DIEGO CAVALCANTE DE SOUZA

**Efeito da administração de progesterona após a IATF no desenvolvimento
do concepto e na taxa de prenhez em búfalas lactantes**

São Paulo

2016

DIEGO CAVALCANTE DE SOUZA

Efeito da administração de progesterona após a IATF no desenvolvimento do concepto e na taxa de prenhez em búfalas lactantes

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

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli

De acordo: _____

Orientador(a)

São Paulo

2016

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T.3330
FMVZ

Souza, Diego Cavalcante de
Efeito da administração de progesterona após a IATF no desenvolvimento do conceito e na taxa de prenhez em búfalas lactantes / Diego Cavalcante de Souza. -- 2016.
75 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2016.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli.

1. *Ovsynch*. 2. P4. 3. CL. 4. Conceito. 5. Búfalas. I. Título.

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Comissão de Ética no Uso de Animais

São Paulo, 13 de abril de 2016

CEUA N 5326030214

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Pietro Sampaio Baruselli

Área: Reprodução Animal

Pietro Sampaio Baruselli (orientador)

Título do projeto: "EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE PROGESTERONA APÓS A IATF NO DESENVOLVIMENTO DO CONCEPTO E NA TAXA DE PRENHEZ EM BÚFALAS LEITEIRAS".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ/USP

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** o Relatório Final (versão de 21/março/2016) do protocolo de estudo acima referenciado.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "1. Os objetivos propostos foram todos cumpridos? Resp: Sim. Os resultados obtidos propiciaram a criação de novos projetos? Resp: Sim. 2. O N amostral proposto inicialmente foi suficiente? Qual o N amostral total alocado? Resp: Foi necessário aumentar o N, no entanto não se conseguiu a quantidade desejada, aumentando de 300 para apenas 337 no experimento 3. No experimento 2 o N foi diminuído de 30 para 24 animais. No entanto, sem prejuízos para a pesquisa. 3. Houve perdas? se sim, quantas? Resp: Não houveram perdas. 4. Ocorreu algum evento adverso durante a condução do estudo? Resp: Apenas dificuldade para se aumentar o N devido a falta de propriedades com número de animais e estrutura adequadas. 5. Resultados já apresentados em congresso? Resp: Sim, resultados parciais foram apresentados em forma de poster na SBTE de 2015. 6. Resultados já publicados? Resp: Sim, resultados parciais publicados em resumo na SBTE de 2015.".

Comentário da CEUA: "".

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SOUZA, Diego Cavalcante de

Título: Efeito da administração de progesterona após a IATF no desenvolvimento do concepto e na taxa de prenhez em búfalas lactantes

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICO

Aos meus pais Raul Soares Pereira de Souza e Selma Júlia Cavalcante de Souza, meus maiores exemplos e fonte de inspiração.

AGRADEÇO

À Deus, pela oportunidade da vida, pela saúde, pelo amadurecimento espiritual e toda proteção durante tanto tempo de estradas percorridas.

Aos meus pais, que deram condições pra que eu pudesse chegar até aqui, através do seu amor, dedicação e ensinamentos.

À minha família, em especial aos meus irmãos Izabella, Rodrigo, Eunice e Renata, meus sobrinhos Ingrid, Julia, Daniel e Laura, que apesar da distância sempre me ajudaram a manter o equilíbrio e a firmeza para continuar.

Ao grande amigo e “irmão” Dr. Nelcio Antonio Tonizza Carvalho, por ser meu maior incentivador e principal responsável pela minha formação profissional. Obrigado por todos os ensinamentos e ajuda. Obrigado por nunca me deixar desistir, mesmo quando tudo parecia impossível.

Ao Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli, pelo exemplo de profissionalismo e trabalho. Obrigado pela orientação do mestrado, pela oportunidade e confiança depositada.

Ao Prof. Dr. Mario Binelli e a Prof. Dra. Paula de Carvalho Papa, pela total atenção em ajudar por meio do conhecimento e disponibilizando materiais e seus laboratórios para execução dos experimentos.

Ao Prof. Dr. Paulo César Maiorka e funcionários do Laboratório de Histologia do VPT-FMVZ/USP, por toda orientação e ajuda no processamento das amostras dos animais abatidos.

A Prof. Dra. Giovana Bertini da UNESP Campos de Registro, pela ajuda e fornecimento de material para realização dos experimentos.

À Dra. Júlia Gleyci Soares, pelo carinho e disposição em ajudar nas infindáveis dúvidas e na realização do experimento.

À Dra. Lais Mendes Vieira, pela imprescindível ajuda nas análises estatísticas e montagem dos resultados, além de todo o conhecimento adquirido.

Aos amigos Antenor e Angela, por compartilhar as dificuldades e nos auxiliar nas coletas e processamentos das amostras dos animais abatidos.

Ao grande amigo José Fernando Simplício de Oliveira, por todo conhecimento transmitido

sobre a bubalinocultura. Obrigado pelos conselhos e ajuda durante toda caminhada juntos.

Aos amigos do departamento, Júlia Soares, Lais Vieira, Manoel Sá Filho, Emiliania Batista, Bruno Moura, Bruno Freitas, Bruna Guerreiro, Bernardo, Evandro, Rodolfo e Adriano, por todos os dias de convívio, aprendizado, viagens, experimentos, discussões... Obrigado por terem contribuído na minha formação profissional, mas acima de tudo, pela amizade.

À equipe de funcionários do VRA-FMVZ/USP, em especial a Harumi, Miguel e Thaís pelo convívio agradável e pelo total empenho em todas as vezes que me ajudaram ao longo do mestrado.

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

Ao Marcos José Moraes, a médica veterinária Jaciara Lima Santos e a todos os funcionários do abatedouro Frigoraes, pela disponibilidade e toda assistência durante o processo de abates dos animais.

Aos fazendeiros José Nakid e Pedro Paulo, pela disponibilidade das fazendas e dos animais para a execução dos nossos experimentos. Muito obrigado!

Aos funcionários das fazendas Rincão, Santa Helena e da UPD de Registro, pelo apoio e paciência durante os experimentos.

Às empresas parceiras Ourofino Agronegócio e Inovare Biotecnologia e Saúde Animal, pelo fornecimento dos hormônios utilizados no estudo.

RESUMO

SOUZA, D. C. de. **Efeito da administração de progesterona após a IATF no desenvolvimento do conceito e na taxa de prenhez em búfalas lactantes.** [Effect of progesterone administration after TAI on the conceptus development and pregnancy rate in lactating buffaloes]. 2016. 75 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

O presente estudo objetivou promover incremento no desenvolvimento do conceito e aumentar a taxa de prenhez de búfalas lactantes por meio da administração de P4 injetável (P4i) três ou seis dias após a IATF. Para tanto, foram conduzidos três experimentos. No Experimento 1, foi aferido o padrão de liberação de P4 por meio da administração de P4i em 8 búfalas ovariectomizadas (delineamento crossover) nas doses 300 ou 600 mg (grupo P300 ou P600, respectivamente). Foram realizadas colheitas de sangue, para posteriores dosagens de P4, nos seguintes períodos: -24, 0, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216 e 240 h da administração da P4i. No Experimento 2, 24 búfalas receberam a aplicação de 10 µg im de GnRH em dia aleatório do ciclo estral (D0). No D7, os animais receberam 0,53 mg im de PGF_{2α}. Após 48 h (D9), foram administrados 10 µg im de GnRH e, 16 h mais tarde, todas as búfalas foram submetidas à IATF (D10). No D13, os animais foram avaliados por ultrassonografia e as fêmeas com ovulação positiva foram distribuídas em 3 grupos: Controle (C; n=8); P4D13 (n=8), que receberam 300mg de P4i no D13 e P4D16 (n=8), que receberam 300 mg de P4i no D16. No D26, as búfalas foram abatidas e os genitais removidos para a realização das seguintes avaliações: diâmetro (DCLa) e peso (PCL) do CL, presença de conceitos íntegros (pCI), íntegros e fragmentados (pCT) e comprimento do conceito (CC). Os CLs e endométrios foram seccionados, fixados e corados para aferir o percentual de células luteínicas pequenas e grandes (SLC e LLC) e o número (GEn), a área (AGEn) e o perímetro (PGEN) das glândulas do endométrio. No Experimento 3, 337 búfalas foram submetidas ao protocolo Ovsynch e, assim como no Experimento 2, as fêmeas ovuladas foram distribuídas em 3 grupos (C, n=81; P4D13, n=84 e P4D16, n=85). Foram avaliadas a funcionalidade (fluxo sanguíneo central – FSC; e periférico – FSP; escore de 0 a 4, em que 0 corresponde à ausência de fluxo e 4 o máximo fluxo) e o diâmetro do CL (DCL) nos D17, D21 e D25 por meio de ultrassonografia em modo color Doppler. Além disso, foram avaliadas por ultrassonografia as taxas de concepção aos 30 (DG30) e 60 (DG60) dias após a

IATF e as perdas gestacionais (PG). Os dados foram analisados utilizando o procedimento GLIMMIX do SAS 9.3. Diferenças com $P \leq 0,05$ foram consideradas significativas e aquelas com $0,05 < P \leq 0,10$ foram consideradas tendência. As concentrações de P4 foram maiores no P600 em relação ao P300 em todos os pontos das colheitas de sangue ($P_{trat} < 0,01$, $P_{tempo} = 0,04$, $P_{trat*tempo} = 0,18$). Verificou-se que as concentrações de P4 permaneceram acima de 1 ng/mL por aproximadamente 3 dias (entre as horas 6 e 72) no grupo P300, o que foi utilizado como critério para a dose de P4i utilizada nos Experimentos 2 e 3. Não houve diferenças entre os grupos para as variáveis avaliadas no Experimento 2: DCLa ($P = 0,39$), PCL ($P = 0,13$), pCI ($P = 0,85$), pCT ($P = 0,41$), CC ($P = 0,19$), SLC ($P = 0,31$), LLC ($P = 0,31$), GEn ($P = 0,28$), AGEn ($P = 0,72$) e PGEn ($P = 0,91$). No Experimento 3, houve interação tratamento*tempo ($P_{trat*tempo}$) para as variáveis FSC ($P < 0,01$), FSP ($P < 0,01$) e DCL ($P = 0,07$). Verificou-se redução do fluxo sanguíneo central e periférico e do diâmetro do CL no P4D13 em relação aos grupos C e P4D16 conforme os momentos de avaliação. Não houve diferença entre os grupos C, P4D13 e P4D16 para o DG30 (56,8 vs. 46,4 vs. 61,2 %; $P = 0,13$) e para a PG (0,0 vs. 10,3 vs. 5,8 %; $P = 0,73$). No entanto, houve menor taxa de concepção no DG60 para o P4D13 em comparação aos C e P4D16 (41,7^b vs. 56,8^a vs. 57,7^a %; $P = 0,07$). Conclui-se que o tratamento com 300 mg de P4i administrados três ou seis dias após a IATF não foi eficiente para aumentar o comprimento do conceito e a taxa de prenhez de búfalas lactantes submetidas à IATF. Ainda, o tratamento com P4i três dias após a IATF reduziu o fluxo sanguíneo central e periférico do CL, o diâmetro do CL e a taxa de prenhez.

Palavras-chave: *Ovsynch*. P4. CL. Concepto. Búfalas.

ABSTRACT

SOUZA, D. C. de. **Effect of progesterone administration after TAI on the conceptus development and pregnancy rate in lactating buffaloes.** [Efeito da administração de progesterona após a IATF no desenvolvimento do conceito e na taxa de prenhez em búfalas lactantes]. 2016. 75 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

The present study aimed to promote improvements on the conceptus development and to increase the pregnancy rate in lactating buffaloes through the administration of injectable P4 (P4i) three or six days after TAI. For this, three experiments were performed. In Experiment 1, was measured the pattern of P4 release by the P4i administration in 8 ovariectomized buffaloes (crossover design) at doses 300 or 600 mg (P300 or P600 group, respectively). Blood samples were collected for subsequent P4 dosages in the following periods: -24, 0, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216 and 240 h of P4i administration. In Experiment 2, 24 buffaloes received the application of 10 µg im GnRH at random day of the estrous cycle (D0). On D7, the animals received 0.53 mg im PGF2α. After 48 h (D9), were administered 10 µg im GnRH and, 16 h later, all buffaloes underwent TAI (D10). In D13, the animals were evaluated by ultrasonography and females with positive ovulation were allocated to one of three groups: Control (C, n=8); P4D13 (n=8) that received 300 mg P4i on D13 and P4D16 (n=8), that received 300 mg P4i on D16. On D26, buffaloes were slaughtered and genitals removed to perform the following assessments: CL diameter (CLDs) and CL weight (CLW), presence of integrate conceptus (pIC), integrate and fragmented (pCT) and the conceptus length (CLe). The CLs and endometrium were sectioned, fixed and stained to assess the percentage of small and large lutein cells (SLC and LLC) and the number (GEn), the area (AGEn) and the perimeter (PGen) of endometrial glands. In Experiment 3, 337 buffaloes were submitted to the Ovsynch protocol and, as well as in Experiment 2, the ovulated females were divided to one of three groups (C, n=81; P4D13, n=84 and P4D16, n=85). The functionality (central blood flow - CBF, and peripheral blood flow - PBF; score from 0 to 4, where 0 corresponds to absence of flow and 4 the maximum flow) and the CL diameter (CLD) were evaluated on D17, D21 and D25 by ultrasonography in color Doppler mode. Furthermore, the conception rates at 30 (CR30) and 60 (CR60) days after TAI, and pregnancy loss (PL) were evaluated by ultrasonography. Data were analyzed using the GLIMMIX procedure of SAS 9.3. Differences were considered significant with $P \leq 0.05$ and those with

0.05<P≤0.10 were considered tendencies. The P4 concentrations were higher in the P600 compared to P300 in all points of blood sampling ($P_{\text{treat}} < 0.01$, $P_{\text{time}} = 0.04$, $P_{\text{treat} \times \text{time}} = 0.18$). It was found that the P4 concentrations remained above 1.0 ng/ml for approximately 3 days (between hours 6 and 72) in the P300 group, which was used as standard for P4i dose used in Experiments 2 and 3. There were no differences between the groups for the variables evaluated in Experiment 2: CLDs ($P = 0.39$), CLW ($P = 0.13$), pCI ($P = 0.85$), pCT ($P = 0.41$), CoLe ($P = 0.19$), SLC ($P = 0.31$), LLC ($P = 0.31$), GEn ($P = 0.28$), AGen ($P = 0.72$) and PGen ($P = 0.91$). In Experiment 3, there was interaction treatment*time ($P_{\text{treat} \times \text{time}}$) for the CBF ($P < 0.01$), PBF ($P < 0.01$) and CLD ($P = 0.07$). There was a reduction of the central blood flow, peripheral blood flow and CL diameter for P4D13 compared to C and P4D16 groups according to the evaluation moments. There was no difference between C, P4D13 and P4D16 groups for the CR30 (56.8 vs. 46.4 vs. 61.2 %; $P = 0.13$) and for the PL (0.0 vs. 10.3 vs. 5.8 %; $P = 0.73$). However, there was lower conception rate in CR60 for P4D13 compared to C and P4D16 (41.7b vs. 56.8a vs. 57.7a %; $P = 0.07$). It was concluded that treatment with 300 mg P4i administered three or six days after TAI was not efficient to increase the conceptus length and the pregnancy rate in lactating buffaloes submitted to TAI. Furthermore, the treatment with P4i three days after TAI reduced the central and the peripheral CL blood flow, the CL diameter and the pregnancy rate.

