

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA
DEPARTAMENTO DAS CLÍNICAS VETERINÁRIAS

RENATTA SILVA MELO

**CICLICIDADE EM FÊMEAS BUBALINAS (*BUBALUS BUBALIS*) NAS ESTAÇÕES
REPRODUTIVAS**

SÃO LUÍS-MA
2016

RENATTA SILVA MELO

**CICLICIDADE EM FÊMEAS BUBALINAS (*BUBALUS BUBALIS*) NAS ESTAÇÕES
REPRODUTIVAS**

Trabalho de conclusão de curso, apresentado ao departamento de estágio e monografia da Universidade Estadual do Maranhão, como requisito parcial para conclusão do curso de bacharelado em Medicina Veterinária.

Orientador: RICARDO DE MACÊDO CHAVES

SÃO LUÍS-MA

2016

Melo, Renatta Silva

Ciclicidade em fêmeas bubalinas (*Bubalus bubalis*) nas estações reprodutivas/
Renatta Silva Melo – São Luís, 2016.

40f

Monografia (Graduação) – Curso de Medicina Veterinária, Universidade
Estadual do Maranhão, 2016.

Orientador: Prof. Ricardo de Macêdo Chaves

1.*Bubalus bubalis*. 2.Multíparas.3.Escore corporal.4. Escore ovariano.I.Titulo

CDU: 636.082:636.293.4

RENATTA SILVA MELO

**CICLICIDADE EM FÊMEAS BUBALINAS (*BUBALUS BUBALIS*) NAS ESTAÇÕES
REPRODUTIVAS**

Aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ricardo de Macêdo Chaves
Orientador

Prof. MSc. Cícero Soares dos Santos
1º membro

MSc. Luciana Cordeiro Rosa
2º membro

Prof. Dr. Danilo Cutrim Bezerra
Suplente

SÃO LUÍS-MA
2016

Aos meus pais Maria da Conceição dos S. S.
Melo e Ricardo Sousa Melo, o melhor exemplo
de amor e companheirismo que posso seguir.
Tenho tanto orgulho de vocês.

A minha avó Maria Ramos dos Santos, por
todo o carinho e amor ofertado aos seus netos.
Te Amo.
(*In memoriam*)

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida e por sempre nos dar força para seguir em frente. Obrigada Senhor pelas bênçãos concedidas.

Aos meus pais, Maria da Conceição Melo e Ricardo Melo, por sempre me darem força e pelo apoio, por serem o maior exemplo de honestidade, companheirismo e força que eu conheço. Meu amor e gratidão por vocês são infinitos, impossível descrever o que sinto. Amo vocês.

Ao meu namorado Felipe Lucas, por esses quase 4 anos de companheirismo, amor e amizade. Muito obrigada por aturar minhas chatices e estresse, e por saber me acalmar, me fazer rir, me entender. Tenho muito orgulho de ter ao lado um homem de coração tão bom. Eu amo você meu zootecnista. Agradeço também a sua família, d. Marta, Florbela e meu amado Ben, pelo acolhimento e carinho. Vocês são minha segunda família.

Ao meu orientador, Ricardo de Macêdo Chaves, pelas oportunidades e confiança depositadas. Obrigada professor pela sua amizade, por ser um paizão para todos os que lhe conhecem. Admiro sua generosidade, humildade e bondade. E se tem gente que não tem nenhum Ricardão, eu tenho o privilégio de ter dois (o pai da vida e o pai da vet).

Fica aqui minha gratidão ao professor Cícero Soares dos Santos, sem o qual nada disso teria acontecido. Agradeço por ter estendido a mão e me ajudado desde o início de tudo, por ter confiado em mim mesmo sem me conhecer, e por ter me ensinado a ser uma pessoa melhor. Eu o admiro muito por suas ações, pelo carinho para com o próximo, pelo homem humilde, bom e pelo coração tão belo que tens.

Agradeço ao Danilo, Aline e todos aqueles que ajudaram no trabalho. Depois de conhecê-los cheguei à conclusão de que ter um bom coração é um dom daqueles que atuam na reprodução.

À Luciana Cordeiro Rosa, minha eterna co-orientadora. Obrigada pelos conhecimentos compartilhados, pela amizade sincera, pelos momentos de alegria nos nossos dias na Baixada Maranhense. Obrigada pelos conselhos e ajuda, tanto nas situações de graduação, quanto na vida.

Aos amigos Raysa Lins e Vinicius Nogueira, pela amizade, por compartilhar os momentos de desespero e loucura da graduação, assim como os sorrisos, as fotos, os momentos bons que foram tantos.

Aos amigos Matheus Vaz, Paulo Henrique, Blenda Lourrane, pessoas que vieram de longe para completar minha vida. O que seria de mim sem vocês para compartilhar os aniversários, os momentos bons na frente de casa, as reuniões na casa de Matheus. Em especial Matheus, obrigada por tudo que já fez por mim. Podem contar comigo sempre.

À minha amiga há 12 anos, Thaynara Moura. A distância nunca foi algo limitante para nossa amizade. Muito obrigada por tudo no decorrer desses anos. Tenha certeza que se depender de mim nossa amizade se eternizará. Te amo amiga.

À equipe do Laboratório de Reprodução Animal (LABRA) pelo acolhimento e conhecimentos compartilhados. Em especial a Bruno e Laine, vocês são uns queridos.

Ao Sr. Colins, por disponibilizar sua fazenda para realização do projeto e a todos aqueles que ajudaram e acolheram todos que estão por trás da realização desse estudo, em especial Sr. Thor, tão atencioso, dedicado e alegre; é gratificante conviver com uma pessoa de coração tão bom.

Por fim, agradeço a Patricia (Paty), que tantas vezes me ajudou, com calma e bondade, no decorrer de toda a graduação, e Isaac, vizinho tão querido que me ajudou em partes da elaboração desse trabalho.

À Universidade Estadual do Maranhão pelo apoio.

À todos meu muito obrigada.

Todos os dias quando acordo
Não tenho mais o tempo que passou
Mas tenho muito tempo
Temos todo o tempo do mundo
Todos os dias antes de dormir
Lembro e esqueço como foi o dia
Sempre em frente
Não temos tempo a perder

- Legião Urbana

RESUMO

Acredita-se que o desempenho reprodutivo de bubalinos sofre maior influência do fator ambiente do que fatores genéticos, portanto uma boa condição nutricional torna-se também fundamental para obtenção de um bom desempenho reprodutivo. O trabalho teve por objetivo avaliar a ciclicidade em fêmeas bubalinas (*Bubalus bubalis*) e a taxa de prenhez obtidas nas estações reprodutivas, assim como correlacionar o escore de condição corporal ao escore ovariano observado nas fêmeas. O estudo foi conduzido em uma propriedade rural no município de Arari – MA, microrregião da Baixada Maranhense. A primeira etapa no mês de janeiro/2016 e a segunda no mês de julho/2016, períodos caracterizados como desfavorável e favorável à reprodução de bubalinos, respectivamente. Foram avaliadas um total de 205 búfalas (*Bubalus bubalis*) da raça Murrah, múltíparas e não lactantes. A avaliação do ECO (escore de condição ovariana) foi realizada com auxílio de ultrassonografia em modo-B, onde foi determinado o “status” classificando os escores em 01 (presença de CL), 02 (ausência de CL e presença de folículos $\geq 8,5$) e 03 (ausência de CL e presença de folículos $< 8,5$), respectivamente. Foram avaliados também o ECC (escore de condição corporal), ECO e taxa de prenhez. Pode-se observar que ECO 01 predominou durante a estação favorável, e ECO 02 predominou durante a estação desfavorável. O ECO 3 foi similar nas estações desfavorável e favorável. O ECO 1 na estação desfavorável foi de 75% (6/8) quando o ECC foi ≥ 3 , por outro lado, durante a estação favorável foi de 67, 9% (19/28) quando o ECC foi < 3 . O ECO 2 fora predominantemente verificado durante a estação desfavorável para ECC < 3 , 48,9% (22/45) e também para ECC ≥ 3 , 51,1% (23/45). Verificou-se diferença significativa na taxa de prenhez entre as estações reprodutivas favorável e desfavorável (41,20% vs. 27,80%, respectivamente; $P < 0,05$). Desta forma, foi possível observar que houve concentração da atividade reprodutiva em fêmeas bubalinas (*Bubalus bubalis*), com predominância do ECO 1 na estação reprodutiva favorável.

Palavras-chave: *Bubalus bubalis*, múltíparas, escore corporal, escore ovariano.

ABSTRACT

It is believed that the reproductive performance of buffaloes is more influenced by environmental factor than genetic factors, so a good nutritional condition is also fundamental to obtain a good reproductive performance. The goal of this study was to evaluate the cyclicity of female buffaloes (*Bubalus bubalis*), the pregnancy rate obtained in the breeding seasons, as well as to correlate the body condition score with the ovarian score observed in female buffaloes. The study was conducted in a rural property in the municipality of Arari – MA , which is a micro region of the Baixada Maranhense, was chosen. The study was divided into two stages, the first during the month of January / 2016 and the second during the month of July / 2016, periods characterized as unfavorable and favorable to the reproduction of buffalo, respectively. A total of 205 buffaloes (*Bubalus bubalis*) of the Murrah breed, multiparous and non-lactating, were evaluated. The ECO (ovarian condition score) evaluation was performed using B-mode ultrasonography, where the status was determined by classifying the scores in 01 (presence of CL or corpus luteum), 02 (absence of CL and presence of follicles ≥ 8.5) and 03 (absence of CL and presence of follicles <8.5), respectively. The ECC (body condition score), ECO and pregnancy rate were also evaluated. It can be observed that ECO 01 was predominant during the favorable season, and ECO 02 was predominant during the unfavorable season. The ECO 3 was similar during unfavorable and favorable seasons. The ECO 1 during unfavorable season was 75% (6/8) when the ECC was ≥ 3 , on the other hand, during the favorable season it was 67, 9% (19/28) when the ECC was <3 . ECO 2 was predominantly observed during unfavorable season for ECC <3 , 48.9% (22/45) and for ECC ≥ 3 , 51.1% (23/45). There was a significant difference in the pregnancy rate between favorable and unfavorable seasons (41.20% vs. 27.80%, respectively, for $P < 0.05$). Thus, it was possible to observe that there was a concentration of the reproductive activity of female buffaloes (*Bubalus bubalis*), with predominance of ECO 1 in the favorable reproductive season.

