



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM REPRODUÇÃO ANIMAL -
REPROAMAZON
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ**

RAMON BARROS CUNHA

**INFLUÊNCIA DA IRRIGAÇÃO E DIÂMETRO DO FOLÍCULO PRÉ-
OVULATÓRIO NA TAXA DE PREENHEZ EM BÚFALAS LEITEIRAS**

BELÉM- PA

2022

RAMON BARROS CUNHA

**INFLUÊNCIA DA IRRIGAÇÃO E DIÂMETRO DO FOLÍCULO PRÉ-
OVULATÓRIO NA TAXA DE PREENHEZ EM BÚFALAS LEITEIRAS**

Dissertação de Mestrado apresentado junto ao programa de pós-graduação Reproamazon da Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA) e Universidade Federal do Pará (UFPA) como requisito para obtenção do título de Mestre em Reprodução Animal. Área de Concentração: **Reprodução Animal.**

**Orientador: Haroldo Franciso
Lobato Ribeiro**

BELÉM-PA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Bibliotecas da Universidade Federal Rural da Amazônia
Gerada automaticamente mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

D111i da Cunha, Ramon Barros da Cunha
INFLUÊNCIA DA IRRIGAÇÃO E DIÂMETRO DO FOLÍCULO PRÉ-OVULATÓRIO NA TAXA DE
PRENHEZ EM BÚFALAS LEITEIRAS / Ramon Barros da Cunha da Cunha. - 2022.
42 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado) - Programa de PÓS-GRADUAÇÃO em Reprodução Animal na AMAZÔNIA
(ReproAmazon), Campus Universitário de Belém, Universidade Federal Rural Da Amazônia, Belém,
2022.

Orientador: Prof. Dr. Haroldo Francisco Lobato Ribeiro Lobato Ribeiro
Coorientador: Prof. Dr. Sebastião Tavares Rolim Filho.

I. Reprodução animal. I. Lobato Ribeiro, Haroldo Francisco Lobato Ribeiro, *orient.* II. Título

CDD 573.6

RAMON BARROS DA CUNHA

**INFLUÊNCIA DA IRRIGAÇÃO E DIÂMETRO DO FOLÍCULO PRÉ-
OVULATÓRIO NA TAXA DE PREENHEZ EM BÚFALAS LEITEIRAS**

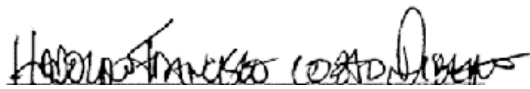
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação – ReproAmazon da
Universidade Federal Rural da Amazônia para a obtenção do título de Mestre em
reprodução animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

05 de agosto de 2022

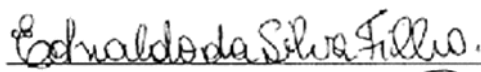
Data da Aprovação

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Haroldo Francisco Lobato Ribeiro (Orientador)

Universidade Federal Rural da Amazônia



Prof. Dr. Ednaldo da Silva Filho

Universidade Federal Rural da Amazônia



Prof. Dr. William Gomes Vale

Professor visitante

Universidade Federal do Ceará

DEDICATÓRIA

A meus preceptores Maria do Livramento Oliveira Barros e Jose Sampaio da Cunha Filho

A todos os meus irmãos Emerson Vasco, Maxwell Barros, Matheus Barros, Gustavo Carvalho e Guilherme Carvalho

Aos meus avós in memoriam Lezenita da Cunha, Jose Sampaio e Albeniza Barros

Aos meus verdadeiros amigos que tens sido a minha segunda família pelo amor, ajuda, compreensão, força e incentivos dados a mim todos os dias.

A minha família pelo amor incondicional e por sempre acreditarem em mim. Muito do que sou hoje devo a vocês

Cordialmente, Ramon da cunha

AGRADECIMENTOS

Enfim, esse grande dia chegou, começo minhas gratulações, agradecendo a Deus por colocar a minha frente de grandes batalhas diárias, pois elas sempre me fizeram crescer como pessoal e como profissional, **obrigado meu Deus.**

A minha **mãe (Maria)**, quem foi, é e sempre será minha fonte de inspiração, hoje sou meramente um reflexo de todos seus ensinamentos, **pai (Sampaio)**, obrigado por ser esse exemplo de homem de garra, batalhador, aos irmãos (**Emerson, Maxwell, Matheus, Gustavo e Guilherme**) AMO TODOS VOCÊS, gratidão também a meu padrasto (**Luciano**) e madrasta (**Elizete**), vocês também fazem parte desse pequeno passo, meu **MUITO OBRIGADO.**

Aos meus tios, sendo impossível mencionar a todos, meu muito obrigado, porém cabe dois em especial minha **tia (Leilma)** e **tio (Daniel)**, sendo responsáveis em me ajudar no momento mais difícil de minha vida, o início de curso cedendo hospedagem, alimentação além disso carinho e força, é indescritível a gratidão que tenho a vocês meus tios, hoje já concluindo essa dissertação vossa impotência ainda é extrema.

Ao **Setor de Reprodução Animal- SRA**, minha casa desde sempre, afinal 7 anos não são 7 dias, obrigado a todos integrantes.

Ao Médico Veterinário e amigo **Wilton Lima**, por ter possibilitado a realização deste experimento em uma fazenda comercial de sua jurisdição, muito obrigado meu amigo.

Aos funcionários da fazenda comercial e ao seu proprietário, por toda ajuda.

Aos amigos de PPG, pela parceria, amizade e troca de conhecimentos.

Aos professores que contribuíram nesta etapa, em especial aos meus orientadores **Haroldo e Seba**, que já me aturam a 7 anos, nunca mediram esforços para contribuir, obrigado professores pela amizade e todo conhecimento repassado.

RESUMO

Este trabalho teve a finalidade de avaliar a influência da irrigação e diâmetro do folículo pré-ovulatório na taxa de prenhez em búfalas leiteiras submetidas a inseminação artificial em tempo fixo. Foram utilizadas 151 búfalas leiteiras multíparas com mais de 30 dias paridas com idade entre 4 e 8 anos. O protocolo de sincronização D0 as búfalas receberam dispositivo intravaginal contendo 1g de P4 (Primer®, Agener União Química), aplicação de 2,0mg de BE (Fertilcare Sincronização®, MSD Saúde Animal) as 16h. No D9 também as 16h, foi realizado remoção do dispositivo, aplicação de 0,265 mg de closprostenol sódico (Ciosin®, MSD Saúde Animal) e 300 UI de eCG (Folligon®, Intervet International) via i.m. No D11 às 16h foi administrado 0,1 mg de GnRH (Fertagyl®, Intervet International) via i.m. No D12, 16 horas após a aplicação de GnRH (às 08h) no momento da inseminação os animais foram avaliados quanto ao diâmetro do folículo e seu grau de irrigação, por ultrassonografia transretal usando um ultrassom bidimensional com Doppler (Chison Eco Vet, Pequim, China) equipado com um transdutor micro convexo multi-frequencial, na qual foram feitas avaliação bidimensional e Color-Doppler, sendo posteriormente avaliados as imagens através de um software o fluxo sanguíneo e tecido associado para calcular o índice de vascularização. A taxa de prenhez geral foi de 32,45% (49/151). Os folículos de área menor, (99.01 ± 16.18 mm), correlacionaram-se as fêmeas gestantes, enquanto nas fêmeas não gestantes a área dos folículos mostrou-se maior (117 ± 46.17 bmm) ($P < 0,05$). A média e o desvio padrão das demais variáveis estudadas, mostram-se menores nas búfalas gestantes, em relação as medias e desvio padrão nas búfalas não gestantes. Entretanto, destacamos a percentagem de perfusão vascular (vascularização visual) para búfalas gestantes ($19.04 \pm 5.2\%$ a) e não gestantes ($56.57 \pm 9.95\%$ b) ($P < 0,05$), as demais variáveis, como distância Fol/largura (mm), distância Fol/altura(mm), perímetro do Fol (mm) e área da parede + Fol (mm) não obtivemos diferença estatística ($P > 0,05$). Podemos concluir que o Doppler colorido é o instrumento indicador, de grande precisão à deficiência de vascularização do folículo pré-ovulatório, bem como também, pela área dos folículos maiores, que nem sempre a maior área, se relaciona a predizer a fertilização.

Palavras-Chaves: Ultrassonografia doppler, prenhez, bubalinos

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the influence of irrigation and preovulatory follicle diameter on pregnancy rate in dairy buffaloes submitted to fixed-time artificial insemination. A total of 151 multiparous dairy buffaloes with more than 30 days of partum were used, aged between 4 and 8. The D0 synchronization protocol, the buffaloes received an intravaginal device containing 1,0g of P4 (Primer®, Agener União Química), application of 2.0mg of BE (Fertilcare Sincronização®, MSD Saúde Animal) at 16:00h. On D9, also at 16:00, the device was removed 0.265 mg of closprostenol sodium (Ciosin®, MSD Saúde Animal) and 300 IU of eCG (Folligon®, Intervet International) were applied via im. On D11 at 4 pm, 0.1 mg of GnRH (Fertagyl®, Intervet International) was administered i.m. On D12, 16 hours after the application of GnRH (at 8:00 am), at the time of insemination, the animals were evaluated for follicle diameter and its degree of irrigation, by transrectal ultrasound using a two-dimensional Doppler ultrasound (Chison Eco Vet, Beijing, China) equipped with a multi-frequency microconvex transducer, in which two-dimensional and Color-Doppler evaluation were performed, and the images were later evaluated through a software, the blood flow and associated tissue to calculate the vascularization index. The overall pregnancy rate was 32.45% (49/151). Smaller area follicles (99.01 ± 16.18 mm) were correlated with pregnant females, while in non-pregnant females the area of follicles was greater (117 ± 46.17 bmm) ($P < 0.05$), and the images were later evaluated through a software, the blood flow and associated tissue to calculate the vascularization index. The overall pregnancy rate was 32.45% (49/151). Smaller area follicles (99.01 ± 16.18 mm) were correlated with pregnant females, while in non-pregnant females the area of follicles was greater (117 ± 46.17 bmm) ($P < 0.05$). The mean and standard deviation of the other variables studied are shown to be smaller in pregnant buffaloes, in relation to the means and standard deviation in non-pregnant buffaloes. However, we detach the percentage of vascular perfusion (visual vascularization) for pregnant ($19.04 \pm 5.2\%$ ^a) and non-pregnant ($56.57 \pm 9.95\%$ ^b) buffaloes ($P < 0.05$), the other variables, such as Fol/width distance (mm), Fol/height distance (mm), Fol perimeter (mm) and wall area + Fol (mm) we did not obtain statistical difference ($P > 0.05$). We can conclude that the color Doppler is the indicator instrument, of great precision to the deficiency of vascularization of the pre-ovulatory follicle, as well as, by the area of the largest follicles, which not always the largest area, is related to predicting fertilization.