Keywords: Ovsynch. P4. CL. Conceptus. Buffaloes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Modelo hipotético da resposta de búfalas lactantes submetidas à administração de P4i três ou seis dias após a IATF.....	34
Figura 2 -	Representação esquemática das colheitas de sangue para análise hormonal	37
Figura 3 -	Representação esquemática dos procedimentos realizados no Experimento 2 (US: exame ultrassonográfico).....	41
Figura 4 -	Representação esquemática dos procedimentos realizados no Experimento 3 (US: exame ultrassonográfico; USD: exame ultrassonográfico em modo color Doppler)	45
Figura 5 -	Concentração sérica de P4 em búfalas ovariectomizadas tratadas com diferentes doses de P4i (300 ou 600 mg)	47
Figura 6 -	Imagens de células luteínicas pequenas (setas amarelas) e grandes (setas vermelhas) do CL de búfalas do grupo controle (A) e submetidas à administração de P4i três (B) ou seis (C) dias após a IATF	49
Figura 7 -	Imagens de glândulas (setas vermelhas) e vasos sanguíneos (setas amarelas) do endométrio de búfalas do grupo controle (A) e submetidas à administração de P4i três (B) ou seis (C) dias após a IATF	50
Figura 8 -	Imagens de conceptos íntegros e fragmentados de búfalas do grupo controle (A e B) e submetidas à administração de P4i três (C e D) ou seis (E e F) dias após a IATF	51
Figura 9 -	Fluxo sanguíneo central do CL nos D17, D21 e D25 de búfalas lactantes submetidas à administração de P4i três ou seis dias após a IATF	52
Figura 10 -	Fluxo sanguíneo periférico do CL nos D17, D21 e D25 de búfalas lactantes submetidas à administração de P4i três ou seis dias após a IATF	53
Figura 11 -	Diâmetro do CL nos D17, D21 e D25 de búfalas lactantes submetidas à administração de P4i três ou seis dias após a IATF.....	53
Figura 12 -	Taxa de concepção aos 30 (DG30) e 60 (DG60) dias e perdas gestacionais (PG) de búfalas lactantes submetidas à administração de P4i três ou seis dias após a IATF	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Classificação da funcionalidade do CL de acordo com o Fluxo Sanguíneo Central (FSC) e Periférico (FSP) obtidas por imagens ultrassonográficas em modo color Doppler	44
Tabela 2 -	Diâmetro (DCLa), peso (PCL) e presença de células luteínicas pequenas (SLC) e grandes (LLC) nos CLs; número (GEn), área (AGEn) e perímetro (PGEN) das glândulas de endométrios; presença de conceptos íntegros (pCI), íntegros e fragmentados (pCT) e comprimento dos conceptos íntegros (CC) de búfalas submetidas à administração de P4i três ou seis dias após a IATF	48

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

AGEn – Área das glândulas do endométrio

C – Grupo controle

CC – Comprimento dos conceptos íntegros

CL – Corpo lúteo

D0 – Dia 0 do protocolo

D7 – Dia 7 do protocolo

D9 – Dia 9 do protocolo

D10 – Dia 10 do protocolo

D13 – Dia 13 do protocolo

D16 – Dia 16 do protocolo

D17 – Dia 17 do protocolo

D21 – Dia 21 do protocolo

D25 – Dia 25 do protocolo

D26 – Dia 26 do protocolo

DCL – Diâmetro do corpo lúteo *in vivo*

DCLa – Diâmetro do corpo lúteo após o abate

DFG – Diâmetro do maior folículo

DG30 – Taxa de concepção 30 dias após a inseminação artificial e tempo fixo

DG60 – Taxa de concepção 60 dias após a inseminação artificial em tempo fixo

ECC – Escore de condição corporal

FG – Número de folículos grandes

FM – Número de folículos médios

FSC – Fluxo sanguíneo central

FSP – Fluxo sanguíneo periférico

GEN – Número de glândulas do endométrio

IATF – Inseminação artificial em tempo fixo

im – Intramuscular

LLC – Células luteínicas grandes

P300 – Grupo que recebeu 300 mg de progesterona injetável

P600 – Grupo que recebeu 600 mg de progesterona injetável

P4 – Progesterona

P4i – Progesterona injetável

P4D13 – Grupo que recebeu 300 mg de progesterona injetável no dia 13 do protocolo

P4D16 – Grupo que recebeu 600 mg de progesterona injetável no dia 16 do protocolo

pCI – Presença de conceptos íntegros

PCL – Peso do corpo lúteo após o abate

pCT – Presença de conceptos íntegros e fragmentados

PG – Perdas gestacionais

PGEn – Perímetro das glândulas do endométrio

SLC – Células luteínicas pequenas

US – Exames ultrassonográficos

USD – Exames ultrassonográficos em modo color Doppler

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1	INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO	21
2.2	FORMAÇÃO, MORFOLOGIA DO CORPO LÚTEO E LUTEÓLISE.....	22
2.3	ENDOMÉTRIO	26
2.4	DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E RECONHECIMENTO MATerno DA GESTAÇÃO	27
2.5	A IMPORTÂNCIA DA P4 DURANTE O DIESTRO INICIAL	29
2.6	ESTRATÉGIAS DE SUPLEMENTAÇÃO COM P4 DURANTE O DIESTRO E METAESTRO	30
3	HIPÓTESES	33
4	EXPERIMENTO 1	35
4.1	OBJETIVO ESPECÍFICO.....	35
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	35
4.2.1	Animais e local do experimento	35
4.2.2	Delineamento experimental	35
4.2.3	Colheita de sangue e análise hormonal	36
5	EXPERIMENTO 2	38
5.1	OBJETIVO ESPECÍFICO.....	38
5.2	MATERIAL E MÉTODOS	38
5.2.1	Animais e local do experimento	38
5.2.2	Delineamento experimental	38
5.2.3	Avaliações ultrassonográficas	39
5.2.4	Abate e manipulação dos genitais	39
5.2.5	Procedimentos histológicos	40
6	EXPERIMENTO 3	42
6.1	OBJETIVO ESPECÍFICO.....	42
6.2	MATERIAL E MÉTODOS	42
6.2.1	Animais e local do experimento	42
6.2.2	Delineamento experimental	42
6.2.3	Avaliações ultrassonográficas	43
7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	46
8	RESULTADOS	47

9	DISCUSSÃO	55
10	CONCLUSÃO	59
11	CONSIDERAÇÕES FINAIS E IMPLICAÇÕES PRÁTICAS	60
	REFERÊNCIAS.....	61

1 INTRODUÇÃO

O crescente interesse dos bubalinocultores no desenvolvimento da cadeia produtiva, aliado ao aumento dos rebanhos, fez com que a espécie bubalina tenha se tornado uma fonte viável de produção de proteínas de origem animal. Isto se deve à fácil adaptação dos búfalos às diferentes regiões do mundo. A população bubalina mundial cresceu 24,6% nos últimos 10 anos e, atualmente, é estimada em aproximadamente 195 milhões de cabeças, das quais 110 milhões encontram-se na Índia (FAO, 2015). No Brasil, no mesmo período, a população bubalina aumentou 13,1%, o que demonstra a adaptabilidade da espécie às nossas condições e às possibilidades futuras da bubalinocultura como atividade emergente no país (FAO, 2015).

Entretanto, como ocorre nas demais espécies de interesse zootécnico, o crescimento do rebanho bubalino deve estar associado ao controle da produtividade - que possibilita a identificação dos indivíduos que possuem mérito genético e, conseqüentemente, à multiplicação e à distribuição dos animais melhoradores, o que somente é possível com o auxílio das biotecnologias da reprodução. Se assim conduzida, a bubalinocultura, que atualmente responde por 13,3% da produção mundial de leite (FAO, 2015), tende a se tornar uma atividade econômica cada vez mais atraente sob os pontos de vista econômicos e sociais.

Nesse contexto, a inseminação artificial (IA), que permite a multiplicação de material genético superior de origem paterna, é indispensável para o melhoramento da espécie.

Entretanto, o uso desta técnica de maneira convencional, ou seja, pela observação de cios, se depara com duas dificuldades relevantes na espécie bubalina. A primeira está relacionada ao próprio comportamento estral, que em bubalinos é discreto, dificultando a detecção do estro. A segunda, diretamente ligada ao primeiro fator, é a baixa taxa de serviço obtida em fêmeas bubalinas inseminadas artificialmente, levando ao comprometimento da eficiência reprodutiva do rebanho e ao insucesso dessa tecnologia. Também, é importante ressaltar que bubalinos criados em regiões distantes do equador são sazonais, manifestando atividade reprodutiva durante os meses de outono e inverno (BARUSELLI et al., 2007a, 2009; PORTO-FILHO et al., 2014).

Portanto, a utilização de programas de manejo que não requeiram a identificação do estro contribui para o aumento do uso da IA em rebanhos bubalinos, principalmente devido à facilidade de execução dessa tecnologia. Esses programas utilizam as técnicas de sincronização da fase luteínica do ciclo estral, do crescimento folicular e da ovulação, permitindo assim que a IA seja realizada de forma programada em todos os animais da

fazenda, mesmo naqueles que não manifestam sinais de estro ou ciclicidade (BARUSELLI et al., 2009).

Atualmente é possível sincronizar a ovulação para a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) de búfalas ao longo do ano com eficiência satisfatória, mesmo em países/regiões onde os búfalos apresentam evidente sazonalidade reprodutiva. Com o emprego do protocolo Ovsynch (D0: GnRH; D7: PGF_{2α}; D9: GnRH; IATF 16 horas após a 2ª aplicação de GnRH; BARUSELLI et al., 1999a, b) na estação reprodutiva favorável e do protocolo com progesterona/progestágeno+BE+PGF_{2α}+eCG+hCG/GnRH/BE (BARUSELLI et al., 2003; CARVALHO et al., 2005, 2007a,b, 2012, 2013a,b, 2014) na estação reprodutiva desfavorável é possível obter aproximadamente 50% de taxa de prenhez, tanto no outono e inverno (estação reprodutiva favorável) quanto na primavera e verão (estação reprodutiva desfavorável).

Apesar dos índices reprodutivos satisfatórios obtidos em búfalas sincronizadas com protocolos de IATF, alguns estudos demonstraram altas taxas de perda gestacional em búfalas inseminadas durante a estação reprodutiva desfavorável (CAMPANILE et al., 2010). Ao realizar diagnóstico de gestação 25 dias após a IATF em búfalas criadas na Itália (manejo intensivo e clima temperado), foram verificadas taxas de mortalidade embrionária de 10-45% (entre 25 a 45 dias; CAMPANILE et al., 2005, 2007a,b, 2008, 2013; RUSSO et al., 2010; VECCHIO et al., 2007, 2010) e taxa de mortalidade fetal ao redor de 10-15% (entre 45 a 70 dias; RUSSO et al., 2010; VECCHIO et al., 2007, 2010). No Brasil, com búfalas manejadas em sistema extensivo e sob clima tropical, a incidência de mortalidade embrionária entre 30 e 43 dias foi de 5% e de mortalidade fetal entre 43 e 50 dias de 2% (BARUSELLI et al., 1997b). Esses achados foram inferiores aos verificados na Itália, entretanto, contribuem para redução da eficiência reprodutiva do rebanho.

A mortalidade embrionária precoce pode ser ocasionada por falhas no mecanismo de reconhecimento materno da gestação (MANN; LAMMING, 2001) e a progesterona (P4) está envolvida neste processo. A ação da P4 no endométrio e na criação de um ambiente uterino ideal para o desenvolvimento embrionário é crucial para o estabelecimento e a manutenção da gestação nas espécies domésticas (LONERGAN et al., 2011).

A manipulação farmacológica deste hormônio em momentos específicos do ciclo reprodutivo pode proporcionar melhorias na fertilidade das fêmeas. A suplementação com P4 anteriormente à IA (durante o desenvolvimento folicular) pode aumentar os índices reprodutivos, devido ao seu possível efeito positivo na qualidade oocitária e no ambiente uterino e, conseqüentemente, na qualidade embrionária (BINELLI et al., 2014). Da mesma forma, concentrações ideais de P4 também são necessárias após a IA. De acordo com Diskin e

Morris (2008), baixas concentrações de P4 após a concepção são um dos principais motivos do insucesso no estabelecimento e manutenção da gestação em bovinos (DISKIN; MORRIS, 2008). No entanto, foi verificada luteólise precoce em vacas de corte tratadas com P4 injetável (P4i) dois dias após ovulação (PUGLIESI et al., 2014), o que pode comprometer o estabelecimento de estratégias para o aumento da fertilidade.

Segundo Carter et al. (2008) existe uma “janela” temporal para a administração de P4 após o estro. Estes autores consideram que o período ideal para a utilização deste hormônio seja a partir do terceiro dia do ciclo estral.

Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo principal promover incremento no desenvolvimento do conceito para aumentar a taxa de prenhez de búfalas lactantes por meio da administração de P4i três ou seis dias após a IATF.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO

Um dos principais fatores que prejudicam o desempenho da IA nos bubalinos é a baixa eficiência de detecção do estro. O manejo correto para detecção do estro requer contínuas observações dos animais por profissionais qualificados. Rebanhos com ineficiência na detecção do estro apresentam diminuição no desempenho reprodutivo, com consequente aumento do período de serviço e do intervalo entre partos. Devido a esses entraves, muitos criadores não utilizam essa importante biotecnologia para o melhoramento genético de seus rebanhos (BARUSELLI et al., 2009).

Para facilitar o manejo e aumentar a eficiência da IA foram desenvolvidos protocolos que dispensam a necessidade de detecção do estro (BARUSELLI et al., 2009). 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 IATF (BARUSELLI, 1999; BARUSELLI et al., 1999b, 2000a).

Dentre os protocolos de sincronização do ciclo estral e da ovulação para posterior realização da IATF, o protocolo Ovsynch proporciona taxa de concepção em torno de 50% dos animais tratados dentro da estação reprodutiva favorável (BARUSELLI et al., 1999a,b). Contudo, a taxa de prenhez é influenciada pelo escore de condição corporal (ECC; boa eficiência é alcançada quando $ECC \geq 3,5$ em uma escala de 1 a 5), ordem de partos (primíparas são menos eficientes que multíparas) e período do ano (elevadas taxas de prenhez são obtidas durante a estação reprodutiva favorável – outono e inverno - em comparação à estação reprodutiva desfavorável – primavera e verão (BARUSELLI et al., 1999a,b; CARVALHO; SOARES, 2014).

No protocolo Ovsynch a aplicação de agonista de GnRH resulta na liberação de um pico de LH que promove a ovulação de folículo dominante (BODENSTEINER et al., 1996). Com a ovulação, há emergência de uma nova onda de crescimento folicular (BARUSELLI et al., 2003) e aumento nas concentrações de P4 devido à formação do CL. No Dia 7 do protocolo, preconiza-se a administração de $PGF_{2\alpha}$ para promover a luteólise do CL (BARUSELLI et al., 2003). Uma segunda dose de GnRH é aplicada 48 horas após a administração de $PGF_{2\alpha}$ para promover a sincronização da ovulação e permitir que seja

realizada a IATF 16 horas após a aplicação do GnRH (BERBER et al., 2002).