Keywords: *Bubalus bubalis*, multiparous, body score, ovarian score.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Município de Arari - MA em destaque. Fonte: Wikipédia, 2016.....	26
Figura 2. Classificação do escore de condição ovariano nas estações reprodutivas em búfalas (<i>Bubalus bubalis</i>) da raça Murrah. Arari – MA.....	29
Figura 3. Taxa de prenhez em fêmeas bubalinas (<i>Bubalus bubalis</i>) nas estações reprodutivas, Arari – MA, 2016.....	33

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Classificação do Escore de condição ovariano de acordo com o Escore de Condição Corporal nas estações reprodutivas em búfalas(<i>Bubalus bubalis</i>) da raça Murrah (<i>Bubalus bubalis</i>). Arari – MA, 2016.	32
--	----

LISTA DE QUADRO

Quadro 1. Escore de condição ovariana	27
--	----

LISTA DE SIGLA

2N - Indivíduo Diplóide

BE – Benzoato de Estradiol

CH- Corpo Hemorrágico

CL- Corpo Lúteo

E2 - Estradiol

ECC – Escore de Condição Corporal

ECO – Escore de Condição Ovariana

FAO - Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura

FD – Folículo Dominante

FSH- Hormônio Folículo Estimulante

g - Gramas

GnRH – Hormônio Liberador de Gonadotrofina

hCG – Gonadotrofina Coriônica Humana

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IMS – Ingestão de Matéria Seca

LH – Hormônio Luteinizante

MHz - Mega-hertz

ml - Mililitro

mm - Milímetros

n – Unidade de Amostragem

ng - Nanograma

P4 - Progesterona

US - Ultrassonografia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	Origem e desenvolvimento da Bubalinocultura.....	18
2.2	Bubalinocultura na Baixada Maranhense	19
2.3	Características reprodutivas	19
2.4	Ciclo estral	21
2.5	Estacionalidade reprodutiva.....	22
3	OBJETIVOS.....	25
3.1	Geral.....	25
3.2	Específicos	25
4	MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1	Local de realização do estudo	26
4.2	Período de realização do estudo.....	26
4.3	Avaliação ultrassonográfica dos animais.....	27
4.4	Análise estatística	28
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
6	CONCLUSÃO	35
7	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	36

1 1 INTRODUÇÃO

2 Os búfalos domésticos pertencem à espécie *Bubalus bubalis*, considerado um animal
3 de triplo propósito, apto a produção de leite, carne e a tração. Suas múltiplas funcionalidades
4 são relevantes contribuições ao desenvolvimento econômico e social. Originário do continente
5 asiático adaptou-se e alcançou distribuição mundial (BORGHESE, 2005).

6 A população mundial de búfalos é de aproximadamente 195 milhões de animais
7 (FAO, 2013). No Brasil, a bubalinocultura vem apresentando elevado crescimento nas últimas
8 décadas, evidenciado pelo aumento populacional desses animais em diversas propriedades e
9 regiões, destinados tanto para produção de leite e abate quanto para comercialização de
10 matrizes e reprodutores (RODRIGUES et al., 2008).

11 O Maranhão detém o quarto maior rebanho bubalino do Brasil e o maior da região
12 Nordeste, com cerca de 87.896 cabeças, com grande parte do efetivo criado nas planícies
13 inundáveis da Baixada Maranhense (IBGE, 2015).

14 Em relação à reprodução, assim como os demais animais domésticos, os búfalos
15 sofrem variações nos índices produtivos e reprodutivos, decorrentes do tipo de manejo e do
16 nível tecnológico empregados na criação, e na relação genótipo e ambiente. Entretanto, vários
17 autores afirmam que o desempenho reprodutivo de bubalinos sofre mais influência do fator
18 ambiente (fotoperíodo, pluviosidade, umidade relativa do ar, temperatura) do que fatores
19 genéticos, sendo que a importância de cada um destes fatores varia muito entre a situação
20 geográfica, condições de criação e o sistema de manejo. Além disso, uma boa condição
21 nutricional é fundamental para obtenção de um bom desempenho reprodutivo, uma vez que
22 búfalas magras na ocasião do parto demoram muito para manifestar cio e animais que perdem
23 muito peso após o parto também tem uma queda na fertilidade (RIBEIRO, 2008).

24 Nas regiões distantes da linha do Equador esses animais comportam-se como
25 poliéstricos sazonais de dias curtos, não ciclando durante o verão, quando a luminosidade
26 diária é maior. Contudo, em regiões próximas ao Equador, tornam-se poliestrais contínuos
27 ciclando o ano inteiro (VALE e RIBEIRO, 2005).

28 Semelhante aos bovinos, o ciclo estral da búfala dura em média 21 a 24 dias
29 (podendo durar de 16 a 33 dias dependendo de fatores ambientais) e este apresenta quatro
30 fases distintas: pró-estro, estro, metaestro e diestro. Entretanto, a expressividade dos sinais

31 clínicos, dentro das diferentes fases, difere em alguns aspectos daqueles expressos pela vaca
32 taurina e zebuína (VALE e RIBEIRO, 2005), onde a duração do estro dura cerca de cinco a 27
33 horas (média de 20 horas), e a ovulação ocorre entre 24 a 48 horas após o início do estro ou
34 seis a 21 horas após o final do estro.

35 Avaliações sobre o desenvolvimento folicular e CL fornecem informações
36 importantes sobre o estado reprodutivo da fêmea e possibilita a adequação de procedimentos
37 de manipulação ou sincronização do ciclo estral (VIANA et al., 1999). O exame
38 ultrassonográfico de ovários normais durante o ciclo estral permite a observação dos folículos
39 e do CL, onde os folículos ovarianos têm em geral formato esférico, contém fluido não
40 ecogênico e pode ser encontrado em número e tamanho variáveis (GRIFFIN e GINTHER,
41 1992), sendo importante forma de analisar em qual momento do ciclo estral a fêmea se
42 encontra e quais as estruturas presentes no ovário, entre outras funções, tendo a vantagem de
43 ser uma técnica não invasiva e que fornece resultados precisos, rápidos e precoces (BEEF
44 POINT, 2010).

45 Assim, embora a espécie guarde certa semelhança com os bovinos, há peculiaridades
46 que os distinguem e, em decorrência da sua potencialidade produtiva nos diferentes
47 ecossistemas em que são criados, o conhecimento dos aspectos reprodutivos, tanto das fêmeas
48 quanto dos machos, são requisitos básicos para a implantação dos rebanhos, como também
49 para o melhoramento e a avaliação da fertilidade destes animais (Oba, 2003).

50 2 REVISÃO DE LITERATURA

51 2.1 Origem e desenvolvimento da Bubalinocultura

52 Os búfalos domésticos pertencem à espécie *Bubalus bubalis*, considerado um animal
53 de triplo propósito, apto a produção de leite, carne e ao trabalho. Há dois grupos principais de
54 búfalos domésticos, o gênero *Bubalus*, espécie *Bubalus bubalis*, incluindo o búfalo de rio ou
55 leiteiro com $2n = 50$ cromossomos, possuindo coloração preta e o do pântano ou Carabao,
56 com $2n = 48$ cromossomos, possuindo coloração mais clara (DAMÉ, 2006). Trata-se de
57 animais extremamente rústico, que apresentam a capacidade de adaptação a diversos
58 ambientes, com grandes variações de clima, relevo e vegetação (FAO, 2006).

59 A espécie teve sua origem no continente asiático, onde foi levado à África,
60 posteriormente à Europa e Oceania e finalmente à América (DAMÉ, 2006). Somente no final
61 do século XIX pequenos lotes de búfalos originários da Ásia, Europa (Itália) e Caribe foram
62 introduzidos no Brasil, inicialmente mais pelo seu exotismo que por suas características
63 produtivas, espalhando-se posteriormente por todo o país (BERNARDES, 2007). Segundo o
64 mesmo autor, o crescimento da população dos bubalinos no Brasil, no período compreendido
65 entre 1961 a 2005 foi de 1.806%, enquanto que no mundo, o crescimento do rebanho bubalino
66 foi de 97,34%.

67 No Brasil o efetivo bubalino supera a marca de 1,37 milhões de cabeças segundo
68 dados oficiais, 70% da população bubalina está inserida na Amazônia Legal. Nosso rebanho
69 acompanhou as tendências mundiais, em 25 anos a população bubalina dobrou, apresentando
70 índices de crescimento populacional superior à espécie bovina (MARANHÃO, 2012).

71 O rebanho bubalino brasileiro concentra-se principalmente na Região Norte do país
72 (65% do efetivo total), distribuído entre as raças Carabao, Murrah, Jafarabadi e Mediterrâneo
73 (MARQUES e CARDOSO, 1997). O Maranhão pertence a região meio-norte do país e faz
74 parte da Amazônia Oriental, detém o quarto maior rebanho bubalino do Brasil e o maior da
75 região Nordeste, com cerca de 87.896 cabeças que representam mais de 60% do efetivo desta
76 região (IBGE, 2015), sendo grande parte desses animais criados nos campos da Baixada
77 Maranhense.

78 **2.2 Bubalinocultura na Baixada Maranhense**

79 A Baixada Maranhense situa-se a leste da ilha de São Luís, ao norte do estado do
80 Maranhão (1°59' - 4°00'S e 44°22' - 45°33'W), acrescida das microrregiões de Gurupi
81 (Litoral Ocidental) e do Baixo Parnaíba Maranhense (Litoral Oriental). Trata-se de uma
82 região de origem geológica recente, mal drenada sujeita a inundações periódicas com
83 influência da água salgada, e constitui um ecossistema complexo incluindo vários
84 componentes como rios, lagos, estuários, áreas alagadas e agroecossistemas. Os campos desta
85 região se caracterizam por serem secos e alagados, onde a enchente atinge o máximo durante
86 os meses de abril e maio e o nível mínimo de água é registrado nos meses de novembro e
87 dezembro (SERRA, 2004).

88 A introdução da bubalinocultura na Baixada Maranhense se deu na segunda metade
89 dos anos 1960, teve o apoio do Governo Estadual, visando o desenvolvimento econômico
90 para a região (BERNARDI, 2005). As lagoas de água doce no período de estiagem e o campo
91 alagado no período chuvoso, na Baixada Maranhense são ideais para a criação do animal,
92 principalmente relacionado à alimentação, uma vez que as características da vegetação
93 assemelham-se àquela encontrada na ilha, de onde os búfalos procederam (VASCONCELOS,
94 2012).

95 Pelas qualidades da região da Baixada Maranhense apresentadas para criação de
96 búfalos, a região concentra 65% do total de búfalos criados no Maranhão, onde os 35%
97 restantes estão distribuídos de forma bastante pulverizada em pequenos criatórios localizados
98 em 125 Municípios maranhenses (SANTOS et al., 2016), onde a grande maioria dos
99 bubalinocultores criam esses animais de forma extensiva, totalmente soltos nos campos.