Keywords: Doppler ultrasound, pregnancy, buffaloes

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
Figura 01. Localização da propriedade próxima a PA- 324, Nova Timboteua- Pará.	27
Figura 02. Modificações do fluxo sanguíneo na parede do folículo pré-ovulatório	29

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 01. Taxa de prenhes em 151 búfalas de acordo com o protocolo de quatro manejos e a inseminação em tempo fixo.	29
Tabela 02. Média e desvio padrão da área (maior e menor) de folículos pré-ovulatório e sua correlação à taxa de prenhes.	30
Tabela 03. Média e desvio padrão da distância, perímetro, área da parede e coroa, perímetro da coroa e perfusão vascular dos folículos pré-ovulatório e sua correlação à taxa de prenhe	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BE	Benzoato de Estradiol
CL	Corpo Lúteo
D0	Dia Zero
D9	Dia Nove
D11	Dia Onze
D12	Dia Doze
DG	Diagnóstico de Gestação
eCG	Gonadotrofina Coriônica Equina
FD	Folículo Dominante
FAO	Food and Agriculture Organization
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofinas
IA	Inseminação Artificial
IATF	Inseminação Artificial em Tempo Fixo
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IM	Intramuscular
DP	Desvio padrão
FOL	Folículo
FD	Folículo dominante

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	13
I- OBJETIVOS.....	16
2.1 Objetivo geral	16
2.2. Objetivos Específicos	Erro! Indicador não definido.
II- REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1-O BÚFALO	17
3.2- O búfalo no brasil.....	17
3.3- O búfalo na Amazônia.....	18
III- FISIOLOGIA DO CICLO ESTRAL DA BÚFALA (CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS DA ESPÉCIE).....	18
IV- INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO	20
5.1-Uso do protocolo à base de Gn _{rh} +pgf ₂ +Gn _{rh} (OVSYNCH).....	Erro! Indicador não definido.
5.2-Uso do protocolo à base de progesterona e estradiol (P4/E2).....	21
V- ANGIOGÊNESE FOLICULAR.....	21
6.1- ALTERAÇÕES DO FLUXO SANGUÍNEO DURANTE O CRESCIMENTO FOLICULAR.....	22
6.1.1- FATORES PRO-ANGIOGENICOS DE CRESCIMENTO FOLICULAR	23
6.1.2- MODIFICAÇÕES DO FLUXO SANGUÍNEO NA OVULAÇÃO	24
VI- HEMODINÂMICA FOLICULAR	24
VIII-ULTRASSONOGRAFIA DOPPLER.....	25
IX-MATERIAL E MÉTODOS	26
9.1-Local e amostra	26
9.2-Animais	27
9.3-Protocolo de sincronização para IATF.....	27
9.4-Ultrassonografia e avaliação do fluxo sanguíneo.....	27

X-ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	28
XI-RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
11.1- Taxa de prenhez	28
11.2- Área do Folículo dominante e taxa de prenhes	29
11.3- Outras variáveis mensuradas.....	30
XII- CONCLUSÃO.....	32
XIII- REFERÊNCIAS BIBIOGRAFICAS	33

*Se quer ir rápido, vá sozinho. Se
quer ir longe, vá acompanhado*

Provérbio Africano

INTRODUÇÃO

Nos últimos dez anos, a taxa de crescimento do rebanho bubalino mundial foi de 14,1%, enquanto a produção de leite aumentou 24,5% nesse mesmo período (FAO, 2015). Atualmente aproximadamente 200 milhões de cabeças de búfalos no mundo, as quais, são responsáveis pela produção anual de 97,5 milhões de toneladas de leite (FAO, 2015).

No Brasil, reporta-se 10,2% de crescimento do rebanho bubalino, na última década (FAO, 2015). Na atualidade, estima-se que o rebanho nacional esteja em torno de 1.332.284 búfalos, distribuídos por todos os estados do Brasil (FAO, 2015).

Entretanto, como ocorre nas demais espécies de interesse zootécnico, o crescimento do rebanho bubalino deve estar associado ao controle da produtividade. Com o auxílio de biotecnologias da reprodução é possível multiplicar e distribuir animais que possuem elevado mérito genético, colaborando para que a atividade se torne cada vez mais atraente sob os pontos de vista econômico e social.

Na Amazônia mais precisamente na Ilha do Marajó a bubalinocultura tem movimentado a economia local da ilha, estando presente na produção de carne, leite, couro, no transporte de cargas e na fabricação de queijo. Segundo Bernardes (2007), a partir da década de 80 a produção de leite teve um crescimento expressivo devido ao alto valor biológico do leite, favorecendo a indústria com maiores rendimentos na produção de derivados lácteos, agregando valor ao produto final, despertando interesse de diversos laticínios.

Atualmente, o melhoramento genético bubalino une esforços entre associações de criadores, universidades e institutos de pesquisa. Neste sentido surge um Convênio Programa de Melhoramento Genético Bubalino/UFRA e FAPESPA, respectivos parceiros para desenvolver pesquisa agropecuária, difusão e Transferência de Tecnologia (TT). O programa visa a disseminação da variabilidade de material genético, através do uso de tecnologia de ponta como Inseminação Artificial em Tempo Fixo-IATF e Produção in vitro de embriões, promovendo assim o melhoramento genético e aumento da produtividade.

Para facilitar o manejo e aumentar a eficiência da IA foram desenvolvidos protocolos que dispensam a necessidade de detecção do estro. O uso destes protocolos tem colaborado para a difusão da técnica de IA em diversos rebanhos no Brasil e no

mundo, possibilitado o melhoramento genético, com consequente aumento nas produções de carne e de leite (BARUSELLI et al. 2009).

Entretanto para o sucesso da IATF depende da sincronização da IA com o horário da ovulação, vários estudos têm sido realizados para determinar o melhor momento para inseminar e obter melhores taxas de concepção.

Uma forma de determinar o momento mais adequado para inseminar é fazendo o acompanhamento da hemodinâmica folicular utilizando a ferramenta Doppler, pois se sabe que o pico máximo de perfusão do folículo precede a ovulação (MENEGETTI et al., 2009) em 12 horas. Segundo (SCALIANTE et al., 2015) há uma clara diferença na vascularização da parede de folículos pré-ovulatórios em comparação com a de folículos anovulatórios (ACOSTA et al., 2003).

Com o acompanhamento da circulação do folículo no momento da IATF pode ser possível relacionar a perfusão sanguínea folicular com tamanho e taxa de prenhez. Portanto a ultrassonografia doppler pode ser uma ferramenta importante para melhorar índices de programas de IATF e para validação de protocolos de sincronização de ovulação.

A atividade ovariana é caracterizada pela alternância de fases de crescimento e de regressão, as quais envolvem as estruturas foliculares. Estas modificações cíclicas requerem angiogênese contínua (FRASER E LUNN, 2001). Os principais fatores pró-angiogênicos incluem o fator de crescimento de fibroblastos 2 (FGF2), a família dos fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF), o sistema angiopoietina (ANGPT) e a família dos fatores de crescimento endotelial vascular (VEGF), sendo que o subtipo A (VEGFA). (revisado por ROBINSON et al., 2009). As células da granulosa representam a principal fonte de fator angiogênico do folículo. Sabe-se que um folículo dominante possui maior vascularização tecal e suprimento sanguíneo do que os folículos subordinados. (ZELEZNIK et al., 1981; REDMER E REYNOLDS, 1996) e que a diminuição da vascularização no futuro folículo subordinado começa antes da diminuição da taxa de crescimento folicular.

O folículo dominante poderá alcançar o *status* pré-ovulatório e culminar com a ovulação. Isto ocorre como resultado da interação dinâmica entre o hormônio luteinizante (LH) e fatores foliculares locais, os quais promovem complexas mudanças estruturais e funcionais. Neste momento, ocorre alteração no fluxo sanguíneo na parede do folículo pré-ovulatório, aumento na concentração de estradiol plasmático e folicular,

bem como de substâncias vasoativas. A transição folicular-luteal é um processo dinâmico, o qual envolve a diferenciação das células da teca e da granulosa em células lúteas. A perfusão vascular dos ovários e folículos, avaliada por ultrassonografia com Doppler colorido, é um indicador do potencial para o sucesso de programas de reprodução em animais de produção. A maior vascularização do folículo pré-ovulatório tem sido associada com o aumento do diâmetro do folículo em éguas (SILVA et al., 2006) e em novilhas (SIDDIQUI et al., 2009).

Desta forma o objetivo desse estudo foi avaliar a perfusão sanguínea e diâmetro de folículo pré ovulatório no momento da IATF e correlacioná-los a taxa de prenhes.

I- OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Caracterizar, com o Ultrassom Color-Doppler, as modificações do fluxo sanguíneo do folículo dominante, na IATF de búfalas (*Bubalus Bubalis*) leiteiras.

2.2. Objetivos Específicos

2.2.1 Caracterizar as modificações de fluxo sanguíneo do folículo dominante selecionado em búfalas leiteiras submetidas a protocolo de inseminação artificial em tempo fixo.

2.2.2- Correlacionar o grau de perfusão sanguínea do folículo dominante com a taxa de prenhes no momento da inseminação artificial em Búfalas leiteiras.

2.2.3-Correlacionar o diâmetro do folículo dominante com a taxa de prenhes no momento da inseminação artificial em Búfalas leiteiras.

II- REVISÃO DE LITERATURA

Serão abordados nesta revisão de literatura um breve histórico do búfalo doméstico (*Bubalus Bubalis*), bem como fisiologia reprodutiva desses animais e suas particularidades. Por fim o uso da Inseminação Artificial em Tempo Fixo em Búfalas leiteiras, além de uso e funções das ferramentas de ultrassonografia doppler correlacionados a programa reprodutivos.

3.1-O BÚFALO

O búfalo doméstico pertence a espécie *Bubalus bubalis*, de origem asiática, mais precisamente na Índia, com localização geográfica entre os paralelos 2° Sul e 31° Norte da linha equatorial, abrangendo zonas tropical e temperada, classificados dentro da família *Bovidae* e subfamília *Bovinae*. Por consequência de sua origem os búfalos se adaptam bem a todas as condições climáticas e geológicas típicas destas regiões, é um animal conhecido desde 60.000 anos a.C., fato comprovado por escavações arqueológicas. Sua domesticação é datada de 3.000 anos a.C., no Vale dos Indus e na região de Ur, entre os rios Tigre e Eufrates (ZAVA, 1984; BASTIANETTO, 2009; VILELA E SANTINI, 2010).

No Brasil, os búfalos chegaram no século XIX, originários da Ásia, Europa (Itália) e Caribe, e foram introduzidos inicialmente na região norte, na ilha de Marajó, no estado do Pará, e depois se expandiram por todo território nacional. Inicialmente esta espécie foi introduzida no país apenas por interesse dos pecuaristas pelo seu exotismo. Anos depois, as boas características produtivas deste animal, tais como adaptação e tolerância ambiental, elevada fertilidade, baixo índice de mortalidade entre outras, fez com que este rebanho, que não passava de 200 animais, resultasse em um plantel de 495 mil búfalos em 1980, com um crescimento médio anual de 10,80% entre os anos de 1961 e 1980. (JORGE et al., 2002; BERNARDES et al., 2007; BASTIANETTO, 2009)

Atualmente a população de búfalos no mundo totaliza 195.257.162 milhões de animais, que estão distribuídos geograficamente na seguinte proporção; 189.729.540 milhões na Ásia (97,2%), 3.800.025 milhões na África (1,95%), 1.283.860 milhões (0,66 %) na América, 210 na Austrália (0,00 %) e 380.527 na Europa (0,19%); (FAO, 2014).

3.2- O búfalo no Brasil

Atualmente, o rebanho bubalino no Brasil é de aproximadamente 1,26 milhões de cabeças, sendo o maior rebanho da América, estando distribuído da seguinte maneira: na Região Norte concentra-se o maior rebanho nacional com 808.883 cabeças (64,09%), seguida das Regiões Sudeste 144.986 (11,48%), Nordeste com 122.263 (9,68%), Sul com 113.192 (8,96%) e Centro-Oeste com 72.598 (5,75%), sendo que o estado do Amapá é o segundo maior rebanho

nacional, com 254.046 (18,4%) cabeças, ficando apenas atrás do Pará que possui 454.079 (38,0%), (IBGE, 2014; LAZZARI, 2012).

No Brasil, são registrados animais de quatro raças oficialmente reconhecidas pela Associação Brasileira de Criadores de Búfalos (ABCB): Carabao, Jafarabadi, Mediterrâneo e Murrah. A terceira é de origem italiana e as demais são de origem asiática (VILELA e SANTINI, 2010).

A recente introdução dos búfalos no Brasil reflete em um rebanho ainda em formação, o que tem despertado crescente interesse dos criadores e dos órgãos de pesquisa, no sentido de oferecer nova alternativa para a pecuária (JORGE et al., 2002).

Porém, é observado, que os búfalos foram e ainda são criados de maneira extensiva no nosso país, em solos e pastagens de baixa qualidade, o que leva a uma seleção natural dos animais de melhor adaptabilidade quanto à conversão deste tipo de alimento. Os búfalos possuem uma melhor eficiência na conversão de alimentos de baixo valor nutricional quando comparado aos bovinos apresentando ganho de peso e desempenho satisfatório (KAMAL et al., 1993; CAMARÃO et al, 1997)

3.3- O búfalo na Amazônia

Na região amazônica a bubalinocultura possui características totalmente extensivas e ultra extensiva, face a grande área de várzea que proporcionam um habitat com excelentes condições para criação dessa espécie, respondendo com satisfatória produtividade sazonal nas várzeas constituídas de pastos nativos da região (VALE et al., 1984). Toda via Vale et al. (1984), apontaram em seus estudos que a situação na qual se encontra a maioria dos criatórios da região, não traduz o potencial que a espécie poderia render para a economia regional.

Apesar da reconhecida vocação natural do Estado do Pará para pecuária, e do crescente desenvolvimento desta atividade, principalmente ligada a bubalinocultura de corte, destacando o crescimento desta atividade a região da Ilha do Marajó, seus níveis de produção e produtividade ainda são ineficientes para atender a demanda regional. Acredita-se que este problema esteja associado em grande parte, aos sistemas de criação em uso, que na maioria das propriedades é ultra extensivo no aproveitamento de pastagens nativas, sem cercas e praticamente sem nenhum controle sanitário e manejo reprodutivo dos rebanhos (RIBEIRO et al, 2005).

III- FISIOLOGIA DO CICLO ESTRAL DA BÚFALA.

A função reprodutiva dos búfalos possui particularidades sendo afetada por diversos fatores, sendo o ambiental um destes. Esta espécie é considerada sazonal de dias curtos, embora haja exceções. É negativamente afetada pelo aumento do fotoperíodo, diminuindo sua atividade

reprodutiva da metade do inverno até o verão em resposta ao aumento das horas de luz do dia. (PRESICCE, 2007).

Porém na região equatorial onde a variação do fotoperíodo é mínima ao longo do ano, a variação sazonal é dependente da disponibilidade de alimentos (PRESICCE, 2007), da estação mais chuvosa e menos chuvosa e da hidrografia do rio Amazonas (RIBEIRO, 2020).

O ciclo estral da búfala dura em média 21 dias (BARILE, 2005), tendo sido relatadas variações de 16 a 33 dias (SINGH et al., 2000; VALE & RIBEIRO, 2005; DROST, 2007), com maior concentração entre 21 e 24 dias (VALE & RIBEIRO, 2005). Sendo importante salientar que o efeito da raça, o clima, a temperatura, o fotoperíodo e a nutrição podem afetar o intervalo entre estros e a sua intensidade (BARILE, 2005).

O estro dura em média 20 h, com variações de 5 a 72 h (BARILE, 2005; VALE & RIBEIRO, 2005). Entretanto, no Brasil, búfalas de rio da raça Murrah apresentaram uma média de $14,78 \pm 7,36$ h (BARUSELLI, 1994). Os sinais de estro em búfalos são menos evidentes que em bovinos, tornando mais difícil a sua detecção (RIBEIRO, et al., 1991). Poucas fêmeas apresentam comportamento homossexual, sendo de grande importância a presença de um rufião macho ou fêmea androgenizada, com buçal marcador para a efetiva detecção do estro, pois a aceitação da monta é o sinal mais seguro e confiável (BARUSELLI, 1994).

Durante o ciclo estral, o crescimento dos folículos ovarianos, em bubalinos, ocorre em um padrão denominado ondas de crescimento folicular. A dinâmica folicular em vacas e novilhas da raça Murrah foi caracterizado podem apresentar de uma a três ondas de crescimento folicular por ciclo estral, dependendo da duração da fase lútea, havendo um predomínio de ciclos com duas ondas foliculares (BARUSELLI et al., 1997, AWASTHI et al., 2006, WARRIACH & AHMAD, 2007).

Em algumas búfalas ocorrem dois picos consecutivos de LH, provocando uma dupla ovulação. Nestes casos, quando ocorre a concepção, o ovócito fertilizado é o que provém da segunda ovulação (PRESICCE, 2007).

Em cada onda folicular cinco a 13 folículos são recrutados (BARUSELLI et al., 1997, MANIK et al., 2002, GIMENES et al., 2009). Cada onda de crescimento folicular é caracterizada por haver um grupo de pequenos folículos que são recrutados (emergência folicular) e iniciam uma fase de crescimento comum por cerca de três dias (GINTHER et al., 2003). Essas ondas foliculares são precedidas ou acompanhadas de um ligeiro aumento nas concentrações de FSH.

Dos folículos recrutados apenas um continua o seu desenvolvimento (folículo dominante) enquanto os outros sofrem decréscimo de tamanho (folículos subordinados) (LUCY et al., 1992). O folículo dominante de cada onda tem a capacidade de induzir a atresia dos demais folículos em

desenvolvimento e, bloquear o surgimento de uma nova onda folicular devido a sua capacidade de controlar a liberação de FSH através da secreção de inibina.

O folículo dominante também adquire receptores de LH, que lhe permitem continuar a crescer em um ambiente com baixos níveis de FSH e com níveis crescentes de LH (PIERSON & GINTHER, 1988; SÁVIO et al., 1988; ASSEY et al., 1994).

O diâmetro do folículo dominante ovulatório de búfalas cíclicas durante a estação reprodutiva varia de 13 a 18 mm dependendo do número de ondas foliculares (TANEJA et al., 1996; BARUSELLI, et al., 1997; AWASTHI, et al., 2006). Segundo Baruselli et al. (1997) o folículo ovulatório de um ciclo estral de uma ou de duas ondas foliculares é maior do que o de três ondas foliculares, já para Awasthi et al. (2006) o folículo ovulatório de um ciclo com uma onda é menor do que o de duas ondas foliculares; estes autores não relataram ciclos de três ondas.

IV- INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO

A inseminação artificial (IA) nos bubalinos visa à melhoria qualitativa e quantitativa da produção de carne e de leite da espécie. No Brasil, os primeiros trabalhos foram realizados na Região Norte pela equipe do Prof. Wiliam Gomes Vale, da Universidade Federal Rural da Amazônia (BARUSELLI, 1999).

Há pouco mais de uma década, o emprego da inseminação artificial era dificultado pela falta de conhecimento da fisiologia reprodutiva na espécie, o que se traduzia em baixas taxas de prenhez. Com maiores estudos sobre a espécie, observou-se que os animais demonstram baixa frequência de comportamento homossexual durante o estro, em torno de 3,44% apenas das fêmeas apresentam este comportamento (BARUSELLI, 1999), e períodos de aceitação de monta curtos e variados - 6 a 48 horas, que acarretam maior dificuldade e aumento de mão-de-obra na detecção do estro (BARUSELLI, 1996). Além disso, ocorrem problemas de dominância reprodutiva entre os búfalos, e animais sob estresse térmico podem entrar em estro com maior frequência no período noturno.

A evolução do conhecimento sobre o comportamento reprodutivo dos bubalinos foi determinante para a implementação de estratégias reprodutivas específicas para esta espécie. Como nos bovinos, a característica mais evidente do estro nos bubalinos é a aceitação de monta pelo macho (VALE et al., 1991).

A falha na detecção do estro e a indefinição do momento ideal para a realização da inseminação artificial são fatores responsáveis pela baixa taxa de prenhez e pelo aumento no período de serviço nas propriedades que adotam essa biotécnica (RIBEIRO et al., 1991;

BARUSELLI et al., 1997). A associação de tais fatores diminui a produção de carne e de leite pelo aumento do intervalo entre partos (RICHARDS et al., 1986).

Além das características peculiares à espécie, a detecção do estro em bubalinos pode ser influenciada pelo estresse térmico, pela inexperiência dos funcionários, pelo tempo empregado e pelo aumento do número de observações de estro por dia, dificultando o trabalho e tornando-o mais oneroso (SAMARA et al., 1997).

5.1-Uso do protocolo à base de progesterona e estradiol (P4/E2)

A Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Registro (UPDR-APTA) juntamente ao Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (VRA-FMVZ-USP) e colaboradores desenvolveu estudos para possibilitar a utilização da IATF durante as estações desfavoráveis do ano, além de possibilitar a inserção animais mesmo em anestro em um programa reprodutivo (PORTO-FILHO, 2004; CARVALHO et al., 2007, 2013), viabilizando desta forma a introdução de material genético superior, a desestacionalização dos partos, a otimização da produção leiteira maior número de búfalas produzindo leite durante o período de maior disponibilidade de forragem, proporcionando assim, uma produção de leite mais linear durante o ano (CARVALHO et al., 2011).

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

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

V-ANGIOGÊNESE FOLICULAR

De acordo com Ayres, H.; G.Z. Mingoti, G.Z. (2012), A adequada formação da rede vascular é um passo limitante para o bom funcionamento do ovário, pois garante a disponibilidade de oxigênio, nutrientes, hormônios e substratos, bem como a transferência de diferentes hormônios para as células-alvo. Os autores acima reportaram que, nos últimos anos, o fluxo sanguíneo local do ovário tem sido analisado por meio da ultrassonografia com Doppler colorido, técnica que permite analisar individualmente os folículos.

O folículo dominante mantém seu crescimento fisiológico em função do aumento do número de receptores para gonadotrofinas e de um aumento no aporte sanguíneo (FORTUNE, 1994). Os folículos do período transitório são visivelmente menos vascularizados e possuem uma atividade proliferativa menor (WATSON et al., 2002).

Estudos morfológicos em bovinos têm demonstrado uma extensa rede vascular ao redor da camada da teca e, uma área avascular na membrana basal e granulosa. Os sinais de fluxo sanguíneo na base do folículo antes do aumento do LH plasmático são bem limitados, ocorrendo o primeiro aumento na área do fluxo sanguíneo seis horas antes do começo do pico de LH (MATTIOLI et al., 2001).

No entanto, quando avaliado o tempo médio da velocidade máxima (TAMV) do fluxo vascular, este não aumentou até seis horas antes nem seis horas depois do pico de LH, indicando que a avaliação do fluxo da área colorida é um melhor indicador em relação à avaliação do tempo médio da velocidade máxima. E, sinais de fluxo sanguíneo colorido não são detectados em um folículo de tamanho pré-ovulatório que não irá ovular, sugerindo o potencial da ferramenta Color-Doppler para aplicar a função de avaliações de fluxo sanguíneo colorido (GINTHER, 2007).

A transição folicular-luteal é um processo dinâmico que envolve várias mudanças bioquímicas e estruturais do folículo pré-ovulatório, incluindo a diferenciação de células da granulosa e da teca em células luteinizadas. E para suprir essa demanda, há a necessidade de um crescimento de vasos e estabelecimento de uma rede capilar para suprimento sanguíneo (REYNOLDS & REDMER, 1999; NISWENDER et al., 2000).

6.1- ALTERAÇÕES DO FLUXO SANGUÍNEO DURANTE O CRESCIMENTO FOLICULAR

Em bovinos, assim como na bufala, o desenvolvimento folicular inicia-se com a ativação do folículo primordial, seguido de seu crescimento e desenvolvimento contínuo até culminar com a ovulação ou atresia, (Júnior, 2015). Estes folículos irão apresentar taxa de crescimento semelhante até o momento do desvio folicular, quando apenas um dentre estes será selecionado, tornando-se o futuro folículo dominante. (Ginther et al., 2003). A partir deste momento, o folículo dominante perde a dependência do FSH e passa a ser dependente do hormônio luteinizante (LH). O folículo selecionado poderá atingir o *status* pré-ovulatório, culminando, conseqüentemente, com a ovulação, ou então entrará em atresia como os demais (GINTHER et al., 2003).

Os mecanismos precisos envolvidos no controle do crescimento de folículos primordiais ainda não estão bem estabelecidos, mas estudos recentes demonstram que o crescimento dos folículos pré-antrais parece ser dependente de interações entre o oócito e as células da granulosa, bem como da secreção de fatores de crescimento intraovarianos. (JUNIOR, (2015). De acordo com (Robinson et al., 2009; (Robinson et al., 2009; Araújo et al., 2011). tanto os folículos primordiais como os primários recebem nutrientes e oxigênio por difusão passiva dos vasos sanguíneos do estroma ovariano. No entanto, a formação de uma rede individual capilar em torno de cada folículo é necessária para que estes folículos possam crescer para além destas fases. (ARAÚJO et al., 2011).

A neovascularização é crucial para dominância e desenvolvimento pré-ovulatório, uma vez que numerosos estudos demonstraram que compostos antiangiogênicos reduzem a vascularização tecal e, conseqüentemente, comprometem severamente o desenvolvimento folicular (Robinson et al., 2009). Assim, para que o crescimento folicular seja adequado, são necessários eficientes mecanismos compensatórios que adequem a rede vascular às crescentes necessidades dos folículos.

Na fase secundária ou mais tarde, as células estromais que rodeiam os folículos se organizam em camadas da teca, em que a parte mais interna (teca interna) contém muitos vasos sanguíneos, enquanto a camada exterior (teca externa) é composta principalmente de tecido conjuntivo fibroso (Araújo et al., 2011). Posteriormente, durante o aparecimento da cavidade antral, os folículos tornam-se rodeados por uma rede capilar, que promove a sua nutrição, inclusive das células da granulosa.

6.1.1- FATORES PRO-ANGIOGENICOS DE CRESCIMENTO FOLICULAR

As células da granulosa representam a principal fonte de fator angiogênico (VEGF) o VEGF secretado tende a se acumular no antro do folículo, sabe-se que quanto maior é o diâmetro folicular, maior é sua concentração de VEGF (bovinos: BERISHA et al., 2000; suínos: BARBONI et al., 2000); ainda, a concentração de VEGF é maior no folículo dominante do que nos subordinados (GINTHER et al., 2004). Assim, o VEGF produzido pelo folículo e presente em grandes quantidades no fluido folicular pode explicar um possível papel vascular do folículo durante o desvio.

Desta forma, o acúmulo de VEGF no folículo e a conseqüente difusão para os capilares cria um gradiente angiogênico que regula o desenvolvimento da rede de vasos sanguíneos e sua arquitetura dentro da parede do folículo (MATTIOLI et al., 2001). Um extenso plexo vascular se desenvolve na camada de células da teca, localizada entre a membrana basal e a camada

granulosa avascular (O'SHEA et al., 1978). Como consequência, há maximização do fornecimento de oxigênio, nutrientes e hormônios para as células da granulosa (ROBINSON et al., 2009). Portanto, a capacidade de um folículo produzir VEGF pode representar um fator essencial ao seu desenvolvimento, sendo uma característica distinta dos folículos que superam a seleção e entram em crescimento.