Durante a estação reprodutiva desfavorável verifica-se elevada incidência de animais em anestro, o que dificulta a resposta ao protocolo Ovsynch (SOUZA et al., 2015). Por esse motivo, alguns estudos utilizando tratamentos com dispositivos intravaginais de P4 associados à administração de eCG, foram desenvolvidos para aumentar as taxas de ovulação e de prenhez após a IATF em búfalas durante a estação reprodutiva desfavorável (BARUSELLI et al., 2002; CARVALHO et al., 2007b). Os protocolos desenvolvidos para búfalas com P4, consistem na inserção de um dispositivo intravaginal de P4 associado à administração intramuscular de benzoato de estradiol (BE) em dia aleatório do ciclo estral (D0). Posteriormente (D9), o dispositivo é removido e são administradas doses intramusculares de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e de eCG. Após 48 horas, a ovulação é induzida pela administração de GnRH. A IATF é realizada 16 horas após a indução da ovulação (BARUSELLI et al., 2003a; CARVALHO et al., 2007b). Carvalho et al. (2012) verificaram também a possibilidade de substituir o indutor da ovulação GnRH (administrado no dia 11 do protocolo) por BE (administrado no dia 10 do protocolo; 24 horas após a retirada dos dispositivo de P4) em búfalas submetidas ao protocolo de sincronização da ovulação e IATF durante a estação reprodutiva desfavorável. Os autores verificaram que o tratamento com o BE resultou em semelhantes taxas de ovulação e de prenhez, o que possibilita a utilização de BE como indutor de ovulação ao final do protocolo.

Atualmente, devido aos estudos supracitados, podemos afirmar que é possível sincronizar a ovulação para a IATF de búfalas ao longo do ano com eficiência satisfatória, mesmo em países/regiões onde os búfalos apresentam evidente sazonalidade reprodutiva.

2.2 FORMAÇÃO, MORFOLOGIA DO CORPO LÚTEO E LUTEÓLISE

O CL participa da maioria dos processos reprodutivos, sendo considerado uma estrutura endócrina transitória, formada a partir do folículo ovulatório e que possui como função primordial a produção de P4. A P4 é responsável pela preparação do endométrio e miométrio para a implantação do conceito, além de ser fundamental na manutenção da gestação inicial. Caso a concepção não ocorra, o CL sofre a regressão, dando início a um novo ciclo estral (WILTBANK, 1994; SAKAMOTO et al., 1995; MILVAE et al., 1996; MILVAE, 2000).

Antes da ovulação, o folículo é organizado em distintas camadas. As células da granulosa e o oócito são separados das outras camadas foliculares pela membrana basal. Acima desta membrana encontram-se a teca interna e externa (MILVAE et al., 1996). Os capilares de vascularização ao redor dos folículos estão presentes na teca interna e externa, mas estão ausentes na camada de células da granulosa, pois, a membrana basal atua como uma barreira para a vascularização. Essa estrutura folicular será modificada pelo LH. Após o pico deste hormônio, ocorrem alterações na parede folicular que resultam no seu rompimento e consequente liberação do oócito, fenômeno caracterizado como ovulação (revisado por BAO; GARVERICK, 1998).

Após a ovulação, ocorre a diferenciação das células foliculares residuais. As células da teca interna, associadas aos capilares atravessam a membrana basal que está rompida (para ovulação) e invadem a camada da granulosa e o tecido folicular remanescente (interiorização e preenchimento do antro, após a expulsão do fluído folicular), levando ao desenvolvimento do CL, que inicia a produção de P4 (NISWENDER et al., 2000).

O CL contém populações de células heterólogas que incluem as grandes células esteroidogênicas luteínicas (LLC – large lutein cells) – células da granulosa luteinizadas - e as pequenas células esteroidogênicas luteínicas (SLC – small lutein cells) – células da teca luteinizadas (FIELDS; FIELDS, 1996). A organização dessas células é espécie-dependente. No caso de mamíferos não-primatas ocorre uma “mistura” dos tipos celulares, com migração das mesmas, o que não é visto no caso de primatas (NISWENDER, 2000). Estes dois tipos celulares perfazem aproximadamente 70% do volume do CL (O’SHEA et al., 1989). As SLCs compreendem 26% das células luteínicas; perfazem aproximadamente 28% do volume do CL, e são conhecidas pela produção de progesterona quando estimuladas pelo LH.

Já as LLCs compreendem apenas 3% das células luteínicas, mas perfazem aproximadamente 40% do volume do CL (FIELDS; FIELDS, 1996) e não são dependentes do LH para secretar progesterona, embora apresentem receptores para este hormônio (CHEGINI et al., 1991). Essas células são responsáveis pela manutenção das concentrações basais de P4 durante todo o ciclo.

Além do tecido folicular diferenciado, durante a reorganização celular para a formação do CL, há a migração de células endoteliais, fibroblastos (CHANNING, 1969) e constituintes do sistema imunológico como os leucócitos (PATE, 1994), misturando-se às LLCs e SLCs.

Um aspecto importante do desenvolvimento do CL inicial é a taxa de crescimento tecidual e proliferação celular. Este crescimento é o resultado de um aumento de tamanho de aproximadamente duas vezes das LLCs (hipertrofia), aumento do número de SLCs,

fibroblastos e células endoteliais (FARIN et al., 1986). Este crescimento explosivo das células luteínicas é semelhante às taxas de desenvolvimento de tumores de rápido crescimento (PARRY et al., 1980).

A proliferação das células endoteliais é um requisito para a neovascularização durante o desenvolvimento luteal, que resulta em extensiva rede de capilares sanguíneos (REDMER; REYNOLDS, 1996). A justaposição existente entre as células luteínicas e os capilares, abastece a alta demanda metabólica do CL, que costuma consumir de duas a seis vezes mais oxigênio por unidade de peso, que outros órgãos, como o fígado, rim e coração (SWANN; BRUCE, 1987). Essa rede também é responsável por carrear os hormônios produzidos pelo referido órgão à circulação.

O CL das búfalas está comumente inserido no estroma ovariano, sendo geralmente menor que o da vaca, podendo atingir o peso de 2,3 g e o diâmetro de 20 mm (ROY; MULLICK, 1964).

De acordo com Moura (2003), o corpo hemorrágico (fase luteínica inicial) possui estrutura lobular bem definida. Os lóbulos possuem uma cavidade central que passa a ser preenchida por células luteínicas e vasos sanguíneos conforme o CL se desenvolve. O CL maduro é marcado pela presença de células luteínicas que apresentam núcleo central, grande e esférico. O CL em regressão apresenta invasão por tecido conjuntivo caracterizado pela desorganização celular e grandes espaços intersticiais; no corpo *albicans* ocorre predomínio de tecido conjuntivo fibroso, raras células luteínicas e escassos vasos sanguíneos.

A densidade vascular no CL de búfalas varia de acordo com o período de desenvolvimento desta estrutura. Há redução de 33% na densidade vascular do CL maduro em relação ao corpo hemorrágico, de 6% entre o CL maduro e o CL em regressão e de 69% entre o CL em regressão e o corpo *albicans* (MOURA, 2003).

O CL durante o ciclo estral nos bovinos é uma estrutura dinâmica com período de vida de aproximadamente de 17-18 dias (OHTANI et al., 1998). Na ausência da prenhez, o CL é submetido à regressão morfológica e funcional (MILVAE et al., 2000). Este processo, denominado luteólise, é caracterizado pela cessação da produção de P4 e perda dos componentes celulares, incluindo redução do suprimento vascular, proliferação do tecido conjuntivo, aumento da desorganização celular, degeneração e fagocitose das células luteínicas (CARLSON et al., 1982; PATE, 1994; MIYAMOTO, 1996).

A $\text{PGF}_{2\alpha}$ endógena é um hormônio derivado do ácido araquidônico e sintetizado principalmente pelas células epiteliais do endométrio (SPINOSA et al., 1997). Sua função principal na reprodução é provocar a regressão do CL, por meio do processo conhecido como

luteólise (TSAI; WILTBANK, 1997). Portanto, pode-se dizer que a $\text{PGF}_{2\alpha}$ é responsável pelo tempo de vida do CL (SPINOSA et al., 1997) causando sua regressão morfológica e funcional (KOTWICA et al., 2002), sendo que o início da regressão funcional precede a regressão morfológica (VIANA et al., 1999). É vastamente conhecido que a $\text{PGF}_{2\alpha}$ liberada no útero é proveniente da ativação da ocitocina luteal via fosfolipase C (BURNS et al., 1997).

Outros pesquisadores acreditam que as gonadotrofinas participam ativamente no desencadeamento da síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pelo útero. Isto porque receptores para gonadotrofinas têm sido encontrados por toda a extensão do trato reprodutivo, como no endométrio, sendo as maiores concentrações destes receptores encontrados durante a fase luteal (SHEMESH, 2001). Desta maneira, o LH (não relacionado ao pico pré-ovulatório) alcança esses receptores, induzindo um aumento da produção de cAMP e inositol fosfato. Esta elevação da concentração do cAMP, desencadeia o aumento das concentrações de cicloxigenase endometrial (COX-2) e seu metabólito ($\text{PGF}_{2\alpha}$). Além destas informações, Stepien et al. (1999) comentam que há uma relação temporal entre o aumento das concentrações de receptores de LH, indução da COX-2 e produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ nas células endometriais em suínos.

Em ruminantes domésticos, somente uma pequena quantidade da $\text{PGF}_{2\alpha}$ uterina alcança o ovário, por difusão da veia uterina para a artéria ovariana (mecanismo denominado de contra corrente), com mais de 95% da $\text{PGF}_{2\alpha}$ sendo metabolizada a componentes inativados como a 15-ceto-13, 14-diidroprostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$, por uma única passagem pelos pulmões (FERREIRA; VANE, 1967).

Ao alcançar o CL, o efeito luteolítico da $\text{PGF}_{2\alpha}$ resultará na associação com os receptores presentes na membrana plasmática das LLCs, iniciando a cascata de rotas intracelulares que resultam na luteólise e, conseqüentemente, na inibição da síntese de progesterona (ANDERSON et al., 2001). Um pulso inicial de prostaglandina, mesmo sendo de baixa magnitude, pode potencialmente iniciar os mecanismos para que as grandes células luteínicas produzam consideráveis concentrações locais de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (TSAI; WILTBANK, 1997). Isto pode explicar porque uma pequena quantidade de $\text{PGF}_{2\alpha}$ uterina é capaz de iniciar a regressão luteal.

Assim, dois mecanismos podem existir para a amplificação dos pulsos de $\text{PGF}_{2\alpha}$. Em primeiro, a $\text{PGF}_{2\alpha}$ uterina pode estimular a liberação de ocitocina pelo CL, a qual estimula a produção de mais $\text{PGF}_{2\alpha}$ uterina dentro de minutos de início do pulso (BAIRD, 1992). Em adição, a $\text{PGF}_{2\alpha}$ uterina pode estimular a produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ intraluteal (TSAI; WILTBANK, 1997).

O decréscimo da concentração de P4 é mais comumente devido à diminuição da capacidade esteroidogênica das LLCs individuais e do fluxo sanguíneo luteal (MILVAE et al., 1996). Entretanto, apesar da intensa investigação sobre o real mecanismo pelo qual a $PGF_{2\alpha}$ causa regressão luteal, este ainda permanece pouco esclarecido (MILVAE, 2000).

2.3 ENDOMÉTRIO

O útero é um órgão altamente capacitado e adaptado a reconhecer e nutrir o conceito, desde a implantação até o parto (HAFEZ, 2000). A parede do útero é dividida em três camadas: a mucosa ou endométrio, a muscular ou miométrio e a serosa ou perimétrio. O endométrio é constituído por duas zonas que diferem em estrutura e função. A camada mais superficial chamada de zona funcional e uma camada mais profunda, a zona basal (PRIEDKALNS; LEISER, 1998).

Em ruminantes, o epitélio de superfície da zona funcional é pseudo-estratificado e/ou cilíndrico simples, podendo ser, em áreas isoladas, cúbico simples (DELLMANN; BROWN, 1982; BANKS, 1992; PRIEDKALNS; LEISER, 1998). As bordas apicais das células cilíndricas possuem microvilosidades, numerosas especializações digitiformes da membrana plasmática que variam de altura de acordo com a atividade secretora do epitélio, apresentando-se mais longas na fase lútea que na fase folicular (STINSON et al., 1962).

O tecido sub-epitelial da região mais superficial da zona funcional (estrato compacto) consiste de tecido conjuntivo frouxo, ricamente vascularizado com muitos fibrócitos, macrófagos e mastócitos, podendo encontrar também neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e plasmócitos. A região mais profunda (estrato esponjoso) dessa zona constitui-se de tecido conjuntivo frouxo, sendo este menos celular. Durante o estro, uma grande quantidade de fluido deposita-se nos espaços teciduais da zona funcional, dando origem ao edema endometrial (PRIEDKALNS; LEISER, 1998).

Em todo o endométrio estão presentes as glândulas uterinas tubulares simples, enoveladas e ramificadas, estando ausentes na região da carúncula em ruminantes (PRIEDKALNS; LEISER, 1998). O epitélio glandular é similar ao luminal, exceto pela presença de cílios na superfície livre de muitas células cilíndricas (STINSON et al., 1962).

O endométrio de búfalas possui quatro camadas semelhantes às aquelas descritas em bovinos: um epitélio de revestimento pseudo-estratificado cilíndrico; um estrato compacto

constituído por tecido conjuntivo denso; estrato esponjoso, onde as glândulas uterinas se ramificam; estrato basal no qual as glândulas uterinas terminam (EL-SHEIKH; ABDELHADI, 1970).

Em búfalas da raça Murrah, Singh e Sharma (1985) observaram glândulas uterinas distribuídas por todo o endométrio, exceto na região das carúnculas, e, em alguns casos, estendidas até o estrato submucoso do miométrio. O número de glândulas superficiais e a altura do epitélio glandular sofreram variação de acordo com as diferentes fases do ciclo estral. Todavia, Janakiraman et al. (1976) verificaram um número maior de glândulas endometriais durante o estro e poucas glândulas na fase lútea do ciclo estral.

Em bovinos e bubalinos, Sundaravadanan e Venkataswamy (1973) verificaram que as modificações uterinas encontradas durante a fase folicular e lútea do ciclo estral estavam relacionadas à espessura e vascularização do endométrio e miométrio e ao crescimento das glândulas uterinas. Singh e Sharma (1985) também notaram que em búfalas, o diâmetro do lúmen glandular foi máximo no meio da fase lútea e mínimo na fase folicular. Em relação às glândulas basais, apresentaram o mesmo comportamento das superficiais quando ao diâmetro e à altura do epitélio glandular, porém não houve variação significativa quanto ao número durante o ciclo estral (SINGH; SHARMA, 1985).