100 **2.3 Características reprodutivas**

101 A espécie bubalina já foi considerada uma espécie de baixo desempenho reprodutivo,
102 fato atribuído à maturidade tardia, fraca expressão comportamental de estro, intervalo entre
103 partos prolongado e sazonalidade reprodutiva (BORGUESE, 2005; DROST, 2007),
104 entretanto, Baruselli e Carvalho (2002) caracterizaram o búfalo sendo um animal de fácil
105 adaptabilidade às condições brasileiras, caracterizado pela boa eficiência reprodutiva e pelo
106 rápido desenvolvimento ponderal. Estudos no Sri Lanka (PERERA et al., 2007), Tailândia
107 (YINDEE et al., 2011), Itália (PRESICCE, 2007), Brasil (BARUSELLI et al., 1997)

108 mostraram que a fertilidade pode ser muito eficaz, planejando-se cruzamentos genéticos
109 compatíveis com o ambiente e providenciando alimentação adequada para os animais.

110 Sabe-se que animais da espécie bubalina apresentam características particulares em
111 seu padrão reprodutivo sejam anatômicas, fisiológicas e/ou comportamentais. As principais
112 características anatômicas diferenciais dos bubalinos são estruturas do sistema reprodutivo
113 com dimensões menores, corpo lúteo imerso no interior do ovário, cornos uterinos são mais
114 rígidos e tortuosos, cérvix menor com 3 a 5 anéis cervicais de difícil dilatação mesmo durante
115 o estro (VALE e RIBEIRO, 2005; DROST, 2007)

116 Os ovários de ruminantes são estruturas pares localizados no terço médio das
117 superfícies laterais da entrada da pelve, sendo suspensos pelo mesovário, na porção cranial do
118 ligamento largo, conectados ao útero pelo ligamento ovárico e ao peritônio parietal pelo
119 ligamento suspensor do ovário (NUNEZ, 1993).

120 O ovário de búfala é ovóide e consideravelmente menor do que o da vaca (DYCE et
121 al., 1996). Além das diferenças quanto as medidas foliculares, as búfalas apresentam
122 diferenças quanto ao número de folículos primordiais, onde Danell (1987), em seu estudo,
123 assegura a existência de uma população estimada de 12.636 e 10.136 folículos primordiais em
124 novilhas bubalinas cíclicas e não cíclicas, respectivamente. Segundo o autor, esse número é
125 bastante reduzido quando comparado aos 50.000 folículos primordiais de novilhas bovinas.

126 No aspecto comportamento, as búfalas também apresentam diferenças quando
127 comparadas as bovinas. Por exemplo, a sintomatologia do estro é menos evidente em
128 bubalinos e o comportamento homossexual ocorre raramente (PERERA, 1987; VALE et al.,
129 1990), a produção de muco é menor e este permanece retido no assoalho da vagina (PERERA
130 et al., 1977). Além disso, os mesmos autores citam que a sazonalidade reprodutiva é uma das
131 características mais notáveis do comportamento reprodutivo nessa espécie.

132 A grande concentração de estros no período noturno também é relatada por Vale
133 (1984) o que caracteriza, assim, a dificuldade na detecção deste e o relativo comprometimento
134 no manejo reprodutivo (DROST, 2007).

135 2.4 Ciclo estral

136 A fêmea bubalina é poliéstrica estacional (fotoperíodo negativo), entretanto, animais
137 pertencentes aos rebanhos localizados próximos à linha equatorial, apresentam uma
138 estacionalidade reprodutiva influenciada mais por fatores nutricionais do que o fotoperíodo.

139 O ciclo estral compreende os eventos reprodutivos que ocorrem no intervalo entre
140 duas ovulações (HAFEZ, 1995). A duração do ciclo estral na búfala varia entre 16 a 33 dias,
141 com maior concentração entre 21 a 24 dias, semelhante à espécie bovina. O ciclo apresenta
142 quatro fases distintas: pró-estro e estro (também chamada fase folicular ou estrogênica) e
143 metaestro e diestro (ou fase luteínica), entretanto, a expressividade dos sinais clínicos, dentro
144 das diferentes fases, difere em alguns aspectos daqueles expressos pela vaca taurina e zebuína,
145 onde a duração do estro dura cerca de cinco a 27 horas (média de 20 horas), e a ovulação
146 ocorre entre 24 a 48 horas após o início do estro ou seis a 21 horas após o final do estro
147 (VALE e RIBEIRO, 2005).

148 Fêmeas bubalinas podem apresentar de uma a três ondas de crescimento folicular por
149 ciclo estral, dependendo da duração da fase lútea, havendo um predomínio de ciclos com duas
150 ondas foliculares (TANEJA et al., 1996; BARUSELLI et al., 1997; MANIK et al., 1998; ALI
151 et al., 2003; PRESICCE et al., 2004; AWASTHI et al., 2006, WARRIACH e AHMAD,
152 2007). O processo de desenvolvimento folicular ovariano é dinâmico, onde cada onda de
153 crescimento folicular consiste em folículos recrutados de um grupo de folículos antrais
154 gonadotrofina dependentes, sendo que em cada onda folicular 5 a 13 folículos são recrutados
155 (BARUSELLI et al., 1997, MANIK et al., 2002, GIMENES et al., 2009).

156 A dinâmica da onda folicular envolve três principais eventos: emergência, desvio e
157 dominância, finalizando com atresia ou ovulação (ADAMS et al., 2008), onde no decorrer de
158 todo ciclo, desde o recrutamento dos folículos até a ovulação, os folículos variam de tamanho
159 de acordo com o grau de desenvolvimento, podendo ser divididos em folículos pré-antrais ou
160 não cavitários (não possuem antro: primordiais, primários e secundários) e folículos antrais ou
161 cavitários (possuem a cavidade antral no seu interior, repleta de líquido folicular: terciários e
162 pré-ovulatórios) (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1995). De acordo com Danell (1987), as
163 búfalas apresentam menor número de folículos primordiais e maior taxa de atresia folicular do
164 que as vacas.

165 Para que ocorra o recrutamento folicular, é necessário que haja uma elevação das
166 concentrações de hormônio folículo estimulante (FSH)(FORTUNE, 1994), promovendo
167 crescimento dos folículos sensíveis a esse hormônio; na fase de seleção, alguns folículos
168 continuam em crescimento enquanto outros começam a fase de atresia. Com a redução do
169 hormônio é que acontece a distinção entre o futuro folículo dominante (FD) e os demais
170 (GASTAL et al., 2000).

171 Segundo Campanile et al. (2010) os folículos dos bubalinos adquirem a capacidade
172 ovulatória quando atingem 5 a 8 mm, mas necessitam desenvolver mais para produzir
173 estradiol suficiente para induzir o pico pré-ovulatório de LH através do *feedback* positivo
174 sobre o hipotálamo. Entretanto Gimenes et al. (2011) somente obtiveram ovulação de
175 folículos que apresentavam diâmetro $\geq 8,5$ mm no momento da aplicação de LH.

176 Após todo desenvolvimento folicular, o folículo dominante se rompe liberando o
177 oócito, havendo então a formação do corpo hemorrágico (CH), que se desenvolve em corpo
178 lúteo (CL), depois corpo albicans. O CL refere-se à estrutura primariamente reconhecida pela
179 habilidade em sintetizar e secretar progesterona (P4), hormônio que está intimamente
180 relacionado com a manutenção de um ambiente adequado ao desenvolvimento embrionário e
181 manutenção do próprio CL, durante o período compreendido entre a ovulação e o
182 reconhecimento materno da gestação (aproximadamente 14^o-17^o dia pós-ovulação nos
183 bovinos) (FIELDS e FIELDS, 1996).

184 A avaliação do CL fornece informações importantes sobre o estado reprodutivo da
185 fêmea e possibilita a adequação de procedimentos de manipulação ou sincronização do ciclo
186 estral (VIANA et al., 1999). Essa estrutura está comumente inserida no estroma ovariano,
187 sendo geralmente menor do que na vaca, podendo atingir um peso e um diâmetro máximo de
188 2,3g e de 15 mm, respectivamente (ROY e MULLICK, 1964). Quando presente no ovário de
189 búfalas, o CL ocupa uma grande área do ovário, restando menos tecido ovariano para o
190 desenvolvimento folicular, fator responsável pelo desenvolvimento de menos folículos
191 superficiais em búfalas gestantes (LEAL, 2008).

192 **2.5 Estacionalidade reprodutiva**

193 A estacionalidade ocorre quando há uma concentração das parições em determinado
194 período do ano, reduzindo a mão de obra e facilitando o manejo. Para criações destinadas à
195 produção de carne, este é um fator desejável, pois concentra a estação de nascimentos,

196 desmama, acabamento e abate, além de favorecer a seleção para fertilidade e habilidade
197 materna. Entretanto, para a produção de leite e derivados de leite de búfala, a concentração
198 das parições é um fator indesejável, pois o produtor deseja que as parições sejam distribuídas
199 ao longo de todo o ano (PEREIRA et al., 2007).

200 Muitos autores afirmam que a ocorrência de partos estacionais é influenciada por
201 fatores como temperatura ambiental, fotoperíodo e disponibilidade de alimentação.
202 Aparentemente, o efeito do fotoperíodo é similar em bubalinos e bovinos (HAFEZ e HAFEZ,
203 2004).

204 O fotoperiodismo consiste em um mecanismo de detecção das modificações no
205 fotoperíodo para registrar as mudanças estacionais e regulares ao comportamento reprodutivo
206 (ALEANDRI et al., 1996). Os búfalos são animais poliestrais estacionais de dias curtos,
207 portanto, em vários países do mundo, a época em que os animais apresentam maior atividade
208 reprodutiva é o outono (fotoperíodo negativo), em contrapartida, durante os meses quentes do
209 ano, existe um aumento na incidência de “cios” silenciosos e ciclos estrais irregulares na
210 fêmea, e diminuição da libido e qualidade seminal nos machos (BITTMAN e KARSCH,
211 1984; ZICARELLI, 1994; ZICARELLI e VALE, 2002).

212 Isso ocorre devido à ação do hormônio melatonina, secretado durante a noite pela
213 glândula pineal. Em bubalinos, o aumento na secreção de melatonina estimula a secreção do
214 (GnRH) pelo hipotálamo, e conseqüentemente do hormônio folículo estimulante (FSH) e do
215 hormônio luteinizante (LH) pela hipófise anterior (SENGER, 2003). Em contrapartida, nas
216 condições tropicais, onde as variações de luminosidade e temperatura são mínimas, é possível
217 haver uma distribuição de partos durante todo o período do ano, visto que o problema parece
218 estar relacionado diretamente com a oferta de alimento (VALE et al., 1986), pois, segundo
219 Ribeiro (2008), uma boa condição nutricional é fundamental para obtenção de um bom
220 desempenho reprodutivo, uma vez que búfalas magras após o parto demoram muito para
221 manifestar cio e animais que perdem muito peso após o parto também tem uma queda na
222 fertilidade.

