSELLI, P. S.; BARNABE, V. H.; BARNABE, R. C.; MADUREIRA, E. H.; VISINTIN, J. A.; MOLERO-FILHO, J. R.; PORTO, R. Effect of body condition score at calving on postpartum reproductive performance in buffalo. **Buffalo Journal**, v. 1, p. 53-65, 2001.

BARUSELLI, P. S. et al. Synchronization of ovulation for fixed timed insemination in buffalo (*Bubalus bubalis*). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.40, p.431-442, 2003.

BARUSELLI, P.S.; CARVALHO, N.A.T. Manejo reprodutivo da búfala leiteira. **Revista de Ciências Agrárias** (Belém), v.45, p.1-23, 2006.

BARUSELLI, P.S.; CARVALHO, N.A.T.; GIMENES, L.U.; CREPALDI, G.A. Fixed-time artificial insemination in buffalo. **Italian Journal of Animal Science**, v. 6, p.107-1118, 2007.

BARUSELLI, P.S.; CARVALHO, N.A.T.; JACOMINI, J.O. Eficiência do uso da Inseminação Artificial em Búfalos. **Revista Brasileira de Reprodução**, v.6, p.104-110, 2009.

BEARDEN, H.J.; FUQUEY, J.W.; WILLARD, S.T. **Applied Animal Reproduction**. Sixth Edition. Pearson Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey, NY, U.S.A., 2004.

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

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

BHALARU, S.S.; TIWANA, M.S.; SINGH, N. Effect of body condition at calving on subsequent reproductive performance in buffaloes. **Indian Journal of Animal Science**, v.57, p.33-36, 1987.

BORGES, A.M. **Influência de diferentes manejos e tratamentos hormonais na dinâmica ovariana durante o ciclo estral e no anestro pós-parto de vacas Gir e Nelore**. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2017. **Rebanho Bubalino Brasileiro: efetivo por Estado**. Disponível em: [www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br). Em: 10 set. 2018.

CAMARGO JÚNIOR, R.N.C.; MARQUES, J.R.F.; MARCONDES, C.R.; ARAUJO, C.V.; AGUIAR, J.F.; MARQUES, L.C.; RODRIGUES, A.E. Índices de eficiência reprodutiva de búfalos da Amazônia Oriental do Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.64, n.4, p.796-803, 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.; BERNARDES, O.; BARUSELLI, P.S. Desestacionalização dos partos para a produção de leite de búfalas a pasto no centro sul do Brasil. **Pesquisa e Tecnologia**, v.8, p.1-5, 2011.

CARVALHO, N.A.T.; SOARES, J.G.; SOUZA, D.C.; MAIO, J.R.G.; VANDAS, 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. **Reproduction Animal**, v.9, p.523, 2016.

CARVALHO, N.A.T.; SOARES, J.G.; BARUSELLI, P.S. Evolution and perspectives of timed oficial insemination (TAI) programs in Brazil. **The Indian Journal of Animal Reproduction**, p.1-8, 2017.

CARVALHO, N.A.T.; CARVALHO, J. G. S; SALES, J. N. L; KRUGUER, A. M.; GUERREIRO, B. M.; FREITAS, B. G.; BARUSELLI, P. S. Ésteres de estradiol na indução e sincronização da ovulação de búfalas leiteiras submetidas ao protocolo de IATF durante a estação reprodutiva desfavorável. **Anais da XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões Florianópolis**, 2018.

CASSIANO, L.A.P.; MARIANTE, A.S.; MCMANUS, C.; MARQUES, J.R.F.; COSTA, N.A. Caracterização fenotípica de raças bubalinas nacionais e do tipo Baio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, p.1337-1342, 2003.

CASSIANO, L.A.P.; MARIANTE, A.S.; MCMANUS, C.; MARQUES, J.R.F.; COSTA, N.A. Parâmetros genéticos das características produtivas e reprodutivas de búfalos na Amazônia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.5, p.451-457. 2004.

CHAIKUM, T.; THARASANIT, T.; RATTANATEP, F.; DE RENSIS. Fertility of swamp buffalo following the synchronization of ovulation by the sequential administration of GnRH and PGF2alpha combined with fixed-timed artificial insemination. **Theriogenology**, v.74, p.1371-1376, 2010.

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

DISKIN, M.G. Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. **Animal Reproduction Science**, v.78, n.03/04, p.345-370, 2003.

DROST, M. Advanced reproductive technology in the water buffalo. **Theriogenology**, v.68, p.450-453, 2007.

FERREIRA, E.M.; VIREQUE, A.A.; ADONA, P.R.; MEIRELES, F.V.; FERRIANE, R.A.; NAVARRO, P.A.A.S. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, v.71, p.836-848, 2009.

FORDE, N.; BELTMAN, M.E.; LONERGAN P.; DISKIN, M.; ROCHE, J.F.; CROWE, M.A. Oestrous cycles in *Bos taurus* cattle, **Animal Reproduction Science**, v.124(3-4), p.163-169, 2011.

GARCIA, A.R. Influência de fatores ambientais sobre as características reprodutivas de búfalos do rio (*Bubalus bubalis*). **Revista de Ciências Agrárias**, v.45, 2006.

GIMENES, L.U.; CARVALHO, N.A.T.; SÁ FILHO, M.F.; VANNUCCI, F.S.; TORRES JUNIOR, J.R.S.; AYRES, H.; FERREIRA, R.M.; TRINCA, L.A.; SARTORELLI, E.S.; BARROS, C.M.; BELTRAN, M.P.; BISINOTTO, E.S.; NOGUEIRA, G.P.; BARUSELLI, P.S. Ultrassonografic 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.

LOURENÇO JUNIOR, J.B. Produção de búfalos na Amazônia. In: Simpósio do núcleo de estudos em Bovinocultura, II., 2005, Seropédica. **Anais..** Rio de Janeiro: Instituto de Zootecnia da UFRURALRJ, V. 1, p.207-226, 2005.

KUMAR, P.R.; SINGH, S.K.; BEHERA, B.K.; KUMAR, H. Anestrus in cattle and buffalo: Indian perspective. **Anim. Vet. Sci.** Vol. 2. p.124-138, 2014.

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

MARTÍNEZ, M.F.; COLAZO, M.G.; KASTELIC, J.P.; MAOLETOFT, R.J. Effects of estradiol-17 $\beta$  or estradiol benzoate on follicular dynamics in CIDR-B-treated beef heifers. **Theriogenology**, v.57, n.1, p.382, 2002.

MARCONDES, C.R.; MARQUES, J.R.F.; COSTA, M.R.T.R. **Programa de pesquisas da EMBRAPA Amazônia Oriental para melhoramento genético de búfalos.** Brasília; EMBRAPA. 31p, 2007.

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*). **Elsevier**, v.177, p.153-159, 2012.

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

MONTEIRO, B.M.; DE SOUZA, D.C.; CORREA, T.B.; VECHIO, D.; CARVALHO, N.A.T.; BARUSELLI, P.S. 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(1), p.13–20, 2016.

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

NETO, A.C.; SILVA, G.A.L.; LIMA, W.F.; MACEDO, M.B.; CARVALHO, L.C.; OHANA, J.; RIBEIRO, H.F.L.; ROLIM FILHO, S.T.; Perfil da Inseminação artificial em tempo fixo, presença de muco e o status uterino correlacionado com a taxa de prenhez em vacas bubalinas no estado do Amapá. Congresso Norte-Nordeste de Reprodução Animal (VIII CONERA), 8, 2016, Teresina, PI. **Anais...** Belo Horizonte: CBRA, 2016.

PALHÃO, M.P.; PIEDADE, C.S.; ARAÚJO, H.L.; FERNANDES, C.A.C.; GUIMARÃES, C.R.B.; RIBEIRO, J.R.; REIS, W.S.M.; VIANA, J.H.M. Sincronização folicular e vascularização do folículo dominante em novilhas mestiças tratadas com estradiol. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.21, n.2, p.117-121, 2014.

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. Reproductive cycles of buffalo. **Animal Reproduction Science**, v.124, p.194-199, 2011.

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

PRESICCE, G.A.; BELLA, A.; TERZANO, G.M.; DE SANTIS, G; SENATORE, E.M. Postpartum ovarian follicular dynamics in primiparous and pluriparous Mediterranean Italian buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, v. 63, n.5, p.1430–1439, 2004.

QUEIROZ, A.C.L. Sincronização do ciclo estral e inseminação artificial em tempo fixo em búfalas criadas em várzea no município de Santarém-Pará. 2003. 125f. Especialização

(Especialização em Produção e Sanidade Animal) – **Centro de Produção e Sanidade Animal, Universidade Federal Rural da Amazônia – UFRA**, 2003.

QURESHI, M.S.; HABIB G.; SAMAD, H.A.; AHMAD, N.; SYED, M. Reproduction nutrition relationship in dairy buffaloes. Effect of intake of protein, energy and blood metabolites levels Asian. **Australasian Journal of Animal Sciences**. v.15, p.330-339, 2002.

RIBEIRO NETO A. C.; BARBOSA, S. B. P.; PEREIRA, R. G. de A.; LOPES, C. R. de A.; REZENDE, F. M. de. Sazonalidade de partos em búfalas mestiças das raças Murrah x Mediterrâneo no estado de Rondônia. In: ZOOTEC 2006, 2006, Recife. **Anais...** Recife: 2006. CD-ROM, 2007.

ROLIM FILHO, S.T. **Aspectos da eficiência reprodutiva de bubalinos criados em sistema misto (várzea e terra firme) em Belém**. 2006. 87f. Dissertação (Mestrado). Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Pará, Universidade Federal Rural da Amazônia, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2006.

ROELOFS, J. B.; GRAAT, E.A.M.; MULLAART, E.; SOEDE, N.M.; KEMP, B. Effects of insemination-ovulation interval on fertilization rates and embryo characteristics in dairy cattle. **Theriogenology**, v. 66, p.2173-2181, 2006.

SALES, J.N.S.; CARVALHO, J.B.P.; CREPADI, G.A.; CIPRIANO, R.S.; JACOMINIA, J.O.; MAIO, J.R.G.; SOUZA, J.C.; NOGUEIRA, G.P. ; BARUSELLI, P. S. Effects of Two Estradiol Esters (Benzoate and Cypionate) on the Induction of Synchronized Ovulations in *Bos indicus* Cows Submitted to a Time Artificial Insemination Protocol. **Theriogenology**, v.78, p.510–516, 2012.

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

SINGH, J.; BALHARA, A. K. New approaches in buffalo artificial insemination programs with special reference to India. **Theriogenology**, v.86, p.194-199, 2016.

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. **In: 29<sup>th</sup> Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE)**. Animal Reproduction, Gramado, RS, Brazil, p.629, 2015.

TANEJA, M.; ALI, A.; SINGH, G. Ovarium follicular dynamic in water buffalo. **Theriogenology**, v.46, p.121-130, 1996.

TORRES, J.A.P.; LÓPEZ, J.R.A.; CASTRO, F.G.C.; MONFORTE, J.G.M. Comparación del ciproionato de estradiol vs benzoato de estradiol sobre La respuesta a estro y tasa de gestación em protocolos de sincronización com cidr em novillas y vacas *Bos indicus*. **Universidad y Ciencia**, v.26, n.2, p.163-169, 2010.

TOWNSEND, C. R.; COSTA, N. L.; PEREIRA, R. J. A. **Pastagens Nativas da Amazônia**. EMBRAPA, doc.149, 2012.

WARRIACH, H. M.; MCGILL, D; BUSH, R.D.; WYNN, P.C. Production and reproductive performance of Nili-Ravi buffalo under field conditions of Pakistan. **Journal of Animal and Plant Sciences**, p.121-124, 2012.

VALE, W. G.; OHASHI, O. M.; SOUZA, J. S.; RIBEIRO, H. F. L. Studies on the reproduction of water buffalo in the Amazon basin. In: **Livestock Reproduction Latin America**. Viena: Joint FAO-IAEA division of nuclear techniques in food and agriculture, p.201-210, 1990.

VALE, W.G. Problemas de reprodução em fêmeas bovinas e bubalinas de leite criadas nos trópicos. **Revista Brasileira de Reprodução**, v.21, n.3, p.70-76, 1997.

YOTOV, S.; ANATOLI, A.; YORDANKA, I. Therapy of ovarian inactivity in postpartum Bulgarian Murrah buffaloes by PRID and Ovsynch estrus synchronization protocols. **Asian Pacific Journal of Reproduction**, p.293-299, 2012.

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