As observações supracitadas se explicam, pois com o início do diestro, sob a influência da progesterona, o endométrio passa de um estágio proliferativo para um secretor, com espessamento do epitélio glandular, além de ramificação, enovelamento e secreção das glândulas. Durante os 11 dias iniciais do diestro, a secreção glandular é grande, mas, se a gestação não acontecer, ocorre regressão das glândulas após a luteólise nos últimos três dias do diestro (PRIEDKALNS; LEISER, 1998). Na vaca, durante os últimos três a quatro dias do diestro, a mucosa regride, com redução da altura do epitélio luminal, e as glândulas uterinas tornam-se curtas com epitélio baixo e sem secreção (PRIEDKALNS; LEISER, 1998).

2.4 DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E RECONHECIMENTO MATERNO DA GESTAÇÃO

O estabelecimento da prenhez em ruminantes domésticos inicia-se no estágio de conceito e inclui a sinalização do reconhecimento materno da prenhez, implantação e

placentação (SPENCER et al., 2007a, 2008). O estágio embrionário de mórula compreende o período de 4 a 6 dias pós-fecundação, e então, forma-se um blastocisto que possui uma massa celular interna e uma blastocela, cercada por uma monocamada de trofotoderma. Após eclodir da zona pelúcida, o blastocisto cresce lentamente em formato tubular ou ovóide e, a partir dessa fase, é denominado concepto (embrião e anexos embrionários; HUE et al., 2012).

O desenvolvimento embrionário em búfalos é mais rápido de 12 à 24 horas em comparação aos bovinos (GASPARRINI, 2002), o que se associa a chegada mais precoce do embrião no útero, em torno de 4 a 5 dias após o estro (ANWAR; ULLAH, 1998). Em búfalas, as mórulas compactas são observadas a partir do dia 5 após o estro e os blastocistos normalmente por volta do dia 6 (NEGLIA et al., 2001). Segundo diferentes estudos nesta espécie, a eclosão do blastocisto ocorre do dia 5 ao dia 7 (ZICARELLI et al., 1993; GASPARRINI, 2002). O alongamento embrionário em búfalos ocorre a partir do dia 13, a fase de pré-fixação do dia 17 ao 24, e a fase de fixação transitória é iniciada por volta do dia 25 (CAMPANILE et al., 2010a).

A fixação do embrião bovino ao endométrio começa aproximadamente no dia 19 e a completa implantação ocorre por volta do dia 42. Tais processos envolvem comunicações ativas e passivas entre o embrião e o útero (THATCHER et al., 2001). A manutenção do CL, como resultado dos sinais embrionários para a mãe, garante a produção continuada de P4, a qual é necessária para preparar o endométrio para a implantação e a nutrição embrionária (BAZER et al., 2008). A presença do concepto por volta do dia 16 do ciclo inibe a síntese e a liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ do endométrio (revisado por GEISERT et al., 1994; MANN et al., 1998; THATCHER et al., 2001; OKUDA et al., 2002), prevenindo assim a luteólise e o consequente declínio na produção de P4.

Falhas no mecanismo de reconhecimento materno da gestação terão como consequência a mortalidade embrionária precoce.

A maioria das perdas gestacionais ocorre durante o período embrionário (<45 dias de gestação) tanto em bovinos de corte e leite (THATCHER et al., 1994; VANROOSE et al., 2000; SREENAN et al., 2001) quanto em bubalinos (BARUSELLI et al., 1997b; CAMPANILE et al., 2005, 2007a,b, 2008, 2013; VECCHIO et al., 2007, 2010; RUSSO et al., 2010). Wathes et al. (1992), verificaram que as mortes embrionárias ocorrem, na sua maioria, nos primeiros dias após a fecundação e durante o processo de implantação, o que reflete em diminuição nas taxas de concepção.

2.5 A IMPORTÂNCIA DA P4 DURANTE O DIESTRO INICIAL

A janela de pré-implantação gestacional em fêmeas bovinas é considerada um momento crucial para determinar o sucesso ou não de uma gestação (SARTORI et al., 2002; DISKIN et al., 2012) e, neste período, o conceito está sob influência do endométrio uterino para o seu desenvolvimento (BAZER et al., 2011). Toda esta regulação endometrial como transcrição, secreção e composição do histotrofo é influenciada pela concentração de P4 durante o momento de pré-implantação (FORDE et al., 2009).

Segundo Lonergan et al. (2011) e O'hara et al. (2014b), o crescimento e o desenvolvimento do conceito requerem a ação da P4 no útero para regular a função endometrial, o que inclui efeitos na composição do fluido uterino, interações conceito-maternais, reconhecimento materno da gestação e receptividade uterina para a implantação embrionária.

Baixas concentrações séricas de P4 foram indicadas como o fator responsável por reduzidas taxas de prenhez observadas em vacas leiteiras de alta produção (DISKIN; MORRIS, 2008). Em contrapartida, concentrações elevadas de P4 no período pós-concepção imediato estão associadas à maior alongamento do conceito (SATTERFIELD et al., 2006; CARTER et al., 2008), com consequente aumento na produção de interferon-tau (IFN- τ ; MANN; LAMMING, 2001) e maiores taxas de prenhez em bovinos e ovinos (MCNEIL et al., 2006).

Durante o reconhecimento materno da gestação, células mononucleares do trofoblasto secretam IFN- τ entre os dias 10 e 25, com máxima produção nos dias 14 a 16 (SPENCER et al., 2004b). Essa proteína apresenta atividade antiviral, regula as células do sistema imune e ativa fatores de transcrição induzindo a expressão de genes (BINELLI et al., 2001).

O IFN- τ produzido liga-se a receptores para interferons nas células endometriais, formando o fator de transcrição que é translocado para o núcleo (BINELLI et al., 2001). Essa ação inibe a transcrição de receptores de estrógeno e de ocitocina no lúmen endometrial e na superfície do epitélio glandular (SPENCER et al., 2007a) e a produção de pulsos de PGF_{2 α} , prevenindo a regressão funcional e estrutural do CL (SPENCER et al., 2007b).

Forde et al. (2011b) revelaram que as alterações que ocorrem na transcrição endometrial são independentes da presença do conceito até o momento do reconhecimento materno e que, após isso, diferentes genes são expressos devido a produção de IFN- τ pelo

concepto.

O efeito antiluteolítico do IFN- τ mantém a secreção de P4 que é essencial para a manutenção de um ambiente uterino ideal para o sucesso no desenvolvimento do concepto até o parto (SPENCER et al., 2004b). Segundo Bazer et al. (2008), o mecanismo de ação pelo qual a progesterona estimula o desenvolvimento embrionário não está bem elucidado, mas evidências indicam que a P4 e os interferons induzem mudanças na expressão de genes endometriais na condução de alterações na composição das células embrionárias para a sobrevivência e desenvolvimento do concepto. Tais mudanças contribuem para a ligação do trofoblasto ao lúmen uterino e à superfície glandular epitelial, além de modificar o fenótipo das células do estroma, suprimir genes para o reconhecimento imune do concepto, alterar a permeabilidade de membrana para melhorar a troca de fatores concepto-maternal, aumentar a vascularização endometrial e ativar genes para transporte de nutrientes no lúmen uterino (BAZER et al., 2008).

Forde et al. (2011a) também observaram em novilhas cíclicas que as alterações temporais na transcrição do endométrio são sensíveis às concentrações de P4 circulante nos primeiros dias após o estro e que, em condições de baixa concentração progesterônica, o ambiente uterino foi prejudicado, reduzindo a habilidade em suportar o alongamento do concepto. Da mesma forma, Campanile et al. (2010a,b) relataram que búfalas com vascularização deficiente do CL apresentaram baixas concentrações séricas de P4, o que resultou em ineficiente preparação do ambiente uterino para o recebimento e desenvolvimento do concepto.

2.6 ESTRATÉGIAS DE SUPLEMENTAÇÃO COM P4 DURANTE O DIESTRO E METAESTRO

A elevação na concentração plasmática de P4 durante o diestro seja indiretamente – pela indução de CL acessório ou de maior volume –, seja diretamente – pela suplementação com P4 exógena –, tem sido avaliada por diversos grupos de pesquisa, objetivando aumentar a eficiência reprodutiva em bovinos e bubalinos.

O'hara et al. (2014b) suplementaram receptoras de embrião bovinas por meio da inserção de um dispositivo intravaginal de liberação lenta de P4 que permaneceu do D3 ao D5 após a observação do estro dos animais. Os blastocistos previamente selecionados foram

transferidos no D7 e ao mensurarem os conceitos 14 dias após o estro, os autores verificaram que, as fêmeas suplementadas apresentaram conceitos aproximadamente cinco vezes maiores aos das não suplementadas. Em estudo similar, Clemente et al. (2009) verificaram aumento de quatro vezes no comprimento do conceito em novilhas com ambiente uterino previamente preparado com elevada concentração de P4 (a partir do D3 do ciclo estral receberam um dispositivo intravaginal de P4 mantido por 12 dias).

Forde et al. (2009) observaram em novilhas suplementadas com dispositivo intravaginal de P4 3 dias após a inseminação, aumento na expressão de genes endometriais associados com a síntese de triglicerídeos e com o transporte de glicose, que podem ser utilizados como fonte de energia para o desenvolvimento do embrião.

Em outros estudos com novilhas, Baruselli et al. (2000b, 2001a) objetivaram a superovulação de receptoras para a inovulação de embriões em tempo fixo, e constataram relação positiva entre o número de CLs, a concentração de P4 e a taxa de concepção após a transferência de embriões congelados.

Em búfalas sincronizadas com o protocolo Ovsynch, Carvalho et al. (2007b), administraram uma dose de GnRH seis dias após a IATF, para a indução da ovulação do folículo dominante da primeira onda de crescimento folicular e a formação de um CL acessório. Os autores verificaram que as fêmeas que receberam GnRH apresentaram maior taxa de prenhez comparado às que não receberam (58,2% vs. 46,5%, $P < 0,05$).

Contudo, a resposta à elevação na concentração plasmática de P4 durante o diestro dependerá do momento em que ocorreu e de quanto foi esta elevação. Pois, de acordo com Binelli et al. (2014), concentrações elevadas de P4 podem tanto modificar o ambiente uterino proporcionando condições ideais ao crescimento e o desenvolvimento do conceito, quanto prejudicar as células luteínicas, causando luteólise precoce.

Monteiro Jr. et al. (2014) suplementaram vacas de leite com apenas um dispositivo intravaginal de P4 introduzido quatro dias após a IA (D4) e mantido até o D17 ou com um segundo dispositivo introduzido no D7 e retirado no D17. Os autores verificaram efeito positivo na prenhez no grupo de animais que recebeu apenas um dispositivo de P4. Monteiro Jr. et al. (2015) também avaliaram o efeito da suplementação de vacas de leite com dispositivo intravaginal de P4 (do D4 ao D20 após a IATF) sobre o volume e a função do CL e não verificaram alterações significativas nesta estrutura, corroborando outros autores (BELTMAN et al., 2009; NASCIMENTO et al., 2013).

Entretanto, Pugliese et al. (2014) verificaram que vacas de corte tratadas com 300 mg de P4i 2 dias após a ovulação apresentaram antecipação da luteólise em 4 dias, comparadas às

vacas não tratadas. Efeito semelhante foi verificado por O'hara et al. (2014a) em novilhas de corte suplementadas com dispositivo intravaginal de P4 do D3 ao D5 ou do D3 ao D7 após o estro.

3 HIPÓTESES

O presente trabalho foi dividido em três experimentos para verificar as seguintes hipóteses:

- As concentrações séricas de progesterona são dose dependente da P4i;
- A administração de P4i três dias após a IATF prejudica a formação e funcionalidade do CL, promove luteólise precoce e aumenta as perdas gestacionais, apesar de melhorar o ambiente uterino e o desenvolvimento do conceito (Figura 1);
- A administração de P4i seis dias após a IATF não influencia a formação e a funcionalidade do CL, melhora o ambiente uterino, o desenvolvimento do conceito e aumenta a taxa de prenhez aos 30 e, por reduzir as perdas gestacionais, aos 60 dias de gestação (Figura 1).

Figura 1 - Modelo hipotético da resposta de búfalas lactantes submetidas à administração de P4i três ou seis dias após a IATF

Fonte: (SOUZA, 2016)

4 EXPERIMENTO 1

4.1 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Aferir o padrão de liberação de P4 por meio da administração de diferentes doses de P4i (300 vs. 600 mg).

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Animais e local do experimento

Este experimento foi conduzido na Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Registro (Polo Regional do Vale do Ribeira – Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios), localizada no estado de São Paulo, Brasil, durante a estação reprodutiva favorável (outono e inverno). Foram utilizadas 8 búfalas ovariectomizadas (*Bubalus bubalis*) da raça Murrah, com idade de $6,8 \pm 0,4$ anos (média $\pm$ erro padrão), apresentando escore de condição corporal (ECC) de $3,8 \pm 0,1$ (escala de 1 a 5, onde 1 = muito magra e 5 = muito gorda) e peso de $689,0 \pm 4,3$ Kg. Os animais foram mantidos sob as mesmas condições de ambiente e alimentação, em sistema de pastejo rotacionado de *Brachiaria brizantha*, com livre acesso à água, e suplementação mineral *ad libitum* em cocho coberto.

4.2.2 Delineamento experimental

Os animais receberam a inserção de um dispositivo intravaginal de progesterona (1g; Sincrogest[®], Ourofino Agronegócio, Brasil) que permaneceu por 10 dias. Após 8 dias da retirada do dispositivo, as búfalas foram divididas aleatoriamente em 2 grupos: P300 (n=4),

que recebeu 300 mg por via intramuscular (im) de P4i (Sincrogest[®] injetável, Ourofino Agronegócio, Brasil) e P600 (n=4), que recebeu 600 mg im de P4i. Após 20 dias, as búfalas foram novamente submetidas a administrações de P4i, no entanto, os animais que haviam recebido 300 mg (P300) passaram a receber 600 mg (P600) e vice-versa (delineamento cross-over: todos os animais utilizados passaram pelos dois tratamentos).

4.2.3 Colheita de sangue e análise hormonal

Amostras de sangue foram colhidas da jugular por venopunção a vácuo, em tubos de 10 ml (Vacutainer[®], Becton-Dickinson e Company, EUA) sem anticoagulante, nos seguintes momentos: -24, 0, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216 e 240 horas da administração da P4i (Figura 2). Durante as colheitas, o sangue foi mantido em temperatura ambiente e transportado ao laboratório dentro de 1 hora da colheita. As amostras foram centrifugadas (3000 g, Centrífuga Excelsa Baby[®], Fanem, Brasil) durante 20 minutos. O soro aliquotado foi acondicionado em tubos esterilizados (Tubos Eppendorf 3810X standard[®], Eppendorf, Alemanha) com identificação e em seguida, armazenado em freezer a -20 °C até o momento da análise das concentrações séricas de P4.

As concentrações séricas de P4 foram analisadas pela técnica de radioimunoensaio, utilizando kits comerciais DPC (Coat-a-Count, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA), por técnica previamente validada por Garbino et al. (2004). O coeficiente de variação entre as amostras (intra-ensaio) foi 2,6% e a sensibilidade do ensaio foi 0,006 ng/mL. Os coeficientes de variação inter-ensaio foram de 6,4 e 0,7 %.