Outro fator positivamente correlacionado com a vascularização folicular é a concentração intrafolicular de 17β -estradiol (MATTIOLI et al., 2001). Segundo Robinson et al. (2009), a hipótese de que a dominância é devido à maior extensão da vasculatura do folículo, o qual recebe assim maior suporte hormonal (ZELEZNIK et al., 1981), é apoiada pela observação de que, durante a seleção do folículo dominante, os folículos que possuem maiores concentrações de estrogênio têm maior vascularização e elevadas concentrações de VEGFA (GRAZUL-BILSKA et al., 2007).

6.1.2- MODIFICAÇÕES DO FLUXO SANGUÍNEO NA OVULAÇÃO

A redução da velocidade do fluxo sanguíneo ou da vascularização do folículo subordinado é coerente com os relatos que demonstram redução da proliferação de células endoteliais capilares nesse folículo e redução da vascularização da teca, que ocorre antes da atresia folicular em bovinos (JIANG et al., 2003) e ovinos (JABLONKA-SHARIF et al., 1994). Assim, o futuro folículo dominante deve possibilitar um contínuo aumento da irrigação sanguínea, bem como aumentar a responsividade às gonadotrofinas para poder continuar crescendo mesmo em ambiente de menores concentrações de FSH (GINTHER et al., 2003).

Em vacas bovinas, a ultrassonografia transretal com Doppler colorido tem demonstrado uma clara diferença na vascularização da parede de folículos pré-ovulatórios em comparação com folículos anovulatórios (ACOSTA et al., 2003).

Estes resultados sugerem que o uso do Doppler colorido tem potencial uso para auxiliar a investigação as modificações na vascularização do folículo antes e durante o desvio, assim como no processo de ovulação. O estudo da evolução da vascularização dos folículos por ultrassonografia com Doppler colorido pode esclarecer as alterações na posição dos vasos que ocorrem na sequência de eventos relacionados com a seleção do folículo dominante.

VI- HEMODINÂMICA FOLICULAR

Em bubalinos, o desenvolvimento folicular tem início com a ativação do folículo primordial, que passa a ser primário e depois secundário, compreendendo a fase pré-antral. Depois passa a folículo terciário e pré-ovulatório que compreende a fase antral, culminando com

ovulação ou atresia. Os folículos pré-antrais não possuem suprimento vascular próprio, porém recebem nutrientes e oxigênio por difusão passiva dos vasos sanguíneos do estroma ovariano. No entanto para que esses folículos possam crescer além dessa fase é necessário a formação de uma rede individual capilar em torno de cada folículo. É indispensável a neovascularização para o crescimento de folículos antrais, dominância e desenvolvimento pré-ovulatório (ROBINSON et al., 2009; ARAÚJO et al., 2011). Dessa forma, o aporte sanguíneo dos folículos dominantes é maior do que a dos folículos subordinados e a taxa de diminuição do folículo subordinado se dão mais tardiamente do que a diminuição da vascularização (ACOSTA et al., 2003).

A secreção do pico de LH faz com que ocorra complexas alterações estruturais e funcionais no folículo maduro, as quais estão estreitamente associadas ao aumento de fluxo sanguíneo na parede do folículo pré-ovulatório (ACOSTA et al., 2003). Acosta & Miyamoto (2004) observaram que o primeiro aumento detectável na concentração de estradiol plasmático coincide com o aumento da vascularização do folículo maduro. Dessa forma parece haver uma íntima relação entre diâmetro folicular, concentração de estradiol no fluido folicular e área vascular (MATTIOLI et al., 2001).

Acosta et al. (2003) demonstraram uma clara diferença na vascularização na parede de folículos pré-ovulatórios em comparação com folículos anovulatórios, este último possuindo uma atividade proliferativa menor e uma menor perfusão sanguínea.

VIII-ULTRASSONOGRAFIA DOPPLER

O ultrassom Color Doppler é uma ferramenta associada à ultrassonografia convencional que fornece informações sobre a arquitetura vascular e os aspectos hemodinâmicos dos vasos em tempo real, permitindo avaliar a presença, a direção e a qualidade do fluxo sanguíneo (KING, 2006; CARVALHO et al., 2008), se tornando uma ferramenta amplamente utilizada na clínica de grandes animais e programas de pesquisas na reprodução animal (GINTHER & UTT, 2004; MIYAMOTO et al., 2006). Esta técnica foi descrita por Christian Johann Doppler em 1842, na qual uma fonte de ondas (sonoras ou eletromagnéticas), que está em movimento em relação a um receptor, altera a frequência de onda durante este processo, aumentando a frequência durante a aproximação da fonte e diminuindo durante o seu distanciamento (LOUPAS & GILL, 1995; KING, 2006).

Diferentemente da ultrassonografia bidimensional em escala de cinza que exhibe a informação de interfaces teciduais, o ultrassom Doppler é otimizado para exibir informação sobre fluxo, permitindo a avaliação hemodinâmica por meio da análise do som emitido, das ondas espectrais de velocidade e do mapeamento colorido. Dessa forma pode-se observar que

existem vários modos de exibição, sendo eles Doppler contínuo, Doppler pulsado, Doppler colorido e Doppler de amplitude (VIECELLI et al., 2008).

O ultrassom color doppler é uma técnica não invasiva e útil na avaliação da função vascular ovariana, por permitir a observação do fluxo sanguíneo em uma área delimitada :como na parede de folículos pré-ovulatórios dentro do corpo lúteo e no útero (MATSUI & MIYAMNOTO, 2009).

O ciclo estral de mamíferos domésticos é marcado por alterações hemodinâmicas envolvidas na remodelação do tecido ovariano cíclico, as quais ocorrem durante a última onda de crescimento folicular, ovulação e desenvolvimento do corpo lúteo. Uma extensa formação vascular (angiogênese) e diferenciação das células (luteinização) ocorrem na parede folicular entre o pico de LH e início do desenvolvimento do corpo lúteo. Dessa forma o Doppler colorido pode ser utilizado para auxiliar na investigação da vascularização do folículo antes e durante o seu desvio, bem como no processo de ovulação (AYRES & MINGOTI, 2012).

Scaliente et al. (2015), em seu experimento com vacas da raça Nelore submetidas a diferentes protocolos de IATF, concluíram que, os folículos pré-ovulatórios ovularam em média 12 h após atingirem grau máximo de vascularização. Além disso, foi possível visualizar que o fluxo sanguíneo na parede do folículo aumenta em um ritmo bem maior do que o aumento do diâmetro folicular no período pré-ovulatório, sendo mais confiável avaliar a vascularização folicular do que o diâmetro do folículo, para determinar o momento mais próximo da ovulação.

IX-MATERIAL E MÉTODOS

9.1-Local

O experimento foi conduzido em uma fazenda comercial de produção de leite de búfalas, localizada no município de Nova Timboteua as margens da PA-324, nordeste paraense, aproximadamente a 150km da capital Belém-Pa, com coordenadas geográficas precisas de 1°07'04"S e 47°23'34"W.



Figura 1- Localização da propriedade próxima a PA- 324, Nova Timboteua- Pará.

9.2-Animais

Foram utilizadas 151 vacas bubalinas (*Bubalus bubalis*) multíparas com 30 à 60 dias pós-parto predominantemente da raça Murrah com idade entre 4 e 8 anos e média de escore corporal $2.9\pm 0,6$ (escala de 1 a 5) seguindo metodologia aplicada a búfalos de Baruselli et al, (1995) e Ribeiro, (1996). Todos os animais foram identificados individualmente através de brincos com numeração.

As búfalas foram mantidas em pastagens cultivadas de *Panicum maximum cv Massai*, *Panicum maximum cv Monbaça* e *Brachiaria cv Brizanta*, com acesso livre à água e recebendo suplementação no momento da ordenha de 1% de peso vivo de resíduo de cervejaria (Cevada). O experimento foi desenvolvido no período de dezembro de 2021 a janeiro de 2022.

Este trabalho possui parecer favorável para experimentação animal junto a Comissão de Ética e Uso de Animais da Universidade Federal Rural da Amazônia, com o protocolo nº 066/2016 da CEUA e 23084.019476/2016-11 da UFRA.

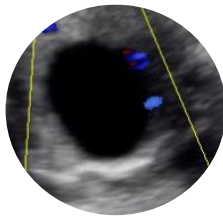
9.3-Protocolo de sincronização para IATF

A tarde de um dia aleatório do ciclo estral (D0), foi introduzido dispositivo intra-vaginal (1g/P4 (Primer®, Agener União Química, Brasil) e mais 2,0mg de BE (Fertilcare Sincronização®, MSD Saúde Animal, 22 Brasil). No dia nove (D9) a tarde, foi realizado remoção do dispositivo, e aplicado via IM, 0,265 mg de closprostenol sódico (Ciosin®, MSD Saúde Animal, Brasil) e mais 300 UI de eCG (Folligon®, Intervet International, Alemanha). No decimo primeiro dia (D11 atrde, aplicado, IM. 0,1 mg de GnRH (Fertagyl®, Intervet International, Alemanha). No decimo segundo dia (D12) pela manhã, foi realizada a inseminação artificial.