223 Na região tropical quente e úmida, a sazonalidade reprodutiva dos búfalos fica bem
224 caracterizada onde os partos concentram-se no período das águas (novembro a maio). Ribeiro
225 Neto et al. (2006), trabalhando com animais Murrah x Mediterrâneo observaram uma
226 concentração de 90% dos partos entre os meses de janeiro a junho. Isso ocorre devido ao

227 início do período das águas, uma vez que esses animais recuperam sua condição de escore
228 corporal, apresentando o cio de 60 a 90 dias após o início desse período, fazendo com que os
229 partos se iniciem em dezembro e ocorra o maior número de partos em março.

230 O estado de nutrição dos animais domésticos representa um importante fator da
231 reprodução e produção animal, pois é responsável pela dimensão e funcionamento de vias
232 metabólicas que permitirá a expressão do potencial produtivo e/ou reprodutivo. Independente
233 da via metabólica envolvida, a regulação exercida pela nutrição na reprodução ocorre,
234 principalmente, pela ação de fatores cerebrais hipotalâmicos, alterando a secreção de GnRH, e
235 de outros hormônios, causando assim vários problemas como anestro, cios débeis e de menor
236 duração, menor taxa de nascimento, aumento do intervalo entre partos e retenção de anexos
237 fetais (GRUNERT et al., 2005).

238 Vale (2007) atribui a estacionalidade das forragens que determinam uma escassez de
239 alimentos em determinada época do ano, como sendo o fator decisivo para a ocorrência da
240 estacionalidade reprodutiva em região de baixas latitudes, onde a variação no fotoperíodo é
241 mínima.

242 Entretanto em regiões de baixa latitude que apresentam uma variação pequena no
243 fotoperíodo, o estresse térmico assume uma importância como causa de anestro, a exemplo do
244 que ocorre na Índia onde o estresse calórico durante os meses de verão é a principal causa de
245 anestro em búfalos, e está associado a altas concentrações de prolactina que influenciam a
246 atividade ovariana causando subfertilidade, repetição de estro e diminuição da secreção de
247 progesterona (ROY e PRAKASH, 2007).

248 **3 OBJETIVOS**

249 **3.1 Geral**

250 Avaliar a ciclicidade em fêmeas bubalinas (*Bubalus bubalis*) nas estações
251 reprodutivas.

252 **3.2 Específicos**

253 Avaliar a taxa de ciclicidade em fêmeas bubalinas na estação reprodutiva favorável e
254 desfavorável;

255 Identificar o escore de condição ovariana em fêmeas bubalinas na estação
256 reprodutiva favorável e desfavorável;

257 Correlacionar o escore de condição corporal e ovariano em fêmeas bubalinas na
258 estação reprodutiva favorável e desfavorável;

259 Verificar a taxa de prenhez em fêmeas bubalinas na estação reprodutiva favorável e
260 desfavorável.

261 4 MATERIAL E MÉTODOS

262 4.1 Local de realização do estudo

263 O estudo foi conduzido em uma propriedade rural especializada na criação de
264 bubalino, no município de Arari - MA (figura 1), situado a 3° 27' 14" de latitude Sul e 44° 46'
265 48" de longitude Oeste, inserido na microrregião da Baixada Maranhense. Esta microrregião é
266 caracterizada por terras baixas, planas e inundáveis, com vegetação de campos, matas de
267 galeria, manguezais e bacias lacustres (IMESC, 2008)

268 De acordo com a classificação de Köppen, apresentada por Pereira et al., (2002) o tipo
269 climático é o tropical com estação seca de inverno (Aw), caracterizado por um verão chuvoso e
270 um inverno seco. Esta distribuição de chuvas está diretamente relacionada à oferta de forragem
271 nesta região.



Figura 1. Município de Arari - MA em destaque. Fonte: Wikipédia, 2016.

272 4.2 Período de realização do estudo

273 O estudo foi dividido em duas etapas: a primeira realizada no mês de janeiro/2016 e
274 a segunda no mês de julho/2016, períodos caracterizados, na região de estudo, como
275 desfavorável e favorável à reprodução de bubalinos, respectivamente.

276 A escolha destes períodos foi baseada no levantamento de dados retrospectivos
277 referentes as pesquisas realizadas na mesorregião norte maranhense.

278 4.3 Avaliação ultrassonográfica dos animais

279 Foram avaliadas neste estudo um total de 205 búfalas (*Bubalus bubalis*) da raça
280 Murrah, multíparas e não lactantes através de exames ultrassonográficos modo bidimensional
281 (modo B). Na primeira etapa (estação desfavorável) foram avaliadas via US 108 fêmeas
282 bubalinas, na segunda etapa (estação favorável), foram avaliadas 97 búfalas. A taxa de
283 prenhez fora obtida em ambas estações. Previamente ao início do estudo, as búfalas foram
284 avaliadas quanto ao ECC, utilizando-se uma escala de 1 a 5 pontos, conforme metodologia
285 descrita por Alapati et al. (2010).

286 A avaliação do ECO foi realizada com auxílio de ultrassonografia em modo-B, com
287 um transdutor transretal linear de 5,0 MHz (Mindray® M5, Digital Ultrasonic Diagnostic
288 Imaging System, Brasil), foi determinado o “status” classificando os escores em 1, 2 e 3,
289 respectivamente. Conforme apresentado na tabela abaixo:

Quadro 1. Escore de condição ovariana.

ECO*	Características
1	Fêmeas ciclando, ovários com presença de CL (Corpo lúteo)
2	Fêmeas em anestro, com ausência de CL. Incluem-se nesta categoria animais, cujo os ovários apresentem folículos com diâmetro médio do $\geq 8,5$ mm.
3	Fêmeas em anestro, com ausência de CL. Nesta categoria são incluídos animais, cujo os ovários apresentem folículos com diâmetro médio do $< 8,5$ mm.

ECO* = escore de condição ovariana; metodologia adaptada de Madureira & Pimentel (2005)

290 Considerou-se o diâmetro folicular médio de 8,5 mm, como critério de classificação,
291 pois, GIMENES et al. (2011) relataram que os folículos adquiriam capacidade ovulatória ao
292 atingir este diâmetro.

293 As variáveis avaliadas nas estações foram: escore de condição corporal (ECC),
294 escore de condição ovariano (ECO) e taxa de prenhez.

295 **4.4 Análise estatística**

296 As análises dos dados foram realizadas com auxílio do software infostat, sendo
297 efetuadas pelo teste LSD Fisher.

298 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

299 Conforme verificado no Figura 02, na estação reprodutiva favorável, a proporção de
300 animais com escore ovariano 01 (ECO 01) predominou sobre as demais, já na estação
301 reprodutiva desfavorável destacamos a predominância de animais com escore ovariano 02
302 (ECO 02).

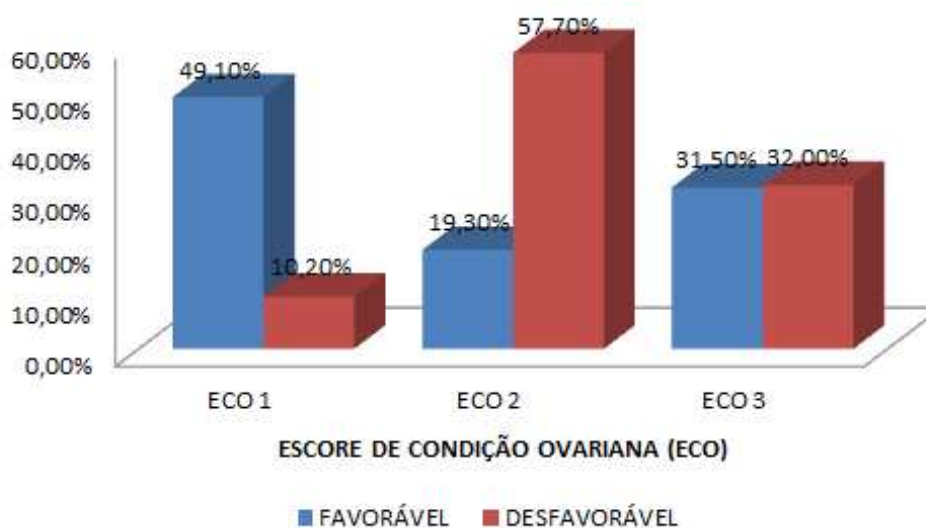


Figura 2. Classificação do escore de condição ovariano nas estações reprodutivas em búfalas (*Bubalus bubalis*) da raça Murrah. Arari – MA.

303 O escore de condição ovariano 1 (ECO 1) é caracterizado pela presença do corpo
304 lúteo, indicativo de ciclicidade e que o escore de condição corporal é frequentemente
305 relacionada a esta (BARUSELLI, 1995; DECVKOTA et al., 2012). A concentração da
306 atividade reprodutiva em bubalinos, é atribuída a uma série de fatores: sazonalidade na oferta
307 de forragem, estado nutricional do animal, fotoperíodo, estresse térmico, que podem ter maior
308 ou menor importância dependendo da região (ZICARELLI, 1997; CAMPANILE et al., 2010).

309 Entretanto em regiões de baixa latitude que apresentam uma variação pequena no
310 fotoperíodo, o estresse térmico (ROY e PRAKASH, 2007) e a sazonalidade na oferta de
311 forragem (VALE, 2007) assumem importância como causa de anestro.

312 O escore de condição ovariano 2 (ECO 2) predominou na estação reprodutiva
313 desfavorável. Morfologicamente os folículos presentes na estação reprodutiva desfavorável
314 demonstram capacidade ovulatória, que segundo Gimenes et al. (2011) é adquirida quando o
315 folículo dominante atinge 8,5 mm em novilhas bubalinas e está diretamente relacionada ao
316 aumento de receptores de LH nas células da granulosa simultâneo ao crescimento folicular.

317 O escore de condição ovariano 3 (ECO 3) foi similar nas estações desfavorável e
318 favorável (32,0%; 25/78 vs. 31,6%; 18/57, respectivamente). Albuquerque et al., (2014)
319 realizaram um estudo sobre dinâmica folicular em búfalas múltiparas não lactante na estação
320 favorável, relataram o diâmetro do folículo dominante (mm) na divergência folicular da
321 primeira e segunda onda ($7,40 \pm 0,33$ vs. $6,93 \pm 0,40$, respectivamente). Sendo assim,
322 possivelmente esses relatos expliquem, à ausência de ciclicidade em fêmeas bubalinas
323 apresentando ECO tipo 3 em ambas estações reprodutivas, pois, os folículos não alcançaram
324 capacidade ovulatória.