Figura 2 - Representação esquemática das colheitas de sangue para análise hormonal

P300 (n = 8 animais)

P600 (n = 8 animais)

Fonte: (SOUZA, 2016)

5 EXPERIMENTO 2

5.1 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Avaliar alterações histológicas do CL e do endométrio, aferir o diâmetro e o peso do CL e mensurar o comprimento do concepto de búfalas lactantes submetidas à administração de 300 mg de P4i três ou seis dias após a IATF.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Animais e local do experimento

Este experimento foi conduzido na Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Registro, localizada no estado de São Paulo, Brasil, durante a estação reprodutiva favorável. Foram utilizadas 24 búfalas (*Bubalus bubalis*) da raça Murrah, com idade de $7,2 \pm 0,7$ anos, apresentando ECC de $4,3 \pm 0,1$, peso de $586,5 \pm 10,5$ Kg, $2,9 \pm 0,5$ partos e $499,9 \pm 28,7$ dias pós-parto. Os animais foram mantidos sob as mesmas condições de ambiente e alimentação, em sistema de pastejo rotacionado de *Brachiaria brizantha*, com livre acesso à água, e suplementação mineral *ad libitum* em cocho coberto.

5.2.2 Delineamento experimental

Em dia aleatório do ciclo estral (D0), as búfalas receberam a aplicação de 10 µg im de GnRH (Acetato de buserelina, Prorelinn[®], Inovare Biotecnologia e Saúde Animal, Brasil). No D7, foi aplicada a dose de 0,53 mg im de PGF_{2α} (Cloprostenol sódico, Cioprostinn[®], Inovare Biotecnologia e Saúde Animal) em todos os animais. Dois dias após (D9), um nova

dose de 10 µg im de GnRH (Prorelinn[®]) foi administrada em todas as fêmeas e, 16 h mais tarde, as búfalas foram submetidas à IATF (D10). As inseminações foram realizadas pelo mesmo técnico com sêmen proveniente do mesmo touro da raça Murrah (Dhudial MU 1066, CRV Lagoa da Serra) e mesma partida (número 2).

No D13, os animais com ovulação positiva foram divididos em três grupos de acordo com o número de partos, dias pós-parto, ECC, presença de CL no D0 (CLD0) e D9 (CLD9), número de folículos grandes ($\geq 8,0$ mm; FG) e médios (entre 5,0 e 7,9 mm; FM) no D0 e diâmetro do maior folículo (DFG) no D9 e D10, sendo eles: Controle (C; n=8), P4D13 (n=8; 300 mg im de P4i administrada no D13) e P4D16 (n=8; 300 mg im de P4i administrada no D16; Figura 3).

5.2.3 Avaliações ultrassonográficas

Foram realizados exames ultrassonográficos dos ovários (Mindray[®] DP 2200 Vet, China) com transdutor transretal linear de 7,5 MHz. Todas as búfalas foram examinadas no D0 para verificar a atividade ovariana (presença de CL, FG e FM), no D9 para quantificar a taxa de ovulação ao primeiro GnRH (CLD9) e aferir o DFG, que também foi aferido no D10. No D13, foi avaliada a taxa de ovulação ao segundo GnRH (foi considerada ovulação a ausência no D13 do folículo $\geq 8,0$ mm presente nos D9 e D10; Figura 3).

5.2.4 Abate e manipulação dos genitais

Após a última avaliação ultrassonográfica, um brinco numerado foi suturado na vulva das búfalas para a identificação dos genitais.

No D26 as búfalas foram abatidas no Frigorífico Frigoraes, localizado em Cajati - SP. Os tratos genitais das vinte e quatro búfalas foram retirados e acondicionados em gelo.

Posteriormente, o corno uterino ipsilateral ao CL foi submetido à lavagem com 40 ml de solução salina tamponada fosfatada (D-PBS; 0,2g de K₂HPO₄, 8g de NaCl, 0,2g KCl e 1,15g Na₂HPO₄ diluídos em água destilada) e, o efluente foi transferido para placas de Petri

(Corning, Estados Unidos), com dimensões de 100x20 mm, as quais foram avaliadas em Microscópio Estereoscópio (Nova XTD-20, Brasil), em aumento de 20 a 30 vezes. Os conceitos foram localizados (íntegros – pCI; íntegros e fragmentados - pCT) e fotografados (Câmera digital DCS-W180, Sony®, Japão). Após estes procedimentos, foi aferido o comprimento dos conceitos íntegros (CC) com o auxílio do software ImageJ 1.50b (National Institutes of Health, Estados Unidos).

Os CLs foram separados dos ovários por dissecação, colocados em placas de Petri (Corning), com dimensões de 100x20 mm e posicionados sobre uma balança analítica para a pesagem (PCL). Posteriormente, por meio de um paquímetro, foi aferido o diâmetro (DCLa), calculado pela média entre o comprimento e a largura.

Após os procedimentos supracitados, porções do terço médio do endométrio ipsilateral ao CL foram dissecadas e, assim como o CL, acondicionadas em tubos cônicos de 50 ml (BD Falcon®, Estados Unidos) contendo formalina tamponada.

5.2.5 Procedimentos histológicos

Os tecidos lúteos e endometriais acondicionados e fixados permaneceram na formalina tamponada por 24 horas e posteriormente em álcool 70% (armazenada em refrigerador sob temperatura de 2 a 5 °C) até serem encaminhados ao laboratório. Os tecidos foram processados no laboratório de Histologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, onde foram desidratados em concentrações crescentes de álcool e diafanizados em concentrações crescentes de xilol, e incluídos em blocos de parafina. Foram efetuados cortes com 4 µm de espessura, os quais foram fixados em lâmina, corados com Hematoxilina e Eosina e cobertos com lamínula.

Para as análises histológicas, imagens das lâminas do CL foram capturadas por meio de câmera digital (Moticam 580 5.0MP, Motic®, Hong Kong) para a mensuração [efetuada com o auxílio do software ImageJ 1.50b (National Institutes of Health, Estados Unidos)] dos diâmetros de 500 células por animal, com o objetivo de determinar a proporção entre células luteínicas pequenas (SLC; até 20 µm de diâmetro) e grandes (LLC; a partir de 25 µm de diâmetro).

Com a finalidade de quantificar o número de glândulas endometriais (GEn) e de mensurar a área (AGEn) e o perímetro (PGen) destas glândulas, foram utilizadas 10 imagens

de lâminas do endométrio por animal, obtidas por meio de câmera digital (Moticam 580 5.0MP, Motic[®], Hong Kong) e analisadas com o auxílio do software ImageJ 1.50b (National Institutes of Health).

Figura 3 - Representação esquemática dos procedimentos realizados no Experimento 2 (US: exame ultrassonográfico)

Grupo C (n=8)

Grupo P4D13 (n=8)

Grupo P4D16 (n=8)

Fonte: (SOUZA, 2016)

6 EXPERIMENTO 3

6.1 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Aferir aspectos morfofuncionais do CL, a taxa de concepção aos 30 e 60 dias e a perda gestacional de búfalas lactantes submetidas à administração de 300 mg de P4i três ou seis dias após a IATF.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 Animais e local do experimento

Este experimento foi conduzido em três propriedades localizadas nos municípios de Registro (Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Registro e Fazenda Barra do Capinzal) e Sete Barras (Fazenda Santa Helena), estado de São Paulo, Brasil, durante a estação reprodutiva favorável. Foram utilizadas 337 búfalas (*Bubalus bubalis*), com idade de $7,5 \pm 0,1$ anos, apresentando ECC de $3,6 \pm 0,1$, $5,2 \pm 0,1$ partos e $98,1 \pm 3,7$ dias pós-parto. Os animais foram mantidos em pastagens de *Brachiaria spp*, com livre acesso à água, e suplementação mineral *ad libitum*.

6.2.2 Delineamento experimental

As 337 búfalas foram submetidas aos mesmos tratamentos descritos no Experimento 2. No D13, utilizando os mesmos critérios do Experimento 2, os animais com ovulação positiva foram divididos em três grupos: Controle (C; n=81), P4D13 (n=84) e P4D16 (n=85; Figura 4). As 87 búfalas que não ovularam foram excluídas do experimento.

6.2.3 Avaliações ultrassonográficas

As búfalas foram submetidas aos mesmos exames ultrassonográficos realizados no Experimento 2, com a seguinte diferença: avaliações no D40 para a obtenção da taxa de concepção aos 30 dias após a IATF (DG30) e no D70 para quantificar a perda gestacional (PG) e a taxa de concepção final (DG60; Mindray® DP 2200 Vet, China; Figura 4).

Além disso, foram realizados exames ultrassonográficos em modo color Doppler (Mindray® M5Vet, China) para avaliar a funcionalidade (fluxo sanguíneo central – FSC; e periférico – FSP; Escore de 0 a 4, em que 0 corresponde a ausência de fluxo e 4 o máximo fluxo; GINTHER, 2007; PUGLIESI et al. 2014) e o diâmetro do corpo lúteo (DCL) nos D17, D21 e D25 (Tabela 1 e Figura 4).

Tabela 1 - Classificação da funcionalidade do CL de acordo com o Fluxo Sanguíneo Central (FSC) e Periférico (FSP) obtidas por imagens ultrassonográficas em modo color Doppler

Escore	Fluxo Sanguíneo Central	Fluxo Sanguíneo Periférica
0 (0%)
1 (1 a 25%)
2 (26 a 50%)
3 (51 a 75%)
4 (76 a 100%)

Fonte: (GINTHER, 2007; PUGLIESI et al., 2014)

Figura 4 - Representação esquemática dos procedimentos realizados no Experimento 3 (US: exame ultrassonográfico; USD: exame ultrassonográfico em modo color Doppler)

Grupo C (n=81)

Grupo P4D13 (n=84)

Grupo P4D16 (n=85)

Fonte: (SOUZA, 2016)

7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados utilizando o procedimento GLIMMIX do SAS 9.3 (Statistical Analysis Software, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

A concentração sérica de P4 foi analisada utilizando medidas repetidas no tempo, sendo o tratamento considerado efeito fixo e o lote efeito aleatório. Para a VC, VP e DCL o modelo estatístico foi formado pelo efeito de tratamento em delineamento de medidas repetidas no tempo. Para as variáveis resposta pCI, pCT, CC, GEn, AGEn e PGen, o tratamento foi utilizado como efeito fixo. Para análise de SLC, LLC e DCLa e PCL no abate foram considerados como efeito fixo tratamento, DFO e sua interação.

Para as análises, a distribuição binomial foi assumida para as variáveis respostas categóricas. Os dados contínuos foram analisados para normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias utilizando “Guided Data Analysis”, e transformados quando necessário.

Para as análises da taxa de prenhez aos 30 e 60 dias após a IATF e perda gestacional (D70; variáveis com resposta binomial) as variáveis independentes incluídas no modelo inicial foram tratamento (C, P4D13, P4D16), CLD0 (presença ou ausência), ECC (até 3,5 e maior que 3,5), DFO (tercil: 6,96-11,70, 11,75-14,05 e 14,10-25,85) e suas interações. O lote foi considerado efeito aleatório. Ainda, foi utilizado o modelo “backward stepwise regression”, e as variáveis explanatórias foram sequencialmente removidas do modelo estatístico seguindo o critério de Wald se $P > 0,20$.

No modelo final para análise da taxa de concepção aos 30 dias após a IATF, foram mantidos os efeitos tratamento, CLD0, ECC, DFO e interação tratamento e CLD0. Para análise aos 60 dias após a IATF, foram mantidos os efeitos tratamento, CLD0, ECC, DFO e interação tratamento e CLD0. Por fim, para análise da perda gestacional entre 30 e 60 dias de gestação (verificada no D70) foi mantido no modelo final apenas o efeito tratamento.

Os resultados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão médio ou em porcentagem. Diferenças com $P \leq 0,05$ foram consideradas significativas, e aquelas com $0,05 < P \leq 0,10$ foram consideradas tendência.

8 RESULTADOS

No Experimento 1, verificou-se diferença entre os tratamentos ($P=0,0002$; Figura 5). A concentração sérica de P4 foi superior no grupo P600 em comparação ao P300 em todos os momentos da colheita de sangue após a administração da P4i. O tratamento com 300 mg de P4i manteve concentrações séricas de P4 acima de 1 ng/mL por aproximadamente 3 dias (entre as horas 6 e 72).

Figura 5 - Concentração sérica de P4 em búfalas ovariectomizadas tratadas com diferentes doses de P4i (300 ou 600 mg)

Fonte: (SOUZA, 2016)

No Experimento 2, das vinte e quatro búfalas submetidas ao protocolo de sincronização da ovulação e IATF, todas ovularam (100 % de presença de CL no D13) e foram incluídas no experimento. Não foram verificadas diferenças entre os grupos (C, P4D13 e P4D16) para as variáveis analisadas: DCLa ($P=0,39$), PCL ($P=0,13$), SLC ($P=0,31$), LLC ($P=0,31$), GEn ($P=0,28$), AGEn ($P=0,72$), PGen ($P=0,91$), pCI ($P=0,85$), pCT ($P=0,41$) e CC ($P=0,19$; Tabela 2).

Tabela 2 - Diâmetro (DCLa), peso (PCL) e presença de células luteínicas pequenas (SLC) e grandes (LLC) nos CLs; número (GEn), área (AGEn) e perímetro (PGen) das glândulas de endométrios; presença de conceptos íntegros (pCI), íntegros e fragmentados (pCT) e comprimento dos conceptos íntegros (CC) de búfalas submetidas à administração de P4i três ou seis dias após a IATF

	Tratamento			P
	C	P4D13	P4D16	
n	8	8	8	
DCLa, mm	18,3 ± 0,9	17,5 ± 0,7	18,2 ± 0,6	0,39
PCL, g	2,2 ± 0,2	1,95 ± 0,2	2,1 ± 0,2	0,13
SLC, %	83,6	86,7	83,5	0,31
LLC, %	16,5	13,4	16,5	0,31
GEn, n	227,8 ± 30,6	172,5 ± 24,4	200,1 ± 25,8	0,28
AGEn, µm ²	1598,6 ± 173,2	1796,9 ± 185,4	1777,0 ± 227,2	0,72
PGen, µm	160,8 ± 10,3	164,3 ± 7,6	166,4 ± 9,5	0,91
pCI, %	37,5	37,5	50,0	0,85
pCT, %	87,5	62,5	87,5	0,41
CC (n), cm	7,5 ± 2,7 (3)	19,3 ± 7,6 (3)	5,2 ± 1,5 (4)	0,19

Fonte: (SOUZA, 2016)

Imagens de células luteínicas pequenas (SLC) e grandes (LLC), glândulas e vasos sanguíneos endometriais, concepto íntegro e fragmentado, estão ilustradas, respectivamente, nas Figuras 6, 7 e 8.

Figura 6 - Imagens de células luteínicas pequenas (setas amarelas) e grandes (setas vermelhas) do CL de búfalas do grupo controle (A) e submetidas à administração de P4i três (B) ou seis (C) dias após a IATF

Fonte: (SOUZA, 2016)

Figura 7 - Imagens de glândulas (setas vermelhas) e vasos sanguíneos (setas amarelas) do endométrio de búfalas do grupo controle (A) e submetidas à administração de P4i três (B) ou seis (C) dias após a IATF

Fonte: (SOUZA, 2016)

Figura 8 - Imagens de conceitos íntegros e fragmentados de búfalas do grupo controle (A e B) e submetidas à administração de P4i três (C e D) ou seis (E e F) dias após a IATF

Fonte: (SOUZA, 2016)

No Experimento 3, foi verificado efeito de interação (tempo*tratamento) entre a funcionalidade do CL (VC e VP) e o período das avaliações (D17, D21 e D25; Figuras 9 e 10). O grupo P4D13 apresentou redução do escore de VC e VP comparado com o C e o P4D16. Além disso, o P4D13 apresentou menor VC que o C no D21. Verificou-se, também, menor VC no P4D13 comparado aos C e P4D16 no D25 (Figura 9). Com relação à VP, o P4D13 apresentou menor escore que o C e o P4D16 no D21 e D25 (Figura 10). Ao comparar

as avaliações realizadas no D17 e D25, verificou-se diminuição na VP para o P4D13 e aumento nessa variável para o C, não havendo diferença para o P4D16 (Figura 10).

Foi verificada tendência de interação (tempo*tratamento) entre o DCL e o período das avaliações (D17, D21 e D25; Figura 11). O grupo P4D13 apresentou redução do diâmetro do CL comparado com o C e o P4D16.

Figura 9 - Fluxo sanguíneo central do CL nos D17, D21 e D25 de búfalas lactantes submetidas à administração de P4i três ou seis dias após a IATF

a≠b no mesmo tempo quando $P \leq 0,05$
x≠y no mesmo tratamento quando $P \leq 0,05$

Fonte: (SOUZA, 2016)

Figura 10 - Fluxo sanguíneo periférico do CL nos D17, D21 e D25 de búfalas lactantes submetidas à administração de P4i três ou seis dias após a IATF

Fonte: (SOUZA, 2016)

Figura 11 - Diâmetro do CL nos D17, D21 e D25 de búfalas lactantes submetidas à administração de P4i três ou seis dias após a IATF

Fonte: (SOUZA, 2016)

Dos trezentos e trinta e sete animais submetidos ao protocolo de sincronização da ovulação e IATF, duzentos e cinquenta (74,2 %) ovularam (presença de CL no D13). As búfalas que não ovularam (87/337; 25,8%) foram excluídas do experimento. Não houve diferença entre os grupos C, P4D13 e P4D16 para o DG30 [56,8 % (46/81) vs. 46,4 % (39/84) vs. 61,2 % (52/85); $P=0,13$] e para a PG [0,0 % (0/46) vs. 10,3 % (4/39) vs. 5,8 % (3/52); $P=0,73$]. No entanto, houve menor taxa de concepção no DG60 para o P4D13 em comparação aos C e P4D16 [41,7 % (35/84) vs. 56,8 % (46/81) vs. 57,7 % (49/85); $P=0,07$; Figura 12).

Figura 12 - Taxa de concepção aos 30 (DG30) e 60 (DG60) dias e perdas gestacionais (PG) de búfalas lactantes submetidas à administração de P4i três ou seis dias após a IATF

Fonte: (SOUZA, 2016)

9 DISCUSSÃO

As concentrações séricas de P4 verificadas em búfalas ovariectomizadas foram dependentes da dose de P4i, o que confirma a hipótese inicial do presente experimento. Resultado semelhante foi obtido por Pugliesi et al. (2014), que verificaram maiores concentrações séricas de P4 em vacas de corte que receberam suplementação intramuscular com 300 mg comparadas às tratadas com 150 mg de P4i. Souza (2015) também reportou efeito dose dependente nas concentrações plasmáticas de P4 após o tratamento com 300, 600 ou 900 mg de P4i em vacas Holandesas em lactação. Mann et al. (2006) e Monteiro Jr. et al. (2014) observaram concentrações séricas de P4 superiores em vacas de leite de alta produção tratadas com dois dispositivos intravaginais de P4 comparadas às que receberam apenas um dispositivo. Cerri et al. (2009) reportaram que a utilização de dispositivos de P4 novos em vacas de leite determinam concentrações séricas de P4 mais elevadas que dispositivos utilizados previamente por 7 dias. Da mesma forma, Carvalho et al. (2014) constataram que a inserção de dispositivos intravaginais de P4 novos em búfalas ovariectomizadas proporciona concentrações circulantes de P4 mais elevadas que dispositivos utilizados pela segunda e pela terceira vez. Nesse sentido, independente da via de administração (intramuscular ou intravaginal) e da espécie (bovina ou bubalina), a concentração sérica de P4 é dose dependente da fonte exógena deste hormônio.

Entretanto, Garrett et al. (1988 a,b) afirmam que a administração diária de 100 mg de P4i nos 4 primeiros dias do ciclo estral de vacas de corte estimula o endométrio a liberar agentes luteolíticos como a PGF_{2α}. Corroborando essa informação, Pugliesi et al. (2014) verificaram que a exposição do útero a elevadas concentrações de P4 pode desencadear os mecanismos e fatores envolvidos na luteólise, antecipando este processo.

Nesse sentido, e de acordo com os resultados do Experimento 1, foi escolhida a dose de 300 mg de P4i para ser utilizada nos Experimentos 2 e 3, na tentativa de melhorar o ambiente uterino e o desenvolvimento do concepto e de evitar possíveis efeitos negativos como o da antecipação da lúteolise desencadeado pela exposição à elevada concentração de P4 no início do ciclo estral.

Segundo Carter et al. (2008) existe um intervalo de tempo para uso de fonte exógena de P4 após o estro que pode ser determinante para maior receptividade uterina e sucesso gestacional. Estes autores sugerem que o tratamento com dispositivo intravaginal de P4 a

partir do dia 3 do ciclo estral favorece a sobrevivência embrionária. Os autores verificaram que o tratamento com P4 do D3 ao D14 do ciclo estral determinou maior desenvolvimento do conceito. Além disso, os conceitos de maior tamanho produziram superiores quantidades de IFN- τ em relação aos conceitos oriundos das fêmeas não tratadas com P4. Da mesma forma, Souza (2015) sugere que a administração de P4i três dias após a IATF possa promover maior desenvolvimento do conceito, uma vez que este tratamento aumenta a concentração sérica de P4 e não traz prejuízos ao CL.

Souza (2015) reportou que o desenvolvimento e o tamanho do CL de vacas de leite de alta produção não foram alterados pelo tratamento com 900 mg de P4i três dias após a IATF. Carter et al. (2008) também não observaram interferência da administração de fonte exógena de P4, utilizada em novilhas de corte a partir do D3 do ciclo estral e mantida por diferentes períodos (3, 5, 12 ou 14 dias), sobre o tamanho e peso do CL. Contrariamente, a utilização de dispositivos intravaginais de P4 após o estro (D3 a D7) resultou na redução do peso do CL em novilhas de corte (O'HARA et al., 2014a).

No Experimento 2, o tratamento com P4i aos três ou seis dias após a IATF não promoveu mudanças no diâmetro e no peso do CL ou na porcentagem de células luteínicas pequenas (SLC) e grandes (LLC). Horton et al. (1976) avaliaram a porcentagem das LLC e SLC ao longo do ciclo estral e durante a gestação de fêmeas bovinas. Os autores verificaram que, entre os dias 15 e 18 do ciclo, as porcentagens foram respectivamente de 4,5% para as LLC e de 95,4% para as SLC. Em período semelhante, no presente estudo, foram verificadas as seguintes proporções: 16,5% de LLC e 83,5% de SLC.

Segundo alguns autores, as SLC se caracterizam por medirem menos que 20 μ m, produzirem menores quantidades de P4 e serem responsivas ao LH. As LLC medem de 20-30 μ m, produzem maiores quantidades de P4 e deixam de responder a estimulação com LH (KOSS et al., 1981; FITZ et al., 1982). Existem relatos que, em corpos lúteos maduros, algumas SLC são transformadas em LLC (ALILA et al., 1984), aumentando seu número, e consequentemente a produção de P4 (KOSS et al., 1981). Porém, mudanças da proporção de SLC em LLC não foram verificadas entre os grupos experimentais no presente estudo.

No Experimento 3, foi observado que os animais tratados com P4i três dias após a IATF apresentaram diminuição do fluxo sanguíneo central e periférico do CL em comparação aos grupos C e P4D16. Ainda, verificou-se redução do diâmetro do CL no período de avaliação. Esse resultado suporta a hipótese inicial desse estudo. Segundo diversos autores, o fluxo sanguíneo ovariano está altamente relacionado à taxa de secreção de P4. O sistema de

vascularização do CL serve como rota de entrega de substâncias biológicas que fornecem nutrientes para as células luteínicas, principais responsáveis pela secreção de P4 (FRASER; LUNN, 2001; ACOSTA et al., 2003; SCHAMS; BERISHA, 2004; AYRES; MINGOTI, 2012).

Russo et al. (2010) verificaram em búfalas que a função luteínica, mensurada pelas concentrações séricas de P4, não está diretamente relacionada ao tamanho do CL, mas sim ao seu fluxo sanguíneo. Os autores verificaram ainda que animais com maiores taxas de prenhez apresentaram CL com melhor fluxo sanguíneo. Campanile et al. (2010a), também relataram que búfalas com diminuição do fluxo sanguíneo do CL apresentaram maior índice de resistência arterial no dia 25 após a IA, o que foi associado a redução do crescimento fetal e da taxa de prenhez. Estes achados podem explicar a menor taxa de concepção verificada aos 60 dias nas búfalas do presente estudo tratadas com P4i três dias após a IATF em comparação as tratadas seis dias após e às não tratadas.

Diferentes estudos demonstraram que a manipulação da P4 após a IA induz alterações na expressão gênica e no perfil proteico do tecido endometrial, sugerindo que a suplementação com fonte exógena de P4 durante o início da fase luteínica pode ser uma ferramenta interessante para o desenvolvimento embrionário inicial e o reconhecimento materno da gestação (FORDE et al., 2009, 2011a,b). Entretanto, estes achados talvez não tenham ocorrido no presente estudo, pois não foram verificadas alterações nas glândulas endometriais e no desenvolvimento do conceito.

Aires (2003) observou que o diâmetro das glândulas endometriais foi maior em animais sob menor concentração circulante de P4, o que diferiu dos achados de Janakiraman et al. (1976), e de Alboghobeish (2000) que relaram valores maiores para os diâmetros dessas glândulas em búfalas sob maiores concentrações circulantes de P4 durante a fase luteínica do ciclo estral.

Segundo Campanile et al. (2010a), um atraso de 24 horas na secreção de progesterona no início do diestro pode resultar em um ambiente uterino inadequado para o desenvolvimento do embrião em búfalas. Da mesma forma que o atraso na secreção de progesterona é prejudicial ao conceito, a antecipação deste evento poderia causar efeito positivo. Vecchio et al. (2012) verificaram que búfalas gestantes apresentaram maior concentração sérica de P4 entre os dias 5 e 10 após a IA que animais não gestantes.

São conflitantes os dados encontrados na literatura sobre os benefícios dos tratamentos com P4i sobre ambiente uterino e o desenvolvimento do embrião. Também, existem ainda

poucas informações que indiquem o melhor momento e a dose ideal para o tratamento com P4 após a IA.

Alguns estudos apontam efeito positivo da suplementação com P4 na fertilidade. Johnson et al. (1958), verificaram que vacas que receberam subseqüentes doses de 100 mg de P4i nos dias 2, 3, 4, 6 e 9 após a inseminação apresentaram maior taxa de concepção que vacas não tratadas. Em outro estudo, Monteiro Jr. et al. (2014), obtiveram maior taxa de prenhez em vacas leiteiras tratadas no D4 após a IATF com um dispositivo intravaginal de P4 que vacas não tratadas ou tratadas com dois dispositivos intravaginais de P4. Pugliesi et al. (2015) verificaram que o tratamento com 150 mg de P4i 4 dias após a IATF em vacas de corte lactantes em anestro proporcionou aumento na taxa de prenhez em comparação às vacas não tratadas. Porém, esses autores não verificaram diferença na concepção ao realizarem o mesmo tratamento em animais ciclando.

Entretanto, outros estudos evidenciaram redução da fertilidade após o tratamento com progesterona. Parr et al. (2014) verificaram redução na taxa de prenhez em vacas lactantes da raça Holandesa tratadas com um dispositivo intravaginal de P4 entre os dias 4 e 9 após a IA em comparação às vacas não tratadas. Van Cleeff et al. (1996), verificaram resultado semelhante em novilhas da raça Holandesa tratadas por 8 dias com um dispositivo intravaginal de P4 inserido a partir do D1 ou D2 após IATF. No presente estudo, observou-se menor taxa de prenhez aos 60 dias nas búfalas suplementadas com P4i três dias após a IATF, o que pode ser explicada pelo comprometimento no desenvolvimento do CL e antecipação da luteólise nesses animais.

A mortalidade embrionária também pode ser influenciada pelas concentrações circulantes de P4. Vecchio et al. (2010) obtiveram menor incidência de perdas gestacionais em búfalas tratadas com GnRH, hCG ou P4i 25 dias após a IA. No entanto, o presente estudo não se verificou diferença na taxa de perda gestacional entre as búfalas do grupo controle, tratadas com 300 mg de P4i três ou seis dias após a IATF. Tais achados podem ser justificados pelo fato de a P4i não ter proporcionado as esperadas melhoras no ambiente uterino e no desenvolvimento do concepto.

10 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo confirmaram parcialmente as hipóteses propostas, e permitiram concluir que:

- As concentrações séricas de progesterona são dose dependente da P4i, confirmando a hipótese inicial;
- A administração de P4i três dias após a IATF influencia a formação do CL, além de prejudicar a funcionalidade e antecipar a luteólise, com consequente redução da taxa de prenhez aos 60 dias, confirmando a hipótese do experimento. Além disso, este tratamento não altera o ambiente uterino e o desenvolvimento do conceito, contrariando a hipótese;
- A administração de P4i seis dias após a IATF não influencia a estrutura, a formação e a funcionalidade do CL, não antecipa a luteólise, confirmando a hipótese do presente estudo. No entanto, não altera o ambiente uterino, o desenvolvimento do conceito e a taxa de prenhez, o que contraria a hipótese inicial.

11 CONSIDERAÇÕES FINAIS E IMPLICAÇÕES PRÁTICAS

Os resultados do presente estudo são indicativos de que a suplementação com 300 mg de P4i três ou seis dias após IATF em búfalas lactantes não melhora os índices reprodutivos, apesar de promover aumento nas concentrações séricas de P4. Portanto não é indicado o uso da P4 injetável após a IATF na condições estudadas. No entanto, é importante ressaltar a necessidade de novos estudos para a definição do melhor momento e da dose de P4i ideal para ser utilizada após a IA, com o objetivo de promover melhorias no ambiente uterino, no desenvolvimento do concepto e, conseqüentemente, na taxa de prenhez, sem prejuízos à funcionalidade do CL.

O desenvolvimento de tecnologias que permitam incrementar os índices reprodutivos e, conseqüentemente, aumentar a produtividade dos rebanhos é fundamental para o retorno econômico do produtor rural e o fortalecimento da pecuária, seja de corte ou leite, com bovinos ou bubalinos. E é nesse contexto que devemos conduzir nossos trabalhos, almejando sempre contribuir com o aumento da produtividade e da lucratividade do setor.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, T. J.; HAYASHI, K. G.; OHTANI, M.; MIYAMOTO, A. Local changes in blood flow within the preovulatory follicle wall and early corpus luteum in cows. **Reproduction**, v.125, p.759-767, 2003.
- AIRES, M. B. **Aspectos histológicos do útero, tuba uterina e ovário de búfalos (*Bubalus bubalis*)**. 2003. 123 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.
- ALILA, H.W.; HANSEL, W. Origin of difference cell types in the bovine corpus luteum as characterized by specific monoclonal antibodies. **Biology of Reproduction**, v. 31, p. 1015-1015, 1984.
- ALBOGHOBESH, N. Histological changes in endometrium during follicular and luteal phases in water buffalo (*Bubalus bubalis*). **Indian Journal Animal Science**, v. 70, p. 462-464, 2000.
- ANDERSON, L. E.; WU, Y.; TSAI, S.; WILTBANK, M. C. Prostaglandin $F_{2\alpha}$ receptor in the Corpus Luteum: recent information on the gene, messenger ribonucleic acid, and protein. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 1041-1047, 2001.
- ANWAR, M.; ULLAH, N. Early development and location of embryos in the reproductive tract of nili ravi buffalo [*Bubalus bubalis*]: a retrospective analysis. **Theriogenology**, v. 49, p. 1187-1193, 1998.
- AYRES, H.; MINGOTI, G. Z. Angiogênese, vascularização e uso do ultrassom Doppler colorido na avaliação de estruturas ovarianas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 36, p. 174-180, 2012.
- BAIRD, D. T. Luteotropic control of the corpus luteum. **Animal Reproduction Science**, v. 28, p. 95-102, 1992.
- BANKS, W. J. **Histologia veterinária**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1992. 631 p.
- BAO, B.; GARVERICK, H. A. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. **Journal Animal Science**, v. 76, p. 1903-1921, 1998.

BARUSELLI, P. S.; BERNARDES, O.; BRAGA, D. D. A. F.; ARAUJO, D. C.; TONHATI, H. Calving distribution throughout the year in buffalo raised all over Brazil. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 6., 2001, Maracaibo, Venezuela. **Proceedings...** Maracaibo, Venezuela: [s.n.], 2001b.

BARUSELLI, P. S.; CARVALHO, N. A. T.; GIMENES, L. U.; CREPALDI, G. A. Fixed-time artificial insemination in buffalo. **Italian Journal of Animal Science**, v. 6, p. 107-118, 2007a.

BARUSELLI, P. S.; CARVALHO, N. A. T.; HENRIQUEZ, C. H. P.; AMARAL, R.; NICHI, M. Synchronization of ovulation for timed artificial insemination during the off breeding season in the buffalo. In: BUFFALO SYMPOSIUM OF AMERICAS, 1., 2002, Belém. **Proceedings...** Belém: Embrapa/CPATU, 2002. v.1, p. 418-420.

BARUSELLI, P. S.; CARVALHO, N. A. T.; JACOMINI, J. O. Eficiência uso da inseminação artificial em búfalos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 6, p. 104-110, 2009.

BARUSELLI, P. S.; CARVALHO, N. A. T.; NICHI, M.; REICHERT, R. H. Reduction of hCG dosage in a protocol for synchronization of ovulation for timed artificial insemination during the off breeding season in buffalo. In: CONGRESSO NAZIONALE SULL'ALLEVAMENTO DEL BUFFALO, 2., 2003, Roma. **Proceedings...** Roma, 2003. v. 1, p. 261-264.

BARUSELLI, P. S. Inseminação artificial em tempo fixo com sincronização da ovulação em bubalinos. In: BARNABE, W. H.; TONHATI, H.; BARUSELLI, P. S. (Ed.). **Bubalinos: sanidade, reprodução e produção**. Jaboticabal: FUNEP, 1999. p. 126-142.

BARUSELLI, P. S.; MADUREIRA, E. H.; BARNABE, V. H.; BARNABE, R. C.; BERBER, R. C. A.; AMARAL, R. Timed insemination using synchronisation of ovulation in buffalo. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 14., Stockholm. **Proceedings...** Stockholm, 2000. v. 2, p. 4-18.

BARUSELLI, P. S.; MADUREIRA, E. H.; BARNABE, V. H.; BARNABE, R. C.; BERBER, R. C. A. Evaluation of synchronization of ovulation for fixed timed insemination in buffalo (*Bubalus bubalis*). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, p. 12, 2003a.

BARUSELLI, P. S.; MADUREIRA, E. H.; BARNABE, V. H.; BARNABE, R. C.; VISINTIN, J. A.; OLIVEIRA, C. A.; AMARAL, R. Estudo da dinâmica folicular em búfalas

submetidas à sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v. 27, p. 210-210, 1999a.

BARUSELLI, P. S.; MADUREIRA, E. H.; VISINTIN, J. A.; BARNABE, V. H.; BARNABE, R. C.; AMARAL, R. Inseminação artificial em tempo fixo com sincronização da ovulação em bubalinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 23, p. 360-362, 1999b.

BARUSELLI, P. S.; MARQUES, M. O.; MADUREIRA, E. H.; BÓ, G. A.; COSTA NETO, W. P.; GRANDINETTI, R. R. Superestimulação ovariana de receptoras de embriões bovinos visando o aumento de corpos lúteos, concentração de P4 e taxa de prenhez. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v. 28, p. 218-218, 2000b.

BARUSELLI, P. S.; MARQUES, M. O.; MADUREIRA, E. H.; COSTA NETO, W. P.; GRANDINETTI, R. R.; BO, G.A. Increased pregnancy rates in embryo recipients treated with CIDR-B devices. **Theriogenology**, v. 55, p. 355-355, 2001a.

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

BAUERSACHS, S.; ULBRICH, S. E.; REICHENBACH, H. D.; REICHENBACH, M.; BUTTER, M.; MEYER, H. H.; SPENCER, T. E.; MINTEN, M.; SAX, G.; WINTER, G.; WOLF, E. Comparison of the effects of early pregnancy with human interferon, alpha 2 (IFNA2), on gene expression in bovine endometrium. **Biology of Reproduction**, v. 86, p. 46, 2012.

BAZER, F. W.; SPENCER, T. E.; JOHNSON, G. A.; BURGHARDT, R. C. Uterine receptivity to implantation of blastocysts in mammals. **Front Biosci (Schol Ed)**, v. 3, p. 745-767, 2011.

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

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

BERG, D. K.; VAN LEEUWEN, J.; BEAUMONT, S.; BERG, M.; PFEFFER, P. L. Embryo

loss in cattle between days 7 and 16 of pregnancy. **Theriogenology**, v. 73, p. 250-260, 2010.

BINELLI, M.; THATCHER, W. W.; MATTOS, R.; BARUSELLI, P. S. Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. **Theriogenology**, v. 56, p. 1451-1463, 2001.

BINELLI, M.; SARTORI, R.; VASCONCELOS, J. L. M.; MONTEIRO JR, P. L. J.; PEREIRA, M. H. C.; RAMOS, R. S. Evolution in fixed-time: from synchronization of ovulation to improved fertility. **Reproduction in Domestic Ruminants VIII**. Ashby de la Zouch: Context, v. 1, p. 493-506, 2014.

BURNS, P. D.; GRAF, G. A.; HAYES, S. H.; SILVIA, W. J. Cellular mechanisms by which oxytocin stimulates uterine PGF_{2α} synthesis in bovine endometrium: roles of phospholipases C and A₂. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 14, p. 181-191, 1997.

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, 2010b.

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

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

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

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

CAMPANILE, G.; VECCHIO, D.; NEGLIA, G.; BELLA, A.; PRANDI, A.; SENATORE, E. M.; GASPARRINI, B.; PRESICCE, G. A. Effect of season, late embryonic mortality and progesterone production on pregnancy rates in pluriparous buffaloes (*Bubalus bubalis*) after

artificial insemination with sexed semen. **Theriogenology**, v. 79, p. 653–659, 2013.

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

CARLSON, J. A.; BUHR, M.; WENTWORTH, R.; HANSEL, W. Evidence of membrane changes during regression in the bovine corpus luteum. **Endocrinology**, v. 110, p. 1472-1476, 1982.

CARTER, F.; FORDE, N.; DUFFY, P.; WADE, M.; FAIR, T.; CROWE, M. A.; EVANS, A. C.; KENNY, D. A.; ROCHE, J. F.; LONERGAN, P. Effect of increasing progesterone concentration from day 3 of pregnancy on subsequent embryo survival and development in beef heifers. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 20, p. 367-375, 2008.

CARVALHO, N. A. T.; CARVALHO, M. V.; VISINTIN, J. A.; VANNUCCI, F. S.; SÁFILHO, M. F.; NICHI, M.; REICHERT, R. H.; BARUSELLI, P. S. Uso de dispositivos intravaginais de progesterona associados ao hCG ou GnRH para sincronização da ovulação em búfalas na estação reprodutiva desfavorável. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16., 2005, Goiânia, GO. **Anais...** 2005. (CD-ROM).

CARVALHO, N. A. T.; NAGASAKU, E. M.; VANNUCCI, F. S.; TOLEDO, L. M.; BARUSELLI, P. S. Ovulation and conception rate according intravaginal progesterone device and hCG or GnRH to induce ovulation in buffalo during the off breeding season. **Italian Journal of Animal Science**, v. 6, n. 2, p. 646-648, 2007b. Trabalho apresentado no 8th World Buffalo Congress, 2007, Caserta.

CARVALHO, N. A. T.; SOARES, J. G. Inseminación artificial en búfalas, In: GONZÁLEZ-STAGNARO, C.; SOTO BELLOSO, E.; MADRID-BURY, N. (Ed.). **Logros & desafíos de la ganadería doble propósito**. Maracaibo, Venezuela: Fundación GIRARZ, 2014. cap. 82, p. 765-773.

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

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

CARVALHO, N. A. T.; SOARES, J. G.; REIS, E. L.; VANNUCCI, F. S.; SALES, J. N. S.; BARUSELLI, P. S. Use of different progestagens for ovulation synchronization and TAI in buffaloes during the non breeding season. **Buffalo Bulletin**, v. 32, p. 527-531, 2013b.

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

CERRI, R. L. A.; RUTIGLIANO, H. M.; BRUNO, R. G. S.; SANTOS, J. E. P. Progesterone concentration, follicular development and induction of cyclicity in dairy cows receiving intravaginal progesterone inserts. **Animal Reproduction Science**, v. 110, p. 56-70, 2009.

CHANNING, C. P. Steroidogenesis and morphology of human ovarian cell types in tissue culture. **Journal of Endocrinology**, v. 45, p. 297-308, 1969.

CHEGINI, N.; LEI, M.; RAO, C. V.; HANSEL, W. Cellular distribution and cycle phase dependence of gonadotropin and eicosanoid binding sites in bovine corpora lútea. **Biology of Reproduction**, v. 45, p. 506-513, 1991.

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

DELLMANN, H. D.; BROWN, E. M. **Histologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982. p. 397.

DE RENSIS, F.; RONCI, G.; GUARNERI, P.; NGUYEN, B. X.; PRESICCE, G. A.; HUSZENICZA, G. 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.; MURPHY, J. J.; SCREENAN, J. M. Embryo survival in dairy cows managed under pastoral conditions. **Animal Reproduction Science**, v. 96, p. 297-311, 2006.

DISKIN, M. G.; MORRIS, D. G. Embryonic and early foetal losses in attle and other ruminants. **Reproduction Domestic Animals**, v. 43, p. 260-267, 2008.

DISKIN, M. G.; PARR, M. H.; MORRIS, D. G. Embryo death in cattle: an update. **Reproduction Fertility and Development**, v. 24, p. 244-251, 2012.

EL-SHEIKH, A. S.; ABDELHADI, H. A. Anatomy and histology of the reproductive tract in the Egyptian buffalo. **Indian Journal Animal Science**, v. 40, p. 213-222, 1970.

FARIN, C. E.; MOELLER, C. L.; SAWYER, H. R.; GAMBONI, F.; NISWENDER, G. D. Morphometric analysis of cell types in the bovine corpus luteum throughout the estrous cycle. **Biology of Reproduction**, v. 35, p. 1299-1308, 1986.

FERREIRA, S. A.; VANE, J. R. Prostaglandins: their disappearance from and release into the circulation. **Nature**, v. 216, p. 868-873, 1967.

FIELDS, M. J.; FIELDS, P. A. Morphological characteristics of the bovine corpus luteum during the estrous and pregnancy. **Theriogenology**, v. 45, p. 1295-1325, 1996.

FITZ, A.; MAYAN, M. H.; SAWYER, H. R. Characterization of two steroidogenic cell types in the ovine corpus luteum. **Biology of Reproduction**, v. 27, p. 703-722, 1982.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). **Agriculture data**. 2015. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/home/E>>. Acesso em: 28 dez. 2015.

FORDE, N.; BELTMAN, M. E.; DUFFY, G. B.; METHA, J. P.; O'GAORA, P.; ROCHE, J. F.; LONERGAN, P.; CROWE, M. A. Changes in the endometrial transcriptome during the bovine estrous cycle: effect of low circulating progesterone and consequences for conceptus elongation. **Biology of Reproduction**, v. 84, p. 266-278, 2011a.

FORDE, N.; CARTER, F.; FAIR, T.; CROWE, M. A.; EVANS, A. C. O.; SPENCER, T. E.; BAZER, F. W.; MCBRIDE, R.; BOLAND, M. P.; O'GAORA, P.; LONERGAN, P.; ROCHE, J. F. Progesterone-regulated changes in endometrial gene expression contribute to advanced conceptus development in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 81, p. 784-794, 2009.

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

FRASER, H. M.; LUNN, S. F. Regulation and manipulation of angiogenesis in the primate corpus luteum. **Reproduction**, v. 121, p. 355-362, 2001.

GARBINO, E. J.; HERNANDEZ, J. A.; SHEARER, J. K.; RISCO, C. A.; THATCHER, W.W. Effect of lameness on ovarian activity in postpartum Holstein cows. **Journal Dairy Science**, v. 87, p. 4123–4131, 2004.

GARRETT, J. E.; GEISERT, R. D.; ZAVY, M. T.; GRIES, L. K.; WETTEMANN, R. P.; BUCHANAN, D. S. Effect of exogenous progesterone on prostaglandin F2a release and the interestrous interval in the bovine. **Prostaglandins**, v. 36, p. 85–96, 1988a.

GARRETT, J. E.; GEISERT, R. D.; ZAVY, M. T.; MORGAN, G. L. Evidence for maternal regulation of early conceptus growth and development in beef cattle. **Journal Reproduction Fertility**, v. 84, p. 437–446, 1988b.

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

GEISERT, R. D.; SHORT, E. C.; MORGAN, G. L. Establishment of pregnancy in domestic species. **Embryonic mortality in domestic species**. Florida: C.R.C. Press, 1994. p.23-53.

GINTHER, O.J. Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction: Book 4, Color-Doppler Ultrasonography. **Equiservices Publishing**, Cross Palins, WI, 2007.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. Anatomy of female reproduction. In: HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. (Ed.). **Reproduction in farm animals**. Philadelphia: Lipincott Williams & Wilkins, 2000. p. 13-27.

HORTON, E. W.; POYSER, N. L. Uterine luteolytic hormone, a physiological role for prostaglandin F2alpha. **Physiological Reviews**, v. 56, p. 595-651, 1976.

HUE, I.; DEGRELLE, S. A.; TURENNE, N. Conceptus elongation in cattle: genes, models and questions. **Animal Reproduction Science**, v. 134, p. 19-28, 2012.

JANAKIRAMAN, P.M.; ZALA, P.M.; SAROJINI, C.K. Uterine endometrial gland characteristics during estrous cycle in the water buffalo. **Indian Veterinary Journal**, v.53, p.190-193, 1976.

JOHNSON, K. R. Effect of 17 alpha-hydroxyprogesterone 17-necaproate on the reproductive performance of cattle. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 71, p. 577–579, 1958.

KOSS, R. D.; HANSEL, W. The large small cell of the bovine corpus luteum, ultrastructural and functional differences. In: **Schwartz, N. B.; M. Hunzicker-Dunn Dynamics of Ovarian Function**, edited by. New York, p.197-203, 1981.

KOTWICA, J.; BOGACKI, M.; REKAWIECKI, R. Neural regulation of the bovine corpus luteum. **Domestic animal Endocrinology**, v. 5341, p. 1-10, 2002.

LONERGAN, L. Influence of progesterone on oocyte quality and embryo development in cows. **Theriogenology**, v. 76, p. 1594-1601, 2011.

MANN, G. E.; FRAY, M. D.; LAMMING, G. E. Effects of time of progesterone supplementation on embryo development and interferon-tau production in the cow. **The Veterinary Journal**, v. 171, p. 500-503, 2006.

MANN, G. E.; LAMMING, G. E. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. **Reproduction**, v. 121, p. 175-180, 2001.

MCNEIL, R. E.; DISKIN, M. G.; SREENAN, J. M.; MORRIS, D. G. Associations between milk progesterone concentration on different days and with embryo survival during the early luteal phase in dairy cows. **Theriogenology**, v. 65, p. 1435-1441, 2006.

MILVAE, R. A. Inter-relationships between endothelin and prostaglandinF2 α in corpus luteum function. **Reviews of Reproduction**, v. 5, p. 1-5, 2000.

MILVAE, R.A.; HINCKLEY, S.T.; CARLON, J.C. Luteotropic and luteolytic mechanisms in the bovine corpus luteum. **Theriogenology**, v.45, p.1327-1349, 1996.

MIYAMOTO, A. Intraluteal mechanisms involved in prostaglandinF2 α -induced luteolysis in Ewes. **Journal of Reproduction and Development**, v. 42, p. 61-63, 1996.

MONTEIRO JR, P. L. J.; NASCIMENTO, A. B.; PONTES, G. C. S.; FERNANDES, G. O.; MELO, L. F.; WILTBANK, M. C.; SARTORI, R. Progesterone supplementation after ovulation: Effects on corpus luteum function and on fertility of dairy cows subjected to AI or ET. **Theriogenology**, v. 84, p. 1215-1224, 2015.

MONTEIRO JR., P. L. J.; RIBEIRO, E. S.; MACIEL, R. P.; DIAS, A. L. G.; SOLÉ JR., E.; LIMA, F. S.; BISINOTTO, R. S.; THATCHER, W. W.; SATORI, R.; SANTOS, J. E. P. Effects of supplemental progesterone after artificial insemination on expression of interferon-stimulated genes and fertility in dairy cows”. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p. 4907-4921, 2014.

MOURA, C. E. B. **Expressão do VEGF do corpo lúteo de búfalos**. 2003.122 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

NASCIMENTO, A. B.; SOUZA, A. H.; GUENTHER, J. N.; COSTA, F. P. D.; SARTORI, R.; WILTBANK, M. C. Effects of treatment with human chorionic gonadotropin or intravaginal progesterone releasing device after AI on circulating progesterone concentrations in lactating dairy cows. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 25, p. 818-824, 2013.

NEGLIA, G.; GASPARRINI, B.; CARACCIOLO DI BRIENZA, V.; PRESICCE, G. A.; ZICARELLI, L. Buffalo and Bovine in vitro embryo production from ovum pick up and abattoir derived oocytes. In: ASSOCIAZIONE SCIENTIFICA DI PRODUZIONE ANIMALE, CONGRESS, 24., 2001, Florence, Italy. **Proceedings...** Florence, Italy, 2001. p. 624–626.

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

NISWENDER, G. D.; JUENGEL, J. L.; SILVA, P. J.; ROLLYNSON, M. K.; MCINTUSH, E. W. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. **Physiological Reviews**, v. 80, p. 1-29, 2000.

O’HARA, L.; FORDE, N.; CARTER, F.; RIZOS, D.; MAILLO, V.; EALY, A.D.; KELLY, A.K.; RODRIGUEZ, P.; ISAKA, N.; EVANS, A.C.; LONERGAN, P. Paradoxical effect of supplementary progesterone between Day 3 and Day 7 on corpus luteum function and conceptus development in cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v.26, p.328-336, 2014a.

O’HARA, L.; FORDE, N.; KELLY, A. K.; LONERGAN P. Effect of bovine blastocyst size at embryo transfer on day 7 on conceptus length on day 14: Can supplementary progesterone rescue small embryos? **Theriogenology**, v. 81, p. 1123–1128, 2014b.

OHTANI, M.; KOBAYASHI, S.; MIYAMOTO, A.; HAYASHI, K.; FUKUI, Y. Real-time relationships between intraluteal and plasma concentrations of endothelin, oxytocin, and

progesterone during prostaglandinF 2α - induced luteolysis in the cow. **Biology of Reproduction**, v. 58, p. 103-108, 1998.

OKUDA, K.; MIYAMOTO, Y.; SKARZYNSKI, D. J. Regulation of endometrial prostaglandin F(2 α) synthesis during luteolysis and early pregnancy in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, p. 255-264, 2002.

O'SHEA, J. D.; RODGERS, R. J.; D'OCCHIO, M. J. Cellular composition of the cyclic corpus luteum of the cow. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 85, p. 483-487, 1989.

PARR, M. H.; CROWE, M. A.; LONERGAN, P.; EVANS, A. C.; RIZOS, D.; DISKIN, M. G. Effect of exogenous progesterone supplementation in the early luteal phase post-insemination on pregnancy per artificial insemination in Holstein-Friesian cows. **Animal Reproduction Science**, v. 150, p. 7-14, 2014.

PARRY, D. M.; WILLCOX, D. L.; THORBURN, G. D. Ultrastructural and cytochemical study of the bovine corpus luteum. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 60, p. 349-357, 1980.

PATE, J. L. Cellular components involved in luteolysis. **Journal Animal Science**, v. 72, p. 1884-1890, 1994.

PORTO-FILHO, R. M.; GIMENES, L. U.; MONTEIRO, B. M.; CARVALHO, N. A. T.; GHUMAN, S. P. S.; MADUREIRA, E. H.; BARUSELLI, P. S. Detection of estrous behavior in buffalo heifers by radiotelemetry following PGF 2α administration during the early or late luteal phase. **Animal Reproduction Science**, v. 144, p. 90-94, 2014.

PRIEDKALNS, J.; LEISER, R. Female reproductive system. In: DELLMANN, H. T.; EURELL, J. A. C. (Ed.). **Textbook of veterinary histology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1998. p. 247-69.

PUGLIESI, G.; OLIVEIRA, M. L.; SCOLARI, S. C.; LOPES, E.; PINAFFI, F. V.; MIAGAWA, B. T.; PAIVA, Y. N.; MAIO, J. R. G.; NOGUEIRA, G. P.; BINELLI, M. Corpus luteum development and function after supplementation of long-acting progesterone during the early luteal phase in beef cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, p. 85-91, 2014.

REDMER, D. A.; REYNOLDS, L. P. Angiogenesis in the ovary. **Reviews of Reproduction**, v. 1, p. 182-192, 1996.

ROY, D. J.; MULLICK, D. N. Endocrine functions of corpus luteum of buffaloes during estrus cycle. **Endocrinology**, v. 75, p. 284-7, 1964.

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

SAKAMOTO, K.; MIWA, K.; EZASHI, T.; OKUDA-ASHITAKA, E.; OKUDA, K.; HOUTANI, T.; SUGIMOTO, T.; ITO, S.; HAYAISHI, O. Expression of mRNA encoding the prostaglandinF2 α receptor in bovine corpora lutea throughout the oestrous cycle and pregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 103, p. 99-105, 1995.

SARTORI, R.; ROSA, G. J. M.; WILTBANK, M. C. Ovarian Structures and circulating steroids in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 2813-2822, 2002.

SATTERFIELD, M.C.; BAZER, F.W.; SPENCER, T.E. Progesterone regulation of preimplantation conceptus growth and galectin 15 (LGALS15) in the ovine uterus. **Biology of Reproduction**, v.75, p.289-296, 2006.

SCHAMS, D.; BERISHA, B. Regulation of corpus luteum function in cattle-an overview. **Reproduction Domestic Animal**, v. 39, p. 241-251, 2004.

SHEMESH, M. Actions of gonadotropins on the uterus. **Reproduction**, v. 121, p. 835-842, 2001.

SINGH, H.; SHARMA, D.N. Histomorphology of buffalo endometrial glands during different phases of oestrus cycle. **Indian Veterinary Journal**, v. 62, p. 762-765, 1985.

SOUZA, D. C.; CARVALHO, N. A. T.; SOARES, J. G.; MONTEIRO, B. M.; MADUREIRA, E. H.; BARUSELLI, P. S. Effect of the presence of corpus luteum in lactating buffaloes on the response to the Ovsynch protocol during the breeding season (preliminary results). **Animal Reproduction**, v. 12, p. 629-629, 2015.

SOUZA, E. D. F. **Efeito da progesterona injetável de longa ação na função luteínica e na taxa de concepção de vacas Holandesas de alta produção submetidas à IATF**. 2015. 68 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

SOUZA, E. D. F.; SALA, R. V.; ORTOLAN, M. D. D. V.; AZRAK, A. J.; MAIO, J. R. G.; TEIXEIRA, A. A.; BASTOS, M. R.; SALES, J. N. S.; BARUSELLI, P. S. Effects of exogenous progesterone on luteal function of high production dairy cows. **Animal Reproduction**, v. 10, p. 446-446, 2013.

SPENCER, T. E.; JOHNSON, G. A.; BAZER, F. W.; BURGHARDT, R. C. Fetal-maternal interactions during the establishment of pregnancy in ruminants. **Society of Reproduction and Fertility supplement**, v. 64, p. 379-396, 2007a.

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

SPENCER, T. E.; JOHNSON, G. A.; BURGHARDT, R. C.; BAZER, F. W. Progesterone and placental hormone actions on the uterus: insights from domestic animals. **Biology of Reproduction**, v. 71, p. 2-10, 2004b.

SPENCER, T. E.; SANDRA, O.; WOLF, E. Genes involved in conceptus-endometrial interactions in ruminants: insights from reductionism and thoughts on holistic approaches. **Reproduction**, v.135, p. 165-179, 2008.

SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. p. 545.

SREENAN, J. M.; DISKIN, M. G.; MORRIS, D. G. Embryo survival rate in cattle: a major limitation to the achievement of high fertility. **Fertility in the high producing dairy cow. 26 Occasional Publication of British Society of Animal Science**, v. 26, p. 93-104, 2001.

STĘPIEN, A.; SŁEMIECH, M.; ZIECIK, A. J. Luteinizing hormone receptor kinetic and LH induced prostaglandin production throughout the oestrous cycle in porcine endometrium. **Reproduction Nutrition and Development**, v. 39, p. 663-674, 1999.

STINSON, A. W.; WEBER, A. F.; ZEMJANIS, R. The bovine endometrium-an electron microscopy study. **American Journal of Veterinary Research**, v. 97, p. 1164-82, 1962.

SUNDARAVADANAN, V. K.; VENKATASWAMY, V. Histology and histochemistry of bovine uterus. **Indian Journal Animal Science**, v. 43, p. 1050-1053, 1973.

SWAN, R. T.; BRUCE, N. W. Oxygen consumption, carbon dioxide production and progesterone secretion in the intact rat ovary of the day-16 pregnant rat. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 30, p. 599-605, 1987.

THATCHER, W. W.; BINELLI, M.; ARNOLD, D.; MATTOS, R.; BADINGA, L.; MOREIRA, F.; STAPLES, C. R.; GUZELOGLU, A. Endocrine and physiological events from ovulation to establishment of pregnancy in cattle. **In: Fertility in the high producing dairy cow. 26 Occasional Publication of British Society of Animal Science**, v. 26, p. 81-91, 2001.

THATCHER, W. W.; STAPLES, C. R.; DANET-DESNOYERS, G.; OLDICK, B.; SCHMITT E.P. Embryo health and mortality in sheep and cattle. **Journal of Animal Science**, v. 72, p. 16-30, 1994. Supplement 3.

TSAL, S.; WILTBANK, M. C. Prostaglandin $F_{2\alpha}$ induces expression of prostaglandin G/H Synthase-2 in the ovine corpus luteum: a potential positive feedback loop during luteolysis. **Biology of Reproduction**, v. 57, p. 1016-1022, 1997.

VANROOSE, G.; DE KRUIF, A.; VAN SOOM, A. Embryonic mortality and embryo-pathogen interactions. **Animal Reproduction Science**, v. 60, p. 131-143, 2000.

VAN CLEEFF, J.; MACMILLAN, K. L.; DROST, M.; LUCY, M. C.; THATCHER, W. W. Effects of administering progesterone at select intervals after insemination of synchronized heifers on pregnancy rates and resynchronization of returns to service. **Theriogenology**, v. 46, p. 1117-1130, 1996.

VAN WERVEN, T.; WALDECK, F.; SOUZA, A. H.; FLOCH, S.; ENGLEBIENNE, M. Comparison of two intravaginal progesterone releasing devices (PRID-Delta vs CIDR) in dairy cows: Blood progesterone profile and field fertility. **Animal Reproduction Science**, v. 138, p. 143-149, 2013.

VIANA, J. H. M.; FERREIRA, A. M.; SÁ, W. F.; CAMARGO, L. S. A. Regressão luteal e dinâmica folicular após luteólise natural ou induzida por cloprostenol em vacas da raça Gir. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, p. 257-262, 1999.

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

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

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

WATHES, D.C. Embryonic mortality and the uterine environment. **The Journal of Endocrinology**, v.134, p.321-325, 1992.

WILTBANK, M. C. J. Cell types and hormonal mechanisms associated with mid-cycle corpus luteum function. **Journal Animal Science**, v. 72, p. 1873-1883, 1994.

ZICARELLI, L.; DI PALO, R.; PALLADINO, M.; CAMPANILE, G.; ESPOSITO, L.; Embryo transfer in Mediterranean Bubalus bubalis. **In: Proc. INTERNATIONAL SYMPOSIUM PROSPECTS OF BUFFALO PRODUCTION IN THE MEDITERRANEAN AND THE MIDDLE EAST**, Cairo, Egypt. **Proceedings...** Cairo, Egypt, 1993. p.73–75.