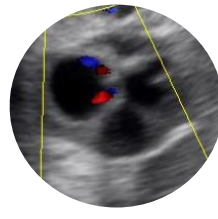
9.4-Ultrassonografia e avaliação do fluxo sanguíneo

Antes da inseminação foi mensurado o diâmetro do folículo e seu grau de vascularização. por ultrassonografia transretal com ultrassom bidimensional Doppler (Chison Eco Vet, Pequim, China) através do transdutor micro-convexo multi-frequencial, Utilizou-se a abordagem de exibição de fluxo colorido em cima da imagem modo B, em tempo real de acordo com (Ginther, 2007). Os folículos de maior diâmetro nos ovários foram mensurados, e após, ligado a ferramenta color-doppler classificou-se o grau de circulação em tempo real. Sendo posteriormente avaliados as imagens através software Fiji e Imaris para segmentação da área (análise bidimensional) e do volume (análise tridimensional) ocupado pelo fluxo sanguíneo e tecido associado para calcular o índice de vascularização. Chegando assim a uma classificação

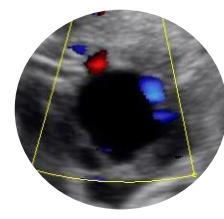
de folículos com baixa, média e alta vascularização. Trinta dias após a inseminação artificial foi realizado o diagnóstico de gestação, com ultrassom.



Baixa 0 a 15%



Média 15 a 30%



Alta 30 a 45%

Figura 02- Modificações do fluxo sanguíneo na parede do folículo pré-ovulatório.

X-ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram tabulados em planilhas eletrônicas e submetidos a análise através do software especializado SAS Ondemand 2022. Foi utilizado o teste estatístico Anova e as médias das variáveis como distância Fol (mm), largura Distância Fol (mm), altura, perímetro do Fol (mm) área da parede + Fol (mm) foram comparadas pelo teste de Tukey com 5% de significância ($P < 0,05$).

XI-RESULTADOS E DISCUSSÃO

11.1- Taxa de prenhez

A taxa de prenhes obtida foi de 32,45%, (49/151), não apresentando diferença estatística entre os grupos. A taxa de prenhes obtida, encontra-se abaixo da média reportada na região.

Tabela 1- Taxa de prenhes em 151 búfalas de acordo com o protocolo de quatro manejos e a inseminação em tempo fixo.

Gestante	49/151 (32,45%)
Não gestante	102/151 (67,55%)

Médias e desvio padrão seguidas de letras minúsculas distintas na mesma coluna diferem entre si pelo Teste Anova ($P < 0,05$).

Santos (2017), comparando concentrações diferentes da progesterona em sistemas de quatro manejos, encontrou 45,83% de prenhes, usando (P4 3°uso+BE), 53,6%, usando (P4 monodose +GnRH); 48,3% usando (P4 monodose + BE) e 22,4%, usando (P4 1° uso+ BE). Verificou que a P4 (monodose) associado ao GnRH ou BE, foram significativamente superior a P4 de 1° e 3° usos.

Em búfalas multíparas mestiças, de criações extensivas na estação de vazante, no contexto de quatro manejos. Farias (2018), verificou uma taxa de prenhes de 57,6%, usando dose única do implante vaginal de P4. No período menos chuvoso, na Ilha do Marajó em búfalas mestiças, em protocolo de quatro manejos, utilizando P4 (1,2mg) e 2,0 mg de BE, Neves Souza

(2019) obteve uma taxa de prenhes, nas fêmeas ovuladas e não ovuladas de 58,33% e 50,1%, respectivamente.

Weiller (2020) usando protocolo de quatro manejos, obteve uma taxa global de prenhez de 60,9% em sua pesquisa utilizando búfalas mestiças criadas em sistema misto (várzea e terra firme) no estado do Amazonas.

Corroborando com nossa pesquisa, Ribeiro et al. (2017) realizando estudo sobre IATF em búfalas criadas extensivamente em região de várzea no estado do Amapá usando protocolo semelhante ao utilizado em nossa pesquisa obteve 44,6% de prenhez.

11.2- Área do Folículo dominante e taxa de prenhes

Nossos resultados mostraram ocorrer diferença ($P < 0,05$), nesta variável estudada. Os folículos de área menor, ($99.01 \pm 16.18\text{mm}$), correlacionaram-se as fêmeas gestantes, enquanto nos animais não gestantes a área dos folículos mostrou-se maior ($117 \pm 46.17\text{mm}$). Tabela 2.

Tabela 2- Média e desvio padrão da área (maior e menor) de folículos pré-ovulatório e sua correlação à taxa de prenhes.

Área do folículo dominante	Gestação
99.01±16.18mm^a	49/151 (32,45%) Gestante
117±46.17mm^b	102/151 (67,55%) Não gestante

Médias e desvio padrão seguidas de letras minúsculas distintas na mesma coluna diferem entre si pelo Teste Anova ($P < 0,05$).

Nosso resultado, quando comparamos a área do folículo dominante à gestação, estão similares aos reportados de Neglia et al. (2011) e Pandey et al, (2011) em bubalinos. De acordo com Neglia et al. (2011), observaram que o fluxo sanguíneo dos folículos de animais não prenhes (maiores) apresentava maiores índices de resistência, quando comparamos a correlação, área do folículo maior ($117 \pm 46.17\text{mm}$) e a taxa (67,55%) de búfalas não gestante.

De acordo com. Pandey et al, (2011) tal correlação, pode ser justificada, pelo alto grau de vascularização na parede do folículo, que segundo os autores, já se encontram com seu desenvolvimento muito avançado e provavelmente irão ovular antes do momento previsto, o que não reflete em boa taxa de concepção.

Outra justificativa e apontada por (Vasconcelos et al. 2001) é o fato de que fêmeas que ovulam folículos pequenos possuem uma quantidade reduzida de estrógeno no momento da ovulação comparadas com vacas que tem folículos maiores.

Misra et al. (1998), postulam que os baixos resultados na espécie bubalina podem decorrer das altas concentrações do hormônio estradiol (E2). Esses autores também postulam que a exposição prolongada a concentrações elevadas de 17β estradiol pode mudar o ambiente

intra-uterino e/ou da tuba uterina e, conseqüentemente, prejudicar a captação dos oócitos pela fímbria e o transporte e desenvolvimento embrionário normal

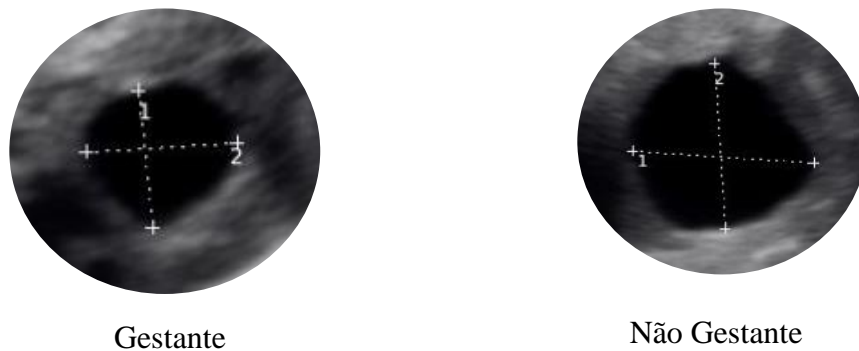


Figura 03- Variações no tamanho do folículo dominante em búfalas gestantes e não gestantes.

11.3- Vascularização visual ou percentagem de perfusão vascular.

Tabela 3- Média e desvio padrão da perfusão sanguínea dos foliculos dominantes

Mensurações do folículo dominante	Gestante	Não gestante
Perfusão vascular (%)	19.04±5.2 ^A	56.57±9.95 ^B

Médias e desvio padrão seguidas de letras minúsculas distintas na mesma coluna diferem entre si pelo Teste Anova ($P < 0,05$).

Na tabela 3. Podemos observar que a média e o desvio padrão nas mensurações das respectivas variáveis estudadas, mostram-se menores nas búfalas gestantes, em relação as medias e desvio padrão nas búfalas não gestantes. Entre elas, destacamos a perfusão vascular (vascularização visual) para búfalas gestantes 19.04±5.2^A e não gestantes 56.57±9.95^B. havendo diferença estatística nesta variável ($P < 0,05$), resultado contrário aos trabalhos de (MATTIOLI et al. (2001); ACOSTA et al. (2003).

No nosso estudo, houve uma correlação negativa entre o fluxo sanguíneo (Perfusão) e vascularização visual do folículo pré-ovulatório das animais gestantes (19.04±5.2%), para os não gestantes (56.57±9.95%) ($P < 0,05$). Segundo (Mattioli et al. (2001) no gado leiteiro, encontraram estreita associação entre o diâmetro do folículo, estradiol intrafolicular e a área vascular. Acosta et al. (2003) também demonstraram que a vascularização folicular e a velocidade do fluxo sanguíneo podem ser usadas para identificar folículos saudáveis, bem como prever a proximidade da ovulação.

De acordo com Ayres, & Mingoti, (2012) a complexidade estrutural e secretória e outras modificações funcionais que ocorrem no ovário próximo ao momento da ovulação estão intimamente associadas às mudanças no fluxo sanguíneo no interior da parede do folículo pré-ovulatório.

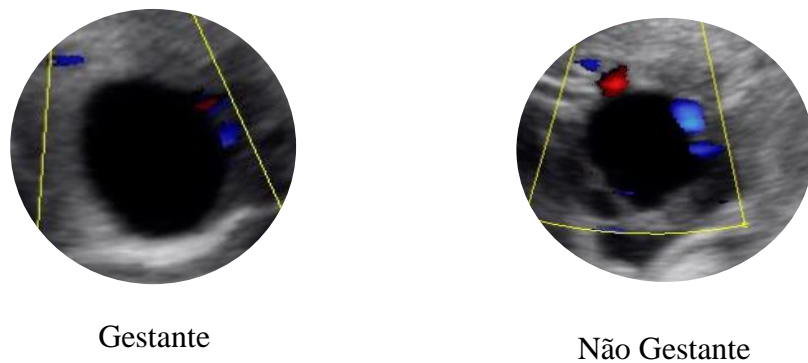


Figura 02- Modificações do fluxo sanguíneo na parede do folículo pré-ovulatório em búfalas gestantes e não gestantes

11.4- Outras variáveis mensuradas.

Ao avaliarmos altura e largura dos folículos pré-ovulatórios, não encontramos diferença estatística, entretanto, neste aspecto. Mion (2018) trabalhando com bovinos de corte citou encontrar correlação positiva entre a altura e largura folicular e taxa de prenhes.

Tabela-4. Média e desvio padrão da distância, perímetro, área da parede dos folículos pré-ovulatório e sua correlação à taxa de prenhe.

Mensurações do folículo dominante.	Gestante	Não gestante
Distância Fol (mm) Largura	12.40±0.67 ^A	13.32±3.89 ^A
Distância Fol (mm) Altura	11.82±1.68 ^A	12.23±2.88 ^A
Perímetro do Fol (mm)	38.55±11.87 ^A	39.18±811 ^A
Área da parede + Fol (mm)	169.16±21.19 ^A	180.85±58.10 ^A

Independente da IATF, existe uma grande variação com relação ao tamanho dos folículos no final do protocolo (Bo et al., 2003). Isso se dá devido ao intervalo de tempo (três a seis dias) sobre o qual ocorre o desenvolvimento de uma nova onda folicular (BO et al., 2003; KIM et al., 2005; MARTINEZ et al., 2005).

Pfeifer et al, (2015). Preconizam que no momento da IATF, a vida útil do folículo pré-ovulatório pode se estender de quatro a sete dias, explicando essa variação no tamanho dos folículos no momento da inseminação. De acordo com os autores é necessário que haja intervalos diferentes entre a remoção da fonte de progesterona e a IATF, com base no tamanho folicular, pois folículos menores ovulam mais tarde quando comparado a folículos maiores,

havendo uma melhor sincronia entre o momento da ovulação e a IATF, melhorando assim a probabilidade de prenhes.

XII- CONCLUSÃO

1- O uso do Doppler colorido teve um potencial uso na investigação da vascularização dos folículos.

2- O Doppler colorido é o instrumento indicador, de grande precisão à deficiência de vascularização do Foliculo pre-ovulatório.

3- Pela area dos foliculos maiores, nem sempre a maior, se relaciona a fertilização.

4- A média e o desvio padrão de 99.01 ± 16.18 mm, nos orienta predizer probabilidade de prenhes

5- Variáveis, como distância Fol/largura (mm), distância Fol/altura(mm), perímetro do Fol (mm) e área da parede + Fol (mm) não predizem prenhez.

XIII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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. **Animal Reproduction**, v.125, p.759-767, 2003.

ACOSTA, T.J.; MIYAMOTO, A. Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. **Animal Reproduction**, v.40, p.82-83, 2004.

ANNUAL MEETING OF THE BRAZILIAN EMBRYO TECHNOLOGY SOCIETY (SBTE), 31., 2017, Cabo de Santo Agostinho, Pe, Brazil. **ANIMAL REPRODUCTION**. Belo Horizonte, Mg, Brazil:: Editorial Board, 2017. 14 v.

ARAÚJO, V. R. et al. Importance of vascular endothelial growth factor (VEGF) in ovarian physiology of mammals. **Zygote**, v. 21, n. 3, p. 295–304, 2011.

ASSEY, R. J. et al. Oocyte morphology in dominant and subordinate follicles. **Molecular Reproduction and Development**, v. 37, n. 3, p. 335–344, 1994.

AWASTHI, M. K.; KHARE, A. KAVANI, F. S.; SIDIQUEE, G. M.; PANCHAL, M. T.; SHAH, R. R. Is one-wave follicular growth during the estrous cycle a usual phenomenon in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) **Animal Reproduction Science**, v. 92, n. 3-4, p. 241-253, 2006.

AYRES, H.; G.Z. MINGOTI, G.Z. Angiogênese, vascularização e uso do ultrassom Doppler colorido na avaliação de estruturas ovarianas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 36, p.174-180, 2012.

BARILE, V. L. Improving reproductive efficiency in female buffaloes. **Livestock Production Science**, v. 92, p. 183 194, 2005.

BARUSELLI, P. S. Reprodução de bubalinos. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE BUBALINOCULTURA, 1, 1996, Cruz das Almas. Anais... 1996. p. 117-153.

BARUSELLI, P. S. Sexual behaviour in buffaloes. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 4.,1994, São Paulo. Proceedings... São Paulo: [s. n.], 1994. v. 1, p. 158-73.

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

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

BARUSELLI, P.S.; Inseminação artificial em tempo fixo e sincronização da ovulação em bubalinos. In: Bubalinos: sanidade, reprodução e produção. / Ed. Valquíria Hipólito Barnabé e col. – Jaboticabal: FUNEP, 202p. 1999.

BARUSELLI, P.S.; MARQUES, M.O.; CARVALHO, N.A.T.; MADUREIRA, E.H.; CAMPOS FILHO, E.P. Effect of different treatments for timed artificial insemination on the reproductive efficiency in lactating beef cows. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.26, p. 218-221, 2002.

BARUSELLI, P.S.; CARVALHO, N.A.T.; HENRIQUEZ, C.H.P.; AMARAL, R.; NICHI, M. Synchronization of ovulation for timed insemination during the off breeding season in the Buffalo. 1ST Buffalo Symposium of Americas. p 414, Belém, Pará, 2002.

BASTIANETTO, E.; Criação de Búfalos no Brasil: situação e perspectivas. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, n 6, p. 98-103, 2009.

BERNADES, O. Bubalinocultura no Brasil: situação e importância econômica. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.31, n.3, p.293-298, 2007.

BERNARDES, O. Bubalinocultura no Brasil: situação e importância econômica. Rev Bras Reprod Anim. XVII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, Belo Horizonte, v.31, n.3, p.293-298, jul./set. 2007.

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

BORGHESE, A. (Ed.). Buffalo, production and research. Rome: FAO, 2005. (FAO. Technical Series, 67).

CAMARÃO et al.. Water Buffalo Production Based on the Main Pastures of the Brazilian Amazon Region. **Buffalo Journal**. 1997 3:223-248

CARVALHO, C.F.; CHAMMAS, M.C.; CERRI, G.G. Princípios físicos do Doppler em ultrassonografia. **Ciência Rural**, v.38, p.872-879, 2008.

CARVALHO, N. A T.; BERNARDES, O.; BARUSELLI, P. S. Desestacionalização dos partos para a produção de leite de Búfalas a pasto no centro sul do Brasil. **Pesquisa & Tecnologia**, v. 8, p. 1–5, 2011.

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

CARVALHO, N. A T.; SOARES, J. G.; PORTO FILHO, R. M.; GIMENES, L. U.; SOUZA, D. C.; 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, n. 3, p. 423 428, 2013.

CAVICCHIOLI, M.; SOUZA, M. H. L.; LIMA, C. V. S.; GIMENES, F. B.; SOUZA, E. M.; GONÇALVES, G. R. Influência do diâmetro do folículo pré-ovulatório sobre a taxa de prenhez de vacas submetidas à IATF. **Revista Uningá Review**, [S.l.], v. 34, n. S1, p. 15, set. 2019.

DROST, M. Bubaline versus bovine reproduction. *Theriogenology*, v. 68, p. 447-449, 2007.

FAO-FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION.[2011]. FAOSTAT Agriculture data, 2011. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/573/default.aspx#ancor>>. FAO. 2014; Food and Agriculture Organization. Data Base 2010. Disponível em <http://faostat.fao.org/faostat/collections>.

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 Science**, v. 6, p. 256, 2009.

GINTHER, O. J. et al. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. **Animal Reproduction Science**, v. 78, n. 3–4, p. 239–257, 2003.

GINTHER, O. J.; UTT, M. D. Doppler ultrasound in equine reproduction: Principles, techniques, and potential. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 24, n. 12, p. 516–526, 2004.

GONÇALVES JUNIOR, W. A.; SARAN JUNIOR, A. J.; GONÇALVES, R. L.; LOLLATO, J. P. M.; SALES, J. N. S.; MINGOTI, R. D.; BARUSELLI, P. S.; FERREIRA, R. M. Treatment with GnRH (Gonaxal®) at AI increases pregnancy rate of Nelore primiparous cows that showed or not estrus during the TAI protocol.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção Pecuária Municipal Vol.38. Rio de Janeiro, 2014.

JAINUDEEN, M. R.; HAFEZ, E. S. E. Ciclos reprodutivos: Bovinos e Bubalinos. *Reprodução Animal*. 7.ed. São Paulo: Manole, Cap.11, p.159-171, 2004.

Kamal, T., Shebaita, M., Ibrahim, I. (1993) - Physiological responses of lactating buffaloes to shed type. Proceedings of the International Symposium: "Prospects of buffalo production in the Mediterranean and the Middle East. Cairo 9-12 November. Egypt - 201-204.

KING, A. M. Development, advances and applications of diagnostic ultrasound in animals. **Veterinary Journal**, v. 171, n. 3, p. 408–420, 2006.

LOUPAS, T & GILL, R.W. Principles of colour Doppler. In: Transvaginal colour Doppler: The Scientific basis and practical application of colour Doppler in gynaecology. **Springer- Verlag Berlin Heidelberg**, p. 1- 11, 1995.

LUCY, M. C. et al. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 70, n. 11, p. 3615–3626, 1992.

MANIK, R. S.; PALTA, P.; SINGLA, S. K.; SHARMA, V. Folliculogenesis in buffalo (*Bubalus bubalis*): a review. **Reproduction Fertility and Development**. v. 14, n. 5-6, p. 315- 325, 2002.

MATSUI, M.; MIYAMOTO, A. Evaluation of ovarian blood flow by colour Doppler ultrasound: Practical use for reproductive management in the cow. **Veterinary Journal**, v. 181, n. 3, p. 232–240, 2009.

MATTIOLI, M. et al. Follicle activation Involves vascular endothelial growth factor production and increased blood vessel extension1. **Biology of Reproduction**, v. 65, n. 4, p. 1014–1019, 2001.

MENEGHETTI, M.; SÁ FILHO, O.G.; PERES, R.F.G.; LAMB, G.C.; VASCONCELOS, J.L.M. Fixed time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cattle: I. Basis for development of protocols. **Theriogenology**, v.72, p.179–189, 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 murrh buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Iranian Journal of Applied Animal Science**, v. 4, n. 3, p. 499-504, 2014.

MIYAMOTO, A. et al. A potential use of color ultrasound as a tool for reproductive management: new observations using color ultrasound scanning that were not possible with imaging only in black and white. **Journal of Reproduction and Development**, v. 52, n. 1, p. 153–160, 2006.

MORAES, J. C. F.; SOUZA, C. J. H.; GONSALVES, P. B. D. Controle do estro e da ovulação em bovinos e ovinos. In: GONSALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotecnicas aplicadas a Reprodução Animal**. São Paulo: Varela, cap. 3, p. 25-55, 2002.

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

NEGLIA, G.; VECCHIO, D.; RUSSO, M.; DI PALO, R. PACELLI, C.; COMIN, A.; GASPARRINI, B.; CAMPANILE, G. Efficacy of PGF₂ on pre-ovulatory follicle and corpus luteum blood flow. **Reproduction in Domestic Animal**,

PANDEY, A. K.; DHALIWAL, G. S.; GHUMAN, S. P. S.; AGARWAL S. K. Impact of preovulatory follicle diameter on plasma estradiol, subsequent luteal profiles and conception rate in buffalo (*Bubalus bubalis*). **Animal Reproduction Science**, v. 123, p. 169-174, 2011.

PIERSON, R. A.; GINTHER, O. J. Ultrasonic imaging of the ovaries and uterus in cattle. **Theriogenology**, v. 29, n. 1, p. 21-37, 1988.

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

PRAKASH, B. S.; SARKAR, M.; VIJAY, P.; MISHRA, D. P.; MISHRA, A.; MEYER, H. H. D. Postpartum endocrinology and prospects for fertility improvement in the lactating river buffalo (*Bubalus bubalis*) and yak (*Capra hircus* L.). **Livestock Production Science**, v. 98, p. 13-23, 2005.

PRESICCE, G. A. Reproduction in the Water Buffalo. **Reproduction in Domestic Animals**, v.42 (Suppl.2), p. 24-32, 2007..

RIBEIRO H. F. L.; SOUSA, J. S.; SILVA, A. O. A. ; VALE, W. G. Inseminação artificial em bubalinos. IN: IX CONG. BRAS. REP. ANIMAL, 1991, Anais... Belo Horizonte -.MG. CONG. BRAS. REP. ANIMAL (CBRA). 1991.

RIBEIRO, H. F. L. et al. Eficiência da inseminação em tempo fixo com progesterona intravaginal na taxa de prenhez em búfalas criadas em diferentes sistemas de produção na Amazônia. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 33, Suplemento 1, p. 211-211, 2005.

RIBEIRO, H. F. L.; LIMA, W. F.; RAMOS, A. S.; NETO, A. C.; SILVA, C.; FARIAS, A. D. M.; ROLIM FILHO, S. T. Inseminação Artificial em Tempo Fixo em búfalas criadas extensivamente em terras alagadas do Amapá. **Anais da XXXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões**. p. 56. 2017.

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

RICHARDS, M. W.; SPITZER, J. C.; WARNER, M. B. Effect of varying levels of postpartum nutrition and body condition of calving on subsequent reproductive performance in beef cattle. **J. Anim. Sci.** v. 62, p. 300, 1986.

ROBINSON, R. S. et al. Angiogenesis and vascular function in the ovary. **Reproduction**, v. 138, n. 6, p. 869–881, 2009.

SANTOS, S. S. D.; BIONDI, F. C.; CORDEIRO, M. S.; MIRANDA, M. S.; DANTAS, J. K.; FIGUEIREDO, JR.; OHASHI, O. M. Isolation, follicular density, and culture of preantral follicles of buffalo fetuses of different ages. **Animal Reproduction Science**, v. 95, p.1 15.,2006.

SAVIO, J. D. et al. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 83, n. 2, p. 663–671, 1988.

SCALIANTE, J.R. et al. Blood perfusion in preovulatory follicle in Nelore cows under IATF protocols. **Animal Reproduction**, v. 12, n. 3, p. 598, 2015.

SHALASH, M. R. The role of physiology on the adaptation of buffalo to various conditions under different environments. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 4., 1994, São Paulo. Proceedings.... São Paulo: [s. n.], v. 1, p. 26-74, 1994.

SINGH, J.; NANDA, A. S.; ADAMS, G. P. The reproductive pattern and efficiency of female Buffaloes. **Animal Reproduction Science**, v. 60 61, p. 593 604, 2000.

SOUZA, V. L. Avaliação da fertilidade do rebanho bovino de Rondônia e o uso de detecção de cio e do GnRH para aumentar a eficiência dos programas de IATF. 2019. 39f. **Dissertação (Mestrado)** Universidade Federal de Rondônia. 2019.

TANEJA, M.; ALI, A.; SINGH, G. Ovarian follicular dynamics in water buffalo. **Theriogenology**, v. 46, p.121 30, 1996.

VALE, W. G.; RIBEIRO, H. F. L. Características reprodutivas dos bubalinos: puberdade, ciclo estral, involução uterina e atividade ovariana no pós-parto. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 29, n. 2, p. 63-73, 2005.

VALE, W.G.; WEITZ, K.F.;GRUNERT,E. Estruos behavior and ovarian function in water buffalo cows (Bubalus bubalis Lin) under amazon condition. In:

INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 10., Urbana, 1984. Proceedings... Urbana, University of Illinois: v. 2, 1984. p.159..

WARRIACH, H. M.; AHMAD, N. Follicular waves during the oestrous cycle in Nili-Ravi buffaloes undergoing spontaneous and PGF 2α - induced luteolysis. **Animal Reproduction Science**, v. 3-4, p. 332-337, 2007.

Water buffalo. Bangkok: FAO, Regional Office for Asia and the Pacific, 2000. ZAVA, M.A.R.A. Produção de búfalos. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1984.

WEILLER, J. H. A. Uso do cipionato de estradiol na indução de ovulação de búfalas criadas em várzea da região de Itacoatiara, Amazonas. 2020. 44f. **Dissertação (Mestrado)** Universidade Federal do Amazonas. 2020.

VILELA, J.A. e SANTINI, G.A.; A cadeia produtiva de leite de búfalas no edr de Marília (sp): uma análise do segmento de produção leiteira. 48 Congresso SIBER Sociedade Brasileira de Economia Administração e Sociologia Rural, 25 a 28 de Julho, Campo Grande-MS, 2010; APRESENTAÇÃO ORAL-Estrutura, Evolução e Dinâmica dos Sistemas Agroalimentares e Cadeias Agroindustriais UNESP/TUPÃ, TUPÃ – SP – BRASIL

JORGE, A.M.; GOMES, M.I.F.V.; HALT, R.C. Efeito da utilização da Somatotropina recombinante bovina (bST) sobre a produção de leite em búfalas. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.31, n.3, p.1230-1234, 2002.

LAZZARI, A.M.; Mastite induzida por *Staphylococcus aureus* em Bubalinos e bovinos leiteiros, Tese de doutorado em ciência animais. Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária Brasília, 2012.

RIBEIRO, H. F. L. Puerpério na búfala (*Bubalus bubalis*): Aspectos clínicos e histológicos da involução uterina e atividade ovariana. 1996. 125f. Tese (Doutorado) Universidade Federal de Minas Gerais. 1996.

FRASER HM, LUNN SF, KIM H, DUNCAN WC, RODGER FE, ILLINGWORTH PJ ANDERICKSON GF (2001) Changes in insulin-like growth factor bindingprotein-

3 mRNA expression in endothelial cells of the human corpus luteum: a possible role in luteal development and rescue *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*.

ZELEZNIK AJ, SCHULER HM, REICHERT LE. Gonadotropin-binding sites in the rhesus monkey ovary: role of the vasculature in the selective distribution of human chorionic gonadotropin to the preovulatory follicle. **Endocrinology**, v.109, p.356-362, 1981.

REDMER DA, REYNOLDS LP. Angiogenesis in the ovary. *Rev Reprod*, v.1, p.182-192, 1996

SILVA, P. R. F. DA ; SANGOI, G. A. L. ; STRIEDER, M. L. ; SILVA, A. A. Management strategies of winter cover crops to maize grown in succession in no-till system. **Ciência Rural**, 2006.

SIDDIQUI MAR, ALMAMUN M, GINTHER OJ. Blood flow in the wall of the preovulatory follicle and its relationship to pregnancy establishment in heifers. **Anim Reprod Sci**, v.113, p.287-292, 2009.

ROBINSON RS, WOAD KJ, HAMMOND AJ, LAIRD M, HUNTER MG, MANN GE. Angiogenesis and vascular function in the ovary. **Reproduction**, v.138, p.869-881, 2009.

SAMARA, S. I.; DUTRA, I. S.; FRANCESCHINI, P. H.; MOLERO FILHO, J. R.; SANTOS FILHO, A. S.; FIRMINO NETO, J. E.; ANDRADE, J. C. O. Uso de gonadorelina no dia da inseminação artificial de vacas leiteiras. **Rev. Bras. Reprod. Anim.** v. 21, n. 2, p. 107-108, 1997