325 Das et al. (2013) em estudo sobre as desordens reprodutivas, que afetam o ciclo
326 estral em bubalinos compilou achados de vários trabalhos a respeito do padrão reprodutivo
327 durante o anestro de verão, uns indicando que ocorre atividade ovariana, é caracterizada pelo
328 crescimento e atresia de folículos e um estudo que não reportou a presença de folículos
329 antrais neste período.

330 Wiltbank et al. (2002) estudaram as condições anovulatórias em bovinos e as
331 classificaram de acordo com o estágio do desenvolvimento folicular observado. Na primeira
332 classificação englobou animais que apresentam emergência de ondas folicular e podem ou
333 não atingir a divergência, denominando esta categoria de ovários estáticos, relacionada em
334 bovinos a situação de desnutrição. Na segunda classificação há vacas anovulatórias que
335 apresentam divergência folicular, entretanto os folículos não atingem tamanho ovulatório. Na
336 terceira classificação há vacas anovulatórias, cujos folículos atingem o tamanho ovulatório,
337 mas não ocorre a ovulação, desenvolvendo folículos persistentes que não atingem diâmetro
338 suficiente para serem considerados cistos foliculares.

339 Em seu estudo sobre divergência folicular e capacidade ovulatória em bubalinos e
340 zebuínos Gimenes et al. (2006) comentam que não existe relatos a respeito da relação
341 temporal entre diâmetro folicular e aquisição de receptores de LH nas células da granulosa de
342 bubalinos, é possível supor que assim como em novilhas Holandesas, a presença de receptores
343 de LH no momento do desvio pode ser adequada para que o folículo dominante alcance o
344 diâmetro necessário para a seleção. Porém, insuficiente para torná-lo capaz de ovular
345 (SARTORI et al., 2001). Esta afirmação explica, portanto, o fato de folículos pertencente ao
346 grupo 7,0 - 8,4mm não terem ovulado após o desafio com LH na espécie bubalina.

347 Khan et al. (2012), realizaram um estudo com o objetivo de analisar o conteúdo do
348 líquido folicular de bubalinos cíclicos e acíclicos, classificou os folículos e pequenos, médios
349 e grandes (5,0-6,9 mm, 7,0-9,9 mm e $\geq 10,0$ mm, respectivamente). As concentrações de
350 estradiol foram significativamente menores ($P < 0,0001$) nos folículos de animais acíclicos
351 ($1,4 \pm 0,09$ ng/mL) que nos cíclicos ($3,3 \pm 0,18$ ng/mL) e, nos animais cíclicos, à medida que o
352 folículo cresce as concentrações de estradiol aumentam ($P < 0,01$). As concentrações de
353 progesterona no líquido folicular foram mais altas ($P < 0,001$) em animais acíclicos ($24,3 \pm$
354 $2,61$ vs. $7,6 \pm 0,79$ ng/mL). A presença de grandes folículos em algumas búfalas acíclicas
355 indica que alcançar um tamanho pré-ovulatório, não é o único fator determinante da ovulação.
356 Além de atingir um tamanho adequado o folículo deve ser funcionalmente ativo e produzir
357 um nível ótimo de estradiol que possa estimular o pico pré-ovulatório de LH, o qual é um pré-
358 requisito para a ovulação (HAFEZ et al., 2000; PERERA, 2011). Portanto, como em outras
359 espécies, em búfalos são necessárias a aquisição de capacidade ovulatória e dominância
360 morfológica e funcional para que ocorra a ovulação (KHAN & DAS, 2012).

361 Roman-Ponce et al. (1981) verificaram em seu estudo que alterações endócrinas
362 podem vir a ocorrer por conta de estresse térmico, onde estes avaliaram o efeito das alterações
363 térmicas e sua influencia na produção de E2, LH, P4 e corticóides durante o ciclo estral de
364 vacas criadas no verão, em sistema de manejo com e sem sombreamento a disposição, onde
365 foi demonstrado que naquelas vacas criadas em ambientes não sombreados era freqüente a
366 ocorrência de hipertermia, mas que dois períodos diários recorrentes de estresse térmico não
367 eram suficientes para inibir a ocorrência de ciclos estrais, ficando demonstrado também que o
368 estresse térmico pode alterar por ação direta a função do hipotálamo e da hipófise.

369 Conforme verificado na tabela 1, o escore de condição ovariano 1 (ECO 1) na
370 estação desfavorável foi de 75% (6/8) quando o escore de condição corporal foi ≥ 3 . Porém,
371 na estação favorável foi de 67, 9% (19/28) quando o ECC foi < 3 . De fato, a função ovariana
372 é influenciada por diversos fatores, como, clima, raça, nutrição e manejo (MARTINS et al.,
373 2005). Esta observação na estação favorável pode está associada ao “*status*” nutricional com o
374 aumento gradual o ECC, devido a ingestão de matéria seca (IMS) e ao balanço energético
375 positivo desses animais, pois, a estação favorável coincide com o aumento na quantidade e
376 possivelmente na qualidade da forragem.

Tabela 1. Classificação do Escore de condição ovariano de acordo com o Escore de Condição Corporal nas estações reprodutivas em búfalas (*Bubalus bubalis*) da raça Murrah (*Bubalus bubalis*). Arari – MA, 2016.

Estação	N	Escore de Condição Ovariano	Escore de condição Corporal	(%)
Desfavorável	8	1	< 3	25,0 (2/8)
			≥ 3	75,0 (6/8)
Favorável	28		< 3	67,9 (19/28)
			≥ 3	32,1 (9/28)
Desfavorável	45	2	< 3	48,9 (22/45)
			≥ 3	51,1 (23/45)
Favorável	11		< 3	54,5 (6/11)
			≥ 3	45,5 (5/11)
Desfavorável	25	3	< 3	68,0 (17/25)
			≥ 3	32,0 (8/25)
Favorável	18		< 3	88,9 (16/18)
			≥ 3	11,1 (2/18)

377 O ECO 2 foi verificado na estação desfavorável para os ECC < 3, 48,9% (22/45)
378 quanto ECC ≥ 3, 51,1% (23/45). Esses achados já foram observado em trabalhos realizados
379 com bubalinos por Albuquerque et al., (2014), Bezerra et al., (2016) na estação reprodutiva
380 desfavorável. A quantidade de animais com ECO 3, foi similar tanto na estação desfavorável
381 quantos favorável.

382 Para Grunert et al.(2005), o ECC é fundamental para se predizer a fertilidade de um
383 rebanho. Os autores observaram que vacas com ECC entre 3 e 4, numa escala de 0 a 5,
384 apresentavam taxas de nascimento maior do que a observada em animais com escore menor
385 que 3 ou naquelas com escore 5, demonstram que suplementação deficiente, assim como a
386 excessiva, determinariam diminuição da fertilidade.

387 Devkota et al. (2012) estudando a espécie bubalina da raça Murrah no Nepal,
388 relacionou os tipos de anestro observados durante a estação reprodutiva favorável e
389 desfavorável e o ECC. Dos animais com ECC < 2,5, 71,4% (22/35) estavam em anestro na
390 estação desfavorável e 95,5% (21/22) destes apresentaram o anestro verdadeiro, definido
391 como a presença de ovários inativos (sem folículos antrais). Na mesma estação, em animais

392 com ECC > 2,5, a taxa de anestro foi de 33,8% (26/77), destes 53,8% (14/26) apresentaram
393 atividade ovariana (estro silencioso).

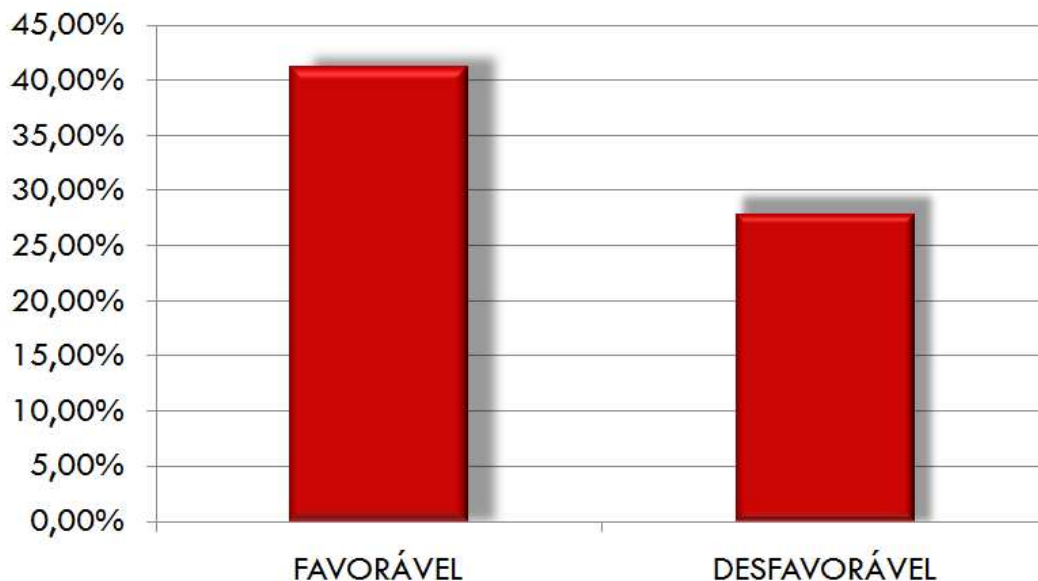


Figura 3. Taxa de prenhez em fêmeas bubalinas (*Bubalus bubalis*) nas estações reprodutivas. Arari – MA, 2016.

P > 0,05 (Teste LSD Fisher)

394 Conforme ilustrado na figura 3, verificou-se diferença significativa na taxa de
395 prenhez entre as estações reprodutivas favorável e desfavorável (41,20%; 40/97 vs. 27,80%;
396 30/108, respectivamente; P<0,05).

397 A maior taxa de prenhez observada na estação reprodutiva favorável reflete a
398 concentração da atividade reprodutiva. Bezerra et al., (2016) avaliaram a taxa de concepção
399 em fêmeas bubalinas (*Buballus bubalis*) lactantes tratadas com diferentes protocolos de
400 indução da ovulação nas estações reprodutivas. Na favorável, usando GnRH/hCG, obtiveram
401 32% (16/50), usando o GnRH/BE obtiveram 26% (13/50). Na estação desfavorável, usando
402 P4/ hCG (5%; 5/100) e P4/BE (1%; 1/100). Os autores concluíram que não foi possível obter
403 taxas de prenhez satisfatórias na estação reprodutiva desfavorável, por meio de protocolos à
404 base de progesterona/estradiol/prostaglandina em animais criados extensivamente em campos
405 nativos, pobres e periodicamente alagados da Amazônia equatorial.

406 Baruselli e Carvalho (2005) realizaram trabalho com 967 búfalas tratadas durante a
407 estação reprodutiva favorável (março a agosto), onde puderam observar que fêmeas que
408 apresentavam escore de condição corporal (ECC) inferior a 3, obtiveram 31,4% de concepção

409 (n=223), enquanto que fêmeas que tinham ECC superior a 4, apresentaram taxa de concepção
410 de 57,1% (n=198), sugerindo assim que as búfalas devem apresentar condição corporal $\geq 3,5$
411 para obtenção de boa taxa de concepção. Sendo o mesmo observado em nosso trabalho uma
412 vez que a maior taxa de concepção foi encontrada para aquelas fêmeas que estavam tendo um
413 aumento gradual do seu status nutricional.

414 O baixo desempenho reprodutivo também pode ser explicado pelo estresse térmico
415 durante a estação desfavorável, onde Grunert et al.(2005), afirmam que os animais expostos a
416 estresse térmico costumam apresentar perda de libido, ocorrência de cios silenciosos,
417 disfunção ovariana, além de distúrbios da espermatogênese no macho, entre outras alterações.
418 Além disso, ao estudar fisiologia reprodutiva dos búfalos, Vale et al. (1988), reportaram que
419 os problemas de absorção embrionária e abortamento em búfalas, estariam relacionados ao
420 manejo inadequado, apontando que o estresse térmico era um dos possíveis fatores
421 responsáveis pelos deferidos distúrbios reprodutivos.

422 A deficiência de macro e micro elementos pode também esta relacionada diretamente
423 aos resultados obtidos durante nosso trabalho, uma vez que vacas com escore acima de 3
424 continuaram em anestro mesmo durante a estação desfavorável. Grunert et al. (2005) e Miller
425 et al.(1993a) afirmam que os minerais representam importantes componentes da eficiente
426 reprodução animal desde as fases iniciais do processo reprodutivo, quer seja a ovogênese ou
427 espermatogênese, como também durante os períodos de fecundação e gestação. Ao exemplo
428 do fósforo, que trata-se de um macroelemento mineral de extrema importância para a
429 reprodução, entretanto os solos brasileiros são extremamente carentes em fósforo (salva
430 exceções), causando assim deficiência deste na alimentação e como consequencia os animais
431 podem vir a apresentar anestro, diminuição da atividade cíclica dos ovários, diminuição da
432 secreção dos hormônios hipotalâmico-hipofisários, duração irregular do ciclo estral, maior
433 frequência de cistos ovarianos, maturidade tardia e aumento do intervalo entre partos.

434 **6 CONCLUSÃO**

435 Houve concentração da atividade reprodutiva em fêmeas bubalinas (*Bubalus*
436 *bubalis*), com predominância do ECO 1 na estação reprodutiva favorável e do ECO 2 na
437 estação desfavorável.

438 A maior taxa de prenhez foi observada durante a estação favorável.

439 7 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- 440 ADAMS, G. P.; JAISWAL, R.; SINGH, J.; MALHI, P. Progress in understanding ovarian
441 follicular dynamics in cattle. **Theriogenology**, v. 69, n. 1, p. 72-80, 2008.
- 442 ALAPATI, A.; KAPA, S. R.; JEEPALYAM, S.; MOORTHY, S.; RANGAPPA, P.;
443 YEMIREDDY, K.R. Development of the body condition score system in Murrah buffaloes:
444 validation through ultrasonic assessment of body fat reserves. **Journal Veterinary Science**,
445 v.11, n.01, p.1-8, 2010.
- 446 ALBUQUERQUE, A. S. **Estudo da dinâmica reprodutiva anual do ciclo estral em fêmeas**
447 **bubalinas (*Buballus bubalis*)**, 2014. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) –
448 Universidade Estadual do Maranhão, São Luis, 2014.
- 449 ALEANDRI, V.; SPINA, V.; MORINI, A. The pineal gland and reproduction. **Human**
450 **Reproduction**, v.2, n.3, p.225–235, 1996.
- 451 AWASTHI, M. K.; KHARE, A. KAVANI, F. S.; SIDIQUEE, G. M.; PANCHAL, M. T.;
452 SHAH, R. R. Is one-wave follicular growth during the estrous cycle a usual phenomenon in
453 water buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Animal Reproduction Science**, v. 92, n. 3-4, p. 241-253,
454 2006.
- 455 BARUSELLI, P. S.; CARVALHO, N. A. T. de. Biotecnologias da reprodução em bubalinos
456 (*Bubalus bubalis*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.29, n.1,
457 p.4-17, jan./mar. 2005.
- 458 BARUSELLI, P. S.; CARVALHO, N. A. T. Reproduction Management and artificial
459 insemination in buffalo. In: 1 Buffalo Symposium of Americas, 1, 2002, Belém, PA.
460 **Proceedings ...** Belém, PA: BSA, 2002. p.119-143.
- 461 BARUSELLI, P. S.; MUCCIOLO, R. G.; VISINTIN, J. A.; VIANA; W. G.; ARRUDA, R. P.;
462 MADUREIRA, E. H.; OLIVEIRA, C. A.; MOLERO-FILHO, J. R. Ovarian follicular
463 dynamics during the estrous cycle in buffalo (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, v. 47, p.
464 1531-47, 1997.
- 465 BEEF POINT. **Utilização da ultrassonografia na reprodução de bovinos**, 2010. Disponível
466 em: <[http://www.beefpoint.com.br/cadeia-produtiva/dicas-de-sucesso/utilizacao-da-](http://www.beefpoint.com.br/cadeia-produtiva/dicas-de-sucesso/utilizacao-da-ultrassonografia-na-reproducao-de-bovinos-66805/)
467 [ultrassonografia-na-reproducao-de-bovinos-66805/](http://www.beefpoint.com.br/cadeia-produtiva/dicas-de-sucesso/utilizacao-da-ultrassonografia-na-reproducao-de-bovinos-66805/)>. Acesso em: 20 de maio de 2016.
- 468 BERNARDES, O. Bubalinocultura no Brasil: situação e importância econômica. **Revista**
469 **Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.3, p.293-298, 2007.
- 470 BERNARDI, C. C. **Conflitos sócio-ambientais decorrentes da bubalinocultura em**
471 **territórios pesqueiros artesanais: O Caso Olinda Nova do Maranhão**. 2005. Dissertação
472 (Mestrado) – Universidade Católica de Brasília – Distrito Federal, 2005.
- 473 BEZERRA, D. C. **Sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo**
474 **(IATF) em fêmeas bubalinas (*Bubalus bubalis*) na Amazônia Equatorial**. 2016. 100f. Tese
475 (Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede
476 BIONORTE) – Universidade Federal do Maranhão, Maranhão, 2016.

- 477 BITTMAN, E. L.; KARSCH, F. J. Nightly duration of pineal melatonin secretion determines
478 the reproductive response to inhibitory day lengths in the ewe. **Biology of Reproduction**,
479 v.30, p.583-593, 1984.
- 480 BORGHESE, A. **Buffalo production and research**. In: Technical Series 67. Food and
481 Agriculture Organization, Rome, Italy, 2005.
- 482 CAMPANILE, G.; BARUSELLI, P. S.; VECCHIO, D.; PRANDIC, A.; NEGLIA, G.;
483 CARVALHO, N. A. T.; SALES, J. N. S. GASPARRINI, B.; D'OCCHIO, M. J. Growth,
484 metabolic status and ovarian function in buffalo (*Bubalus bubalis*) heifers fed a low energy or
485 high energy diet. **Animal Reproduction Science**, v.122, p.74–81, 2010.
- 486 CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA, 2006, Recife. **Anais...** Recife: Sazonalidade
487 de partos em búfalas mestiças das raças Murrah x Mediterrâneo no estado de Rondônia. 2006.
488 CD-ROM.
- 489 DAMÉ, M. C. F. Búfalo: animal de tração. Pelotas: **Empresa Brasileira de Pesquisa**
490 **Agropecuária**, 2006. 24p.
- 491 DANELL, B. **Oestrous behaviour, ovarian morphology and cyclical variation in follicular**
492 **system and endocrine pattern in water buffalo heifers**. 1987. 124f. Thesis (Doctorat) -
493 Faculty of Veterinary Medicine, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala,
494 Sweden.
- 495 DEVKOTA, B. BOHARA, T. P.; YAMAGISHI, N. Seasonal variation of anestrus
496 conditions in buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Southern Nepal. **Asian Journal of Animal and**
497 **Veterinary Advances**, v.7, n.9, p.910-914, 2012.
- 498 DROST, M. Bubaline versus bovine reproduction. **Theriogenology**, v. 68, p. 447-449, 2007.
- 499 DYCE, K. M., SACK, W. O. WEINSING, C. J. G. **Textbook of veterinary anatomy**.
500 Philadelphia: WB Saunders, 856 p.1996.
- 501 FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Agriculture data. 2013. Disponível
502 em: <<http://faostat3.fao.org/home/index.html#download>>. Acesso em: 10 de novembro de
503 2016.
- 504 FIELDS, M. J.; FIELDS, P. A. Morphological characteristics of bovine corpus luteum during
505 the estrous cycle and pregnancy. **Theriogenology**, v.45, p.1295-1355, 1996.
- 506 FORTUNE, J. E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biology of**
507 **Reproduction**. v.50, p. 225-32, 1994.
- 508 GASTAL, M. O.; GASTAL, E. L.; SPINELLI, V.; GINTHER, O. J. Body conditions
509 influences diameters of the ovulatory follicle in mares. **Biology of Reproduction**, v. 62, p.
510 222, 2000.
- 511 GIMENES, L. U. et al. Ultrasonographic and endocrine aspects of follicle deviation, and
512 acquisition of ovulatory capacity in buffalo (*Bubalus bubalis*) heifers. **Animal Reproduction**
513 **Science**, v. 123, p. 175-179, 2011.

- 514 GIMENES, L. U.; FANTINATO NETO, P.; ARANGO, J. S. P.; AYRES, H.; BARUSELLI,
515 P. S. Follicular dynamics of *Bos indicus*, *Bos taurus* and *Bubalus bubalis* heifers treated with
516 norgestomet ear implant associated or not to injectable progesterone. **Animal Reproduction**
517 **Science**, v. 6, p. 256, 2009.
- 518 GRIFFIN, P. G., GINTHER, O. J. Research applications of ultrasonic imaging in
519 reproductive biology. **Journal of Animal Science**, v. 70, p. 953–972, 1992.
- 520 GRUNERT, E.; BIRGEL, E.H.; VALE, W. G.; JUNIOR, E. H. B. **Patologia e clínica da**
521 **reprodução dos animais mamíferos domésticos: ginecologia**. 1. ed. São Paulo: 511 p.,
522 Varela, 2005.
- 523 HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**. 6. ed. São Paulo: p.582, Manole, 1995.
- 524 HAFEZ, E. S. E., HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7.ed. Barueri: 513 p., Manole, 2004.
- 525 HAFEZ, E. S. E.; JAINUDEEN, M. R.; ROSNINA, Y. Hormones, growth factors and
526 reproduction. In: HAFEZ, E. S. E., HAFEZ, B. **Reproduction in Farm Animals**. 7th Ed.
527 Philadelphia: Lippincott, p. 33-54, 2000.
- 528 INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE), Diretoria de
529 Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, **Pesquisa da Pecuária Municipal**, 2015.
530 Disponível em: <www.ibge.gov.br>. Acesso em: 10 de outubro 2016.
- 531 JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. C. **Histologia clássica**, 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara
532 Koogan, 1995. 433p.
- 533 KHAN, F. A.; DAS, G. K. Follicular characteristics and intrafollicular concentrations of nitric
534 oxide and ascorbic acid during ovarian acyclicity in water buffalo (*Bubalus bubalis*).
535 **Tropical Animal Health and Production**, v. 44, p. 125–131, 2012.
- 536 LEAL, L. S. **Estudo morfofisiométrico de ovários e maturação ovocitária in vitro em**
537 **bubalinos e bovinos nas diferentes fases da atividade reprodutiva**. 2008. 180f. Tese
538 (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia,
539 Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- 540 MADUREIRA, E. H.; PIMENTEL, J. R. V. IATF como ferramenta para melhorar a
541 eficiência reprodutiva. **Anais.... Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**, 16, Goiânia,
542 GO. Anais: p. 1-8, 2005.
- 543 MANIK, R. S.; PALTA, P.; SINGLA, S. K.; SHARMA, V. Folliculogenesis in buffalo
544 (*Bubalus bubalis*): a review. **Reproduction Fertility and Development**. v. 14, n. 5-6, p. 315-
545 325, 2002.
- 546 MANIK, R. S.; SINGLA, S. K.; PALTA, P.; MADAN, M. L. Ovarian follicular dynamics
547 monitored by real-time ultrasonography during oestrous cycle in buffalo (*Bubalus bubalis*).
548 **Asian-Australasian Journal Animal Science**, v. 11, n. 5, p. 480-4485, 1998.

- 549 MARANHÃO. Setor de Epidemiologia e Estatística, Coordenadoria de Defesa Animal,
550 Agência Estadual de Defesa Agropecuária do Estado do Maranhão. **Efetivo Bubalino**. São
551 Luís, 2012.
- 552 MARQUES, J. R. F.; CARDOSO, L. S. A bubalinocultura no Brasil e no Mundo. In:
553 SIMPÓSIO BRASILEIRO DE BUBALINOCULTURA, 1., 1997, Cruz das Almas.
554 **Anais...** Cruz das Almas: Escola de Agronomia da Universidade Federal da Bahia, p.10-221,
555 2012.
- 556 MARTINS, C. M.; CASTRICINI, E. S. C.; SÁ FILHO, M. F.; GIMENES, L. U.;
557 BARUSELLI, P. S. Dinâmica folicular em novilhas e vacas Nelore (*Bos indicus*) tratadas
558 com dispositivo intravaginal de progesterona novo ou reutilizado associado ou não á
559 progesterona injetável. **Acta scientiae veterinariae**, v. 33, n. 1, p. 227, 2005.
- 560 MILLER, J. K.; BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA, E.; MADSEN, F. C. **Oxidative stress,**
561 **antioxidants and animal function**. *J. Dairy Sci.* 76: 2812, 1993^a.
- 562 NUNEZ, Q. M. Morfologia del tracto genital de los pequeños ruminantes. **Revista Científica,**
563 v.3, p.77-86, 1993.
- 564 OBA, E. Tópicos atualizados ligados à reprodução na espécie bubalina. **IN: Contribuição ao**
565 **estudo dos bubalinos: período de 1972-2001: palestras.** Botucatu, SP: FMVZ/UNESP, p.
566 179-198, 2003.
- 567 PEREIRA, A. R.; ANGELOCCI, L. R.; SENTELHAS, P. C. **Agrometeorologia:**
568 **Fundamentos e Aplicações Práticas.** Guaíba – RS: Livraria e Editora Agropecuária, 478 p,
569 2002.
- 570 PEREIRA, R. G. A. et al. Eficiência reprodutiva de búfalos. **IN: Documentos/Embrapa**
571 **Rondônia**, 2007. Porto Velho, p. 15, 2007.
- 572 PERERA, B. M. A. O. A review of experiences with oestrous synchronization in buffaloes in
573 Sri Lanka. **Buffalo**. *Journal*, v.1 (Suppl.), p.105–114,1987.
- 574 PERERA, B. M. A. O.; VALE, W. G.; PICANÇO, N. S. A review of experiences with
575 oestrous synchronization in buffaloes in Sri Lanka. **Buffalo Journal**, v. 1, p.105-114, 1977.
- 576 PRESICCE, G. A. Reproduction in the water buffalo. **Reproduction in domestic animais**, v.
577 42 Suppl 2, p. 24-32, set. 2007.
- 578 PRESICCE, G. Ovarian follicular dynamics and hormonal profiles in heifer and mixed-parity
579 Mediterranean Italian buffaloes (*Bubalus bubalis*) following an estrus synchronization
580 protocol. **Theriogenology**, v.61, p.1343–1355, 2005.
- 581 RIBEIRO NETO A. C.; BARBOSA, S. B. P.; PEREIRA, R. G. de A.; LOPES, C. R. de A.;
582 REZENDE, F. M. de. Sazonalidade de partos em búfalas mestiças das raças Murrah x
583 Mediterrâneo no estado de Rondônia. In: ZOOTEC 2006, 2006, Recife. **Anais...** Recife: 2006.
584 CD-ROM.
- 585 RIBEIRO, H. F. L. Característica do manejo reprodutivo em búfalos na Amazônia. In: **Anais**
586 **do 1º Congresso Brasileiro de Especialidades em Medicina Veterinária**, 2002, Curitiba,
587 Brasil. Curitiba: [s.n.]. pp.101-104.

- 588 RIBEIRO, H. F. L. **Reprodução de bubalinos na Região Amazônia**. 2008. Disponível em:
589 <www.cienciaanimal.ufpa.br/CA_selecao/M/2010/biblio/Prod/.../RIBEIRO_2008.pdf>.
590 Acesso em: 07 de novembro de 2016.
- 591 RODRIGUES, C. F. C.; IAPICHINI, A. M.; LISERRE, K. B.; SOUZA, C.; FACHINI, R. H.
592 & REICHERT. Oportunidades e desafios da bubalinocultura familiar da região sudoeste
593 paulista. **Revista Tecnologia e Inovação Agropecuária**, v. 23, p.100-109, 2008.
- 594 ROY, D. J.; MULLICK, D. N. Endocrine functions of corpus luteum of buffaloes during
595 estrus cycle. **Endocrinology**, v.75, p.284-7, 1964.
- 596 ROY, K. S.; PRAKASH, B. S. Seasonal variation and circadian rhythmicity of the prolactina
597 profile during the summer months in repeat – breeding Murrah buffalo heifers.
598 **Reproduction Fertility and development**, v.19, n.4, p.569-575, 2007.
- 599 SANTOS, C. L. R. dos; SANTOS JÚNIOR, J. R. dos; CUNHA, M. C. da; NUNES, S. R. F.;
600 BEZERRA, D. C.; TORRES JÚNIOR, J. R. de S.; CHAVES, N. P. Nível tecnológico e
601 organizacional da cadeia produtiva da bubalinocultura de corte no estado do Maranhão.
602 **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 83, p. 1-8, 2016.
- 603 SARTORI, R.; FRICKE, P. M.; FERREIRA, J. C. P.; GINTHER, O. J.; WILTBANK, M. C.
604 Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. **Biology of**
605 **Reproduction**, v. 65, n. 5, p. 1403-1409, nov. 2001.
- 606 SENGER, P. L. **Pathways to pregnancy and parturition, 2003**. Moscow: Current, p. 368.
- 607 SERRA, O. R. **Condições de manejo, preservação e caracterização fenotípica do**
608 **grupamento genético equino “Baixadeiro”**. 2004. 77 f. Dissertação (Mestrado em
609 Agroecologia – Escola de Agronomia - UEMA). Universidade Estadual do Maranhão, São
610 Luís, 2004.
- 611 TANEJA, M.; ALI, A.; SINGH, G. Ovarium follicular dynamic in water buffalo.
612 **Theriogenology**, v.46, p.121-130, 1996.
- 613 VALE, W. G. et al. Involução uterina e atividade ovariana pós-parto em búfalos (*Bubalus*
614 *bubalis*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 10p. 187-192, 1986.
- 615 VALE, W. G.; OHASHI, O. M.; SOUSA, J. S.; RIBEIRO, H. F. L. Studies on the
616 reproduction of water buffalo in the Amazon basin. **Livestock in Latin America**. Vienna:
617 International Atomic Energy Agency, p.201-210, 1990.
- 618 VALE, W. G.; RIBEIRO, H. F. L. Características reprodutivas dos bubalinos: puberdade,
619 ciclo estral, involução uterina e atividade ovariana no pós-parto. **Revista Brasileira de**
620 **Reprodução Animal**, v.29, p.63-73, 2005.
- 621 VALE, W. G.; WEITZE, K. F.; GRUNERT, E. Estrous behaviour and ovarian function in
622 water buffalo cows (*Bubalus bubalis*) under Amazon conditions. In: International Congress
623 on Animal Reproduction and AI, 10, 1984. Urbana, IL. **Proceedings...** Urbana, IL: ICAR, v.
624 2, p.154-156, 1984.

- 625 VALE, W.G. Effects of environment on buffalo reproduction. In: VIII WORLD BUFFALO
626 CONGRESS. **Italian Journal of Animal Science**, vol. 6, (Suppl. 2), p.130-142, 2007
- 627 VASCONCELOS, A. T. C. **Búfalo (*Bubalus bubalis*) do Maranhão**. v.1, p.160, 2012.
- 628 VIANA JHM, FERREIRA AM, SÁ WF, CAMARGO LSA. Características morfológicas e
629 funcionais do corpo lúteo durante o ciclo estral em vacas da raça Gir. **Arquivo Brasileiro de**
630 **Medicia Veterinária e Zootecnia**, v.51, p.251-256, 1999.
- 631 WILTBANK, M. C.; SANGSRITAVONG, S.; COMBS, D. K.; SARTORI, R.;
632 ARMENTANO, L. E. High feed intake increases liver blood flow and metabolism of
633 progesterone and estradiol-17 beta in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 2831-
634 2842, 2002.
- 635 YINDEE, M.; TECHAKUMPHU, M. T.; LOHACHIT, C.; SIRIVAIYAPONG, S.; NA-
636 CHIANGMAI, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; VAN DER WEYDEN, G. C.;
637 COLENBRANDER, B. Follicular dynamics and oestrous detection in Thai postpartum
638 swamp buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, n. 1, p. e91-
639 6, fev. 2011.
- 640 ZICARELLI, L. Management in different environmental conditions. In: World Buffalo
641 Congress, 4, 1994, São Paulo. **Proceedings...** São Paulo: USP; WBC, 1994. p.15-39.
- 642 ZICARELLI, L. Stagionalità riproduttiva nella bufala. In: INTERNATIONAL COURSE OF
643 BIOTECHNOLOGY IN BUFFALO REPRODUCTION, 3th, Napoli, Itália, 1997.
644 **Proceedings...**, Napoli: *Bubalus bubalis* suppl., 1997, p. 29-52.
- 645 ZICARELLI, L.; VALE, W. G. Patrones reproductivos estacionales y no estacionales en el
646 búfalo doméstico. In: Berdugo JA, Vale WG. (Ed.). **Memorias del Curso Internacional de**
647 **Reproducción Bufalina. 2002, Medellín, Colombia**. Medellín: CATI, 2002. p.33-58

APÊNDICES

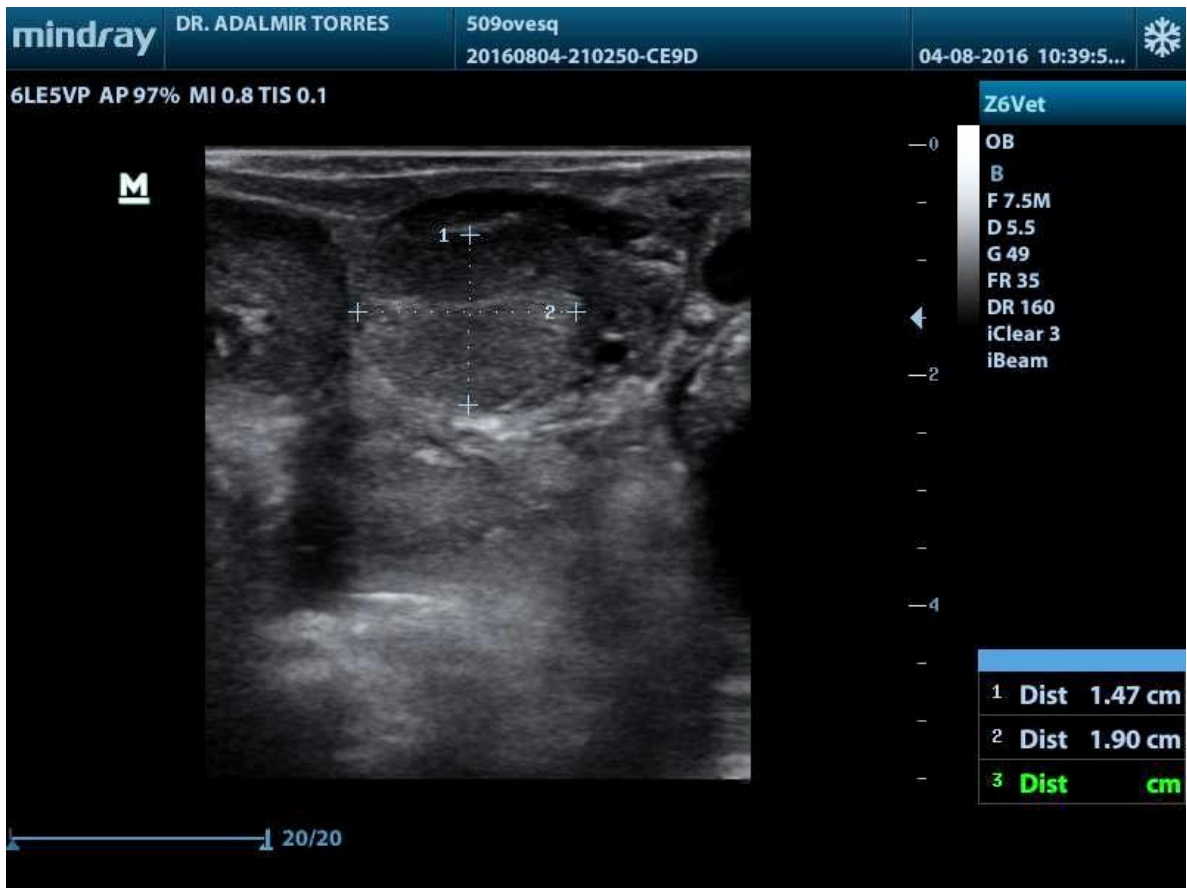


Ilustração de animal classificado como ECO 1.

Fonte: Melo, et al.(2016)

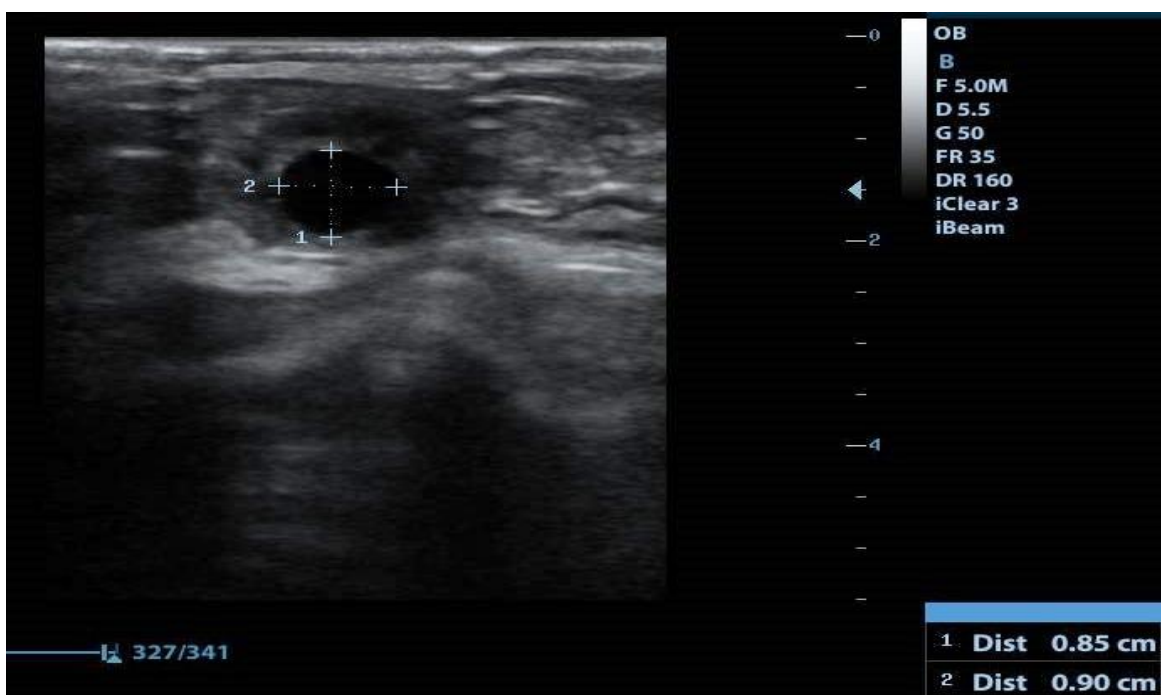


Ilustração de animal classificado como ECO 2.

Fonte: Melo, et al.(2016)

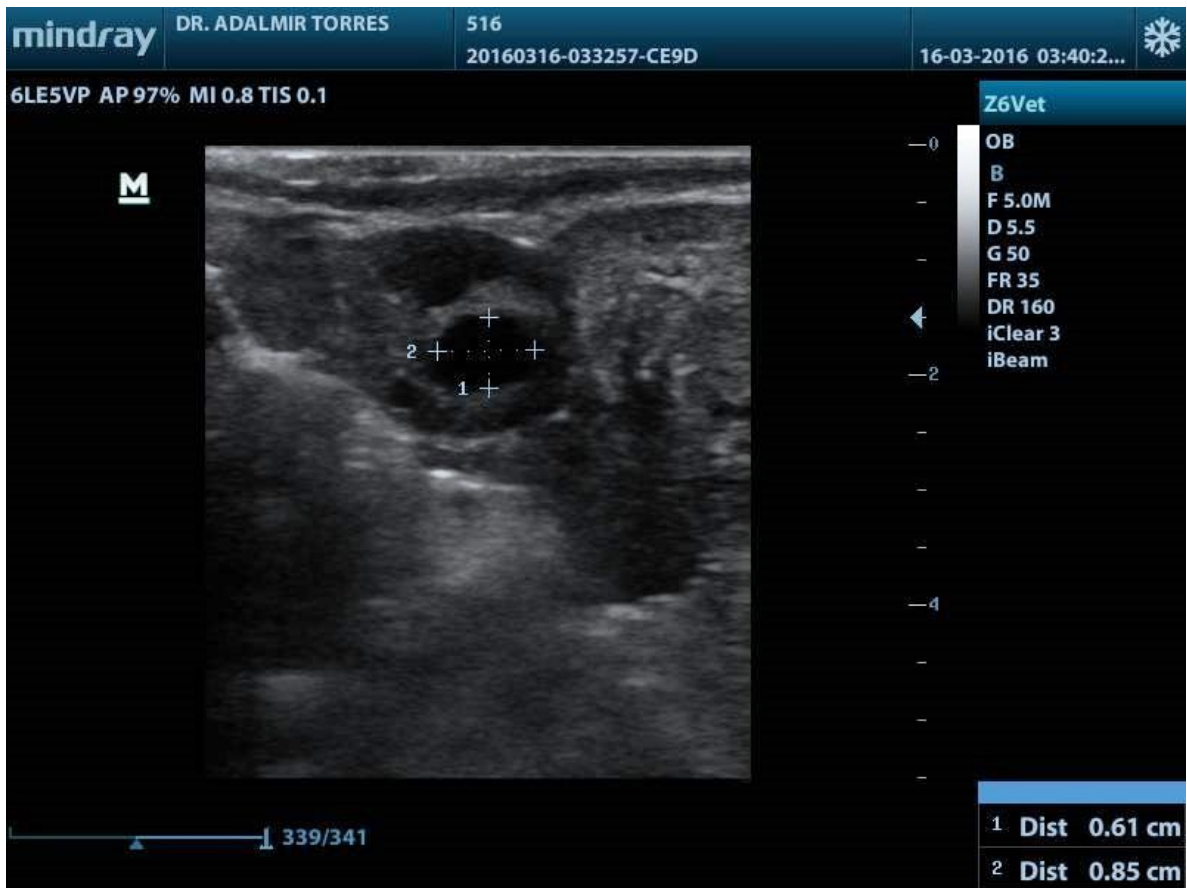


Ilustração de animal classificado como ECO 3.

Fonte: Melo, et al.(2016)