

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE REPRODUÇÃO ANIMAL E RADIOLOGIA
VETERINÁRIA

**Avaliação da taxa de ovulação em búfalas
(*Bubalus bubalis*) submetidas a protocolo
de sincronização da ovulação a base de
norgestomet**

EDMILSON DANIEL STELLA

Botucatu-SP
2005

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE REPRODUÇÃO ANIMAL E RADIOLOGIA
VETERINÁRIA

**Avaliação da taxa de ovulação em búfalas
(*Bubalus bubalis*) submetidas a protocolo
de sincronização da ovulação a base de
norgestomet**

EDMILSON DANIEL STELLA

Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina Veterinária e Zootecnia
da Universidade Estadual Paulista
“Julio de Mesquita Filho”, Campus -
Botucatu para obtenção do Título de
Mestre em Medicina Veterinária, área
de concentração Reprodução Animal

Orientadora: Profa. Dra. Eunice Oba

Botucatu-SP
2005

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

Nome: STELLA, Edmilson Daniel

Título: **Avaliação da taxa de ovulação em búfalas (*Bubalus bubalis*) submetidas a protocolo de sincronização da ovulação a base de norgestomet.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Campus - Botucatu para obtenção do Título de Mestre em Medicina Veterinária, área de concentração Reprodução Animal.

Banca Examinadora

Prof(a).Dr(a).Eunice Oba

Instituição UNESP-FMVZ-Botucatu

Julgamento_____Assinatura_____

Prof(a).Dr Roberto Mendes Porto Filho

Instituição UNIPINHAL

Julgamento_____Assinatura_____

Prof(a).Dr Sony Dimas Bicudo

Instituição UNESP-FMVZ-Botucatu

Julgamento_____Assinatura_____

Aos meus pais e minha irmã,
que em todos os momentos da minha
existência, souberam e sabem me dar
o apoio que preciso e também o
estímulo quando se faz necessário.

Amo vocês. Grazie.

Agradecimentos

Agradeço:

A **DEUS** pela dádiva da vida e pelo fim de mais uma jornada;

Ao incondicional apoio e abdições dos meus pais, Jamil e Catarina, e minha irmã Lenira; A vocês meu agradecimento, minha vida e meu tudo!

A minha orientadora Profa. Dra. Eunice Oba, que com o passar dos dias tornou-se amiga e mestra, meu muito obrigado;

A Fazenda Barra do Capinzal na pessoa de seus funcionários, pessoas simples, porém que me ensinaram muitas coisas. Grato pela experiência de vida;

Ao Dr. Roberto Reichert pela ajuda e atenção a nós dispensadas;

Ao Prof. Dr. Pietro Baruselli pela gentileza em ceder parte dos hormônios utilizados para a realização deste;

As amizades que conquistamos, por no fundo termos as mesmas afinidades: lealdade, alegria e paz. Meu obrigado aos amigos(as) Adriano Motta, Carla Moya, Gustavo Araújo, Juliana Conceição, Karina Alberti, Leandro Rodello, Marilu Gioso, João Ferreira, Victor Bernardoni e Viviane Chirinea. E a outros amigos queridos não mencionados aqui;

Aos amigos Nélcio Carvalho e Fernando Vannucci pela ajuda e atenção a nós dispensadas durante nossa estadia na cidade de Registro;

Agradeço, por fim, aos caminhos da vida que nos trazem a lugares inusitados, nos levam ao convívio, à abdição, ao desentendimento e a reconciliação com as mais diversas e amadas pessoas. Hoje noto que nada é por acaso.

RESUMO

STELLA, E.D. **Avaliação da taxa de ovulação em búfalas (*Bubalus bubalis*) submetidas a protocolo de sincronização da ovulação a base de norgestomet.** 2005. 59p Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Botucatu – SP, 2005.

O objetivo do presente estudo foi o de avaliar a taxa de ovulação em fêmeas bubalinas submetidas a três diferentes protocolos hormonais com CRESTAR® na estação reprodutiva favorável (Fevereiro – Março). A avaliação da dinâmica folicular pós-retirada do implante e ovulação foi realizada através da ultrasonografia transretal com transdutor de 5MHz (Aloka 500) a cada 12 horas. Vinte e quatro búfalas Murrah em lactação com idade entre 3 e 8 anos, com mais de 45 dias de período pós-parto foram aleatoriamente divididas em três grupos: (Grupo 1=G1, n=8; Grupo 2=G2, n=8 e Grupo 3=G3, n=8). Todos os animais (G1, G2 and G3) receberam um implante intra-auricular de liberação de progesterona (3mg of norgestomet, CRESTAR®, Intervet) mais 2.0mg de benzoato de estradiol (IM; Benzoato de Estradiol, Index) em momento aleatório do ciclo estral (Dia 0, PM). Os implantes permaneceram por 9 dias (Dia 9, PM) e no momento da remoção houve administração de uma dose luteolítica de um análogo da $PGF_{2\alpha}$ (0.15mg d-cloprostenol, Croniben, Biogenesis) em todos os animais, sendo que os grupos G1 e G3 receberam também 500 UI de eCG IM (Novormon, Syntex). Dois dias após (D11), as búfalas dos grupos 1 e 2 (G 1 e G2) receberam 1000UI of hCG (IM, Vetecor, Calier) 42 horas após a remoção do implante. A análise estatística foi realizada pelo teste de Qui-Quadrado e as taxas de ovulação nos três grupos (G1, G2 e G3) foi de 62,5, 50,0 e 75,0% respectivamente. Não havendo diferenças estatísticas na taxa de ovulação entre os três grupos até o dia 13 ($P>0,05$).

ABSTRACT

STELLA, E.D. **Ovulation rates in buffaloes (*Bubalus bubalis*) submitted to a synchronization of ovulation with norgestomet.** 2005. 59p Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Botucatu –SP, 2005.

The objective of the present study was to evaluate the responses of three different hormonal protocols with CRESTAR[®] in buffaloes cows in the breeding season (February – March) aiming ovulation rate. Transrectal ultrasonography using a 5.0 MHz transducer probe (Aloka 500), were done daily in order to study follicular dynamics at each 12 hours after implant removal to verify the moment of ovulation. Twenty four cows with more than 45 days of post partum period were randomly allocated into three groups (Group 1=G1, n=8; Group 2=G2, n=8 and Group 3=G3, n=8). All buffaloes (G1, G2 and G3) received an auricular implant progesterone releasing device (3mg of norgestomet, CRESTAR[®], Intervet) plus 2.0mg estradiol benzoate (IM; Benzoato de Estradiol[®], Index) at random stages of estrous cycle (Day 0, PM). The implants remained for 9 days. CRESTAR[®] was removed and a luteolytic dose of PGF_{2α} analog (0.15mg d-cloprostenol, Croniben[®], Biogenesis) was administered on Day 9 (D9, PM). On this day, only buffaloes in G1 and G3 received 500 UI of eCG IM (Novormon[®], Syntex). After two days (D11), buffaloes in groups 1 and 2 (G1 and G2) received 1000UI of hCG (Vetecor, Calier) 42 hours after implant removal. The statistics analysis was made by Chi-square tests (X^2), ovulation rates in three groups (G1, G2 and G3) was 62.5, 50 and 75% respectively. No differences in ovulation rates among the groups until day 13 were found ($P>0.05$).

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

BE	-Benzoato de Estradiol
CIDR®	- <i>Controlled Internal Drug Release</i>
dL	- Decilitro
eCG	- Gonadotrofina coriônica eqüina
FSH	- Hormônio folículo estimulante
GnRH	- Hormônio liberador de gonadotrofinas
G1	- Grupo 1
G2	- Grupo 2
G3	- Grupo 3
hCG	- Gonadotrofina coriônica humana
IATF	- Inseminação artificial em tempo fixo
IM	- Intramuscular
LH	- Hormônio luteinizante
Mg	- Miligrama
mL	- Mililitro
Mm	- Milímetros
Ng	- Nanograma
µg	- Micrograma
P	- Nível de significância
P4	- Progesterona
PGF2 α	- Prostaglandina F2alfa
PRID®	- <i>Progesterone Releasing Intravaginal Device</i>
VE	- Valerato de Estradiol
US	- Ultra-sonografia

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1	Sincronia da ovulação: animais que apresentaram ovulação no intervalo compreendido entre D11(18:00h) a D3(18:00h) nos três grupos experimentais
TABELA 2	Animais (%) com folículos responsivos a indução da ovulação no momento da administração (D11, 18:00h) e momento ótimo para administração de hCG.
TABELA 3	Médias ($\pm$ erro padrão) dos diâmetros foliculares de búfalas ($\varnothing$ F1) no dia da remoção do implante (D9) nos 3 diferentes grupos experimentais, expressos em milímetros
TABELA 4	Intervalo em horas entre a remoção do implante e a ocorrência da ovulação nos três diferentes grupos experimentais
TABELA 5	Concentrações médias ($\pm$ erro padrão) de progesterona (ng/mL) nos diferentes grupos experimentais de búfalas durante os protocolos hormonais.
TABELA 6	Médias ($\pm$ erro padrão) das concentrações de cortisol (μ g/dL) nos diferentes grupos (G1, G2 e G3) de búfalas durante os protocolos hormonais
TABELA 7	Concentrações médias ($\pm$ erro padrão) de cortisol (μ g/dL) dos animais de acordo com a ocorrência da ovulação nos 3 diferentes grupos experimentais isoladamente ou agrupados

LISTA DE FIGURAS

		Página
FIGURA 1	Tratamento hormonal administrado ao Grupo 1 (n=8), com a aplicação de eCG (500UI) no dia 9 e hCG (1000UI) no dia 11 do protocolo para sincronização da ovulação	26
FIGURA 2	Tratamento hormonal administrado ao Grupo 2 (n=8), somente com a aplicação de hCG (1000UI) no dia 11 do protocolo para sincronização da ovulação	27
FIGURA 3	Tratamento hormonal administrado ao Grupo 3 (n=8), somente com a aplicação de eCG (500UI) no dia 9 do protocolo	28
FIGURA 4	Representação esquemática da avaliação ultra-sonográfica durante os diferentes protocolos de indução da ovulação.	29
FIGURA 5	Taxa de ovulação (%) até 101 horas (D13, 18:00h) após a remoção do implante de progesterona em cada grupo experimental.	31
FIGURA 6	Avaliação do diâmetro folicular ovariano de búfala (553), no momento da indução da ovulação (D11, 18:00h) através do uso da ultra-sonografia.	34
FIGURA 7	Avaliação do diâmetro folicular ovariano de búfala (038), no momento da indução da ovulação (D11, 18:00h) através do uso da ultra-sonografia	34
FIGURA 8	Concentrações plasmáticas de progesterona (ng/mL) nos 3 diferentes protocolos, com diferença estatística entre os dias do mesmo grupo (letras maiúsculas) e no mesmo dia entre os tratamentos (letras minúsculas) em búfalas	37
FIGURA 9	Concentração plasmática de cortisol (µg/dl), com diferença estatística entre os dias do mesmo grupo (letras maiúsculas) e no mesmo dia entre os tratamentos (letras minúsculas) em búfalas	38

SUMÁRIO

SEÇÃO I

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	iii
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE FIGURAS	v
SUMÁRIO SEÇÃO I	vi
SUMÁRIO SEÇÃO II	viii
1.0 INTRODUÇÃO	1
2.0 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 ESTACIONALIDADE REPRODUTIVA.....	4
2.2 INFLUÊNCIA DO ESTRESSE NA REPRODUÇÃO.....	6
2.3 FISIOLOGIA DO CICLO ESTRAL.....	8
2.3.1 ESTRO E OVULAÇÃO.....	10
2.4 HORMÔNIOS UTILIZADOS PARA MANIPULAÇÃO DO CICLO ESTRAL.....	12
2.4.1 PROTAGLANDINA PGF _{2α}).....	12
2.4.2 PROGESTÁGENOS.....	13
2.4.3 ESTRADIOL.....	14
2.5 SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO COM HORMÔNIO LIBERADOR DE GONADOTROFINAS (GnRH), HORMÔNIO LUTEINIZANTE (LH) ASSOCIADO A PROTAGLANDINA PARA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO.....	15
2.6 ASSOCIAÇÃO DE PROGESTERONA OU PROGESTÁGENOS COM ESTRÓGENOS NA SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO PARA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO	17
2.7 GONADOTROFINAS PLACENTÁRIAS (hCG/eCG).....	20
2.7.1 ASSOCIAÇÃO DE PROGESTERONA OU PROGESTÁGENOS E GONADOTROFINAS PLACENTÁRIAS (hCG/eCG) NA SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO PARA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO	21

3.0	MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1	LOCAL DO EXPERIMENTO	25
3.2	ANIMAIS	25
3.3	DELINAMENTO EXPERIMENTAL.....	25
3.4	DIVISÃO EM GRUPOS	25
3.5	TRATAMENTOS HORMONAIS	26
3.6	GRUPO 1 (G1)	26
3.7	GRUPO 2 (G2)	27
3.8	GRUPO 3 (G3)	27
3.9	EXAMES ULTRA-SONOGRÁFICOS	28
3.10	COLHEITA DE SANGUE E ANÁLISE HORMONAL	29
3.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
4.0	RESULTADOS	31
5.0	DISCUSSÃO	39
6.0	CONCLUSÕES	43
7.0	REFERÊNCIAS	44

SUMÁRIO

SEÇÃO II

1.0	NORMAS PARA PUBLICAÇÃO	
	REVISTA <i>BIOLOGY OF REPRODUCTION</i>	57
1.1	<i>Guidelines for Manuscript Preparation</i>	57
1.2	<i>Introduction</i>	58
1.3	<i>Materials and Methods</i>	58
1.3.1	<i>Materials</i>	58
1.3.2	<i>Methods</i>	58
1.4	<i>Results</i>	59
1.5	<i>Discussion</i>	59
1.6	<i>References</i>	59
1.7	<i>Illustrative Material</i>	61
1.7.1	<i>Tables</i>	62
1.7.2	<i>Figures</i>	62
1.7.3	<i>Digital Graphics Files</i>	63
1.8	<i>Supplemental Data</i>	65
2.0	FORMATO PUBLICAÇÃO	67
2.1	<i>TITLE</i>	67
2.2	<i>SUMMARY</i>	67
2.3	<i>ABSTRACT</i>	67
2.4	<i>INTRODUCTION</i>	68
2.5	<i>MATERIAL E METHODS</i>	69
2.5.1	<i>ANIMALS</i>	69
2.5.2	<i>SYNCHORIZATION PROTOCOL</i>	69
2.5.3	<i>ULTRASOUND EVALUATION FOR FOLLICULAR DYNAMICS AND CORTISOL CONCENTRATIONS</i>	69
2.5.4	<i>STATISTICAL ANALYSIS</i>	70
2.6	<i>RESULTS</i>	70
2.7	<i>DISCUSSION</i>	71
2.8	<i>CONCLUSION</i>	74
2.9	<i>REFERENCES</i>	74

3.0	<i>SUPPLEMENTAL DATA</i>	77
3.1	<i>FIGURES LIST</i>	77
3.2	<i>TABLES</i>	77
3.3	<i>FIGURES</i>	78

1.0 Introdução

Os búfalos foram introduzidos na Ásia, Egito, Grécia, Rússia, Índia, Paquistão, China, Bulgária, Itália e diversos países do Ocidente. Sua entrada no Brasil ocorreu, quer pelo Norte, quer pelo Sul, e em meados de 1960 no Estado de São Paulo. Os bubalinos hoje ocupam espaços que os bovinos não o fazem tão eficientemente, sendo assim explorados na produção de carne e leite (OBA, 2003a).

Dada sua rusticidade, longevidade, grande capacidade adaptativa, e resistência às doenças infecto-contagiosas e aos endo e ecto-parasitas a sua fama tem-se estendido a todos os países do mundo. Além disso, o rebanho bubalino brasileiro tem-se multiplicado a uma taxa de 85% de eficiência reprodutiva (RAMOS, 2003).

Hoje, esse animal responde por 20 a 30% de toda a energia utilizada na agricultura nos países da Ásia; onde é o clássico animal de trabalho e faz parte integrante de pequenas propriedades e, devido a sua grande docilidade, pode ser manejado por mulheres e crianças, atuando como montaria, tração em arado ou até no escoamento da produção de arroz devido a poderosos e deliberados movimentos, cascos largos e flexibilidade de membros sendo incapazes de ficarem retidos em áreas alagadas ou pantanosas (RAMOS et al., 2003)

O rebanho bubalino brasileiro, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2005), apresenta crescimento anual de 1,5%, girando em torno de 1 milhão de bubalinos distribuídos por todo o território nacional, a maioria concentrada na região norte (59,7%) e sul (16,34%), além de outros pequenos núcleos de criação (23,95%) nas demais regiões. Durante os últimos 25 anos a população mundial de búfalos cresceu em torno de 50%, associado a aumento por volta de 200% na produção de leite de búfala, o que representa 10% da produção mundial de leite (CARVALHO et al., 2002).

A espécie não atinge produções leiteiras tão grandes para se estabelecer comparações com raças bovinas especializadas. Contudo, levando-se em conta sua dupla aptidão, podem preencher grandes espaços na pecuária nacional por ocuparem áreas praticamente improdutivas como terras

inundáveis e semi-inundáveis, banhados e campos pobres (RAMOS, 2003). A carne dos bubalinos é consumida normalmente pela população, sem distinção de qualidade e palatabilidade, em relação aos bovinos (BARUSELLI, 2000).

As Biotécnicas da Reprodução representam uma forma de aumentar a eficiência produtiva e reprodutiva – quantitativa e qualitativa do rebanho e, através da Inseminação Artificial (I.A.), permitir o desenvolvimento de criações de alto valor zootécnico. Porém, para um programa de Inseminação Artificial ter sucesso é necessário que vários fatores sejam rigorosamente controlados, como a detecção do cio, o qual depende de fator humano, número de observações diárias, duração das observações, proporção rufião:fêmea e libido dos rufiões (OBA, 2003b).

Associado a essa gama de contra-tempos nas quais esbarram os programas de I.A., a espécie apresenta alguns problemas reprodutivos como maturidade sexual tardia, cio silencioso (principalmente no verão), longo período de anestro pós-parto e baixas taxas de concepção (MADAN et al., 1996; CRUZ, 2000; SINGH et al., 2000).

Considerando-se então, que há algumas peculiaridades básicas na fisiologia reprodutiva de búfalas, a aplicação de tecnologias como a sincronização de cio e I.A., já costumeiras em outras espécies, necessitam o desenvolvimento de mais estudos nesta área específica (MADAN et al., 1996), devido às informações sobre o controle farmacológico do ciclo estral na espécie bubalina serem limitadas (BARUSELLI, 2000).

Alguns pesquisadores (ZICARELLI et al., 1997; BÓ, 2004; ULLAH et al., 2004) propuseram estudos com o propósito de sincronizar a ovulação, desenvolvendo assim, protocolos que permitiram a realização da inseminação artificial em tempo fixo, ou seja, sem a necessidade de observação do estro, com taxas de concepção aceitáveis, além de facilitar o manejo do rebanho e otimizar o emprego desta biotecnologia a campo. Assim, foram observadas grandes economias de mão-de-obra, otimizando o trabalho em dias pré-determinados (Baruselli, 2000).

A grande vantagem da sincronização da ovulação na bubalinocultura, é que esta pode proporcionar uma distribuição dos partos uniformemente ao longo do ano, evitando-se picos de produção leiteira seguidos de períodos de

baixa produção, mantendo-se constante a oferta de derivados lácteos de valor mercantil diferenciado como acontece com a mussarela.

Muitas propriedades conhecem os benefícios produtivos oriundos do correto manejo reprodutivo do rebanho, porém não lançam mão desses recursos por se tratar de um ônus a mais à cadeia produtiva.

Assim, para baratear o custo de protocolos a base de progesterona que utilizam tanto a Gonadotrofina Coriônica Equina quanto a Gonadotrofina Coriônica Humana, conforme tratamento proposto por Porto-Filho (2004) o presente trabalho teve como objetivo:

- Avaliar a taxa de ovulação em protocolo de sincronização da ovulação a base de norgestomet, sem a administração da Gonadotrofina Coriônica Equina;
- Avaliar a taxa de ovulação em protocolo de sincronização da ovulação a base de norgestomet, sem a administração da Gonadotrofina Coriônica Humana;
- Avaliar as concentrações plasmáticas de progesterona e cortisol nos animais.

2.0 Revisão de Literatura

2.1 Estacionalidade Reprodutiva

Barile (2005) destacou que na Itália a sazonalidade reprodutiva tem fortes implicações econômicas, onde a totalidade da produção leiteira é utilizada para a produção de queijo tipo mussarela. A demanda deste tipo de queijo é basicamente concentrada na primavera e verão, enquanto que a grande produção de leite acontece no outono e inverno.

Isto deve-se ao fato que a espécie apresenta um comportamento reprodutivo influenciado positivamente pela diminuição de horas de luz do dia. Segundo Barnabe et al. (1995), os búfalos são poliétricos estacionais de dias curtos semelhantes aos ovinos.

A glândula pineal tem importante função na regulação das respostas dos diferentes fotoperíodos por intermédio da liberação de melatonina, hormônio responsável por transferir a informação do período de horas de luz do dia para o eixo hipotalâmico-pituitário. Esse hormônio é secretado no período “escuro” do dia e sua concentração é baixa durante o período de “luz” do dia. O aumento na duração do período noturno (horas de “escuro”), aumenta os níveis de melatonina e constituiu a mensagem do fotoperíodo na glândula pineal para que esta regule a secreção hormonal (GORDON, 1999).

O maior papel biológico da melatonina é na regulação do eixo reprodutivo, incluindo a secreção de gonadotrofinas e início da puberdade, logo, apresentando maior concentração em animais sazonais. Este tipo de estratégia reprodutiva, de acordo com Larsen et al. (2003), envolve a sincronia do período de luz do dia com o período gestacional, assegurando desta forma, que a prole nasça em período favorável do ano e, desta forma, venha a favorecer a sobrevivência do neonato, porém, o exato mecanismo de regulação do GnRH pela melatonina não é totalmente esclarecido. Malpaux et al.(1996), citam a influência da melatonina na secreção de LH, regulando a pulsatilidade de liberação do GnRH.

Quanto maior a distância entre as áreas de criação de búfalos e a linha do Equador, maior é o efeito estacional sobre a atividade reprodutiva. Assim no

sul do Brasil foi observado maior concentração de manifestação de cio no período do outono, sendo que durante os meses de março a julho, concentram-se 93,03% dos estros anotados durante todo o ano. Provavelmente o fotoperíodo seja o fator responsável pela regulação da ciclicidade reprodutiva na espécie bubalina, influenciando o fator nutricional com menor intensidade (BARUSELLI, 1993).

Baruselli et al. (2001) compilaram os dados oriundos da Associação Brasileira dos Criadores de Búfalos, referentes à distribuição de partos durante o ano em função da latitude do local de parição, com prenhez oriundas de monta natural. As datas de parição de 16.487 nascimentos, de três diferentes raças (Jafarabadi, n=1.771; Murrah, n=10.824; Mediterrâneo, n=3.831) no período de 1975 a 2000 foram analisadas. Os dados indicaram uma alta influência da latitude na distribuição dos partos durante o ano. Para os animais mantidos em baixas latitudes (de 0° a 8°), próximos à Linha do Equador, o número de nascimentos teve menor variação durante o ano. Entretanto, animais criados em regiões distantes da Linha do Equador (de 24° a 32°), apresentaram a maior concentração das partições no primeiro trimestre do ano. Essa distribuição de partos foi independente da raça do animal.

Em outra análise de dados nacionais (Região Centro-Oeste, número de nascimentos=452), no período de 1998 a 2000; onde Vale et al. (2001), averiguaram que a maior proporção de partos ocorreu no período entre Janeiro e Junho, com pouca ocorrência de parição nos outros meses e nenhuma no mês de Outubro.

Fortes correlações entre os fatores nutricional e estacionalidade reprodutiva foram encontrados por BARNABE et al. (1995), os quais promoveram a indução da ciclicidade em 20 novilhas búfalas, com peso inicial entre 250 e 336 quilos, através de suplementação alimentar com 9,8% de proteína bruta e 60% de nutrientes digestíveis totais, fornecida por 267 dias. O touro foi posto com as novilhas a partir do momento que cerca de 50% apresentaram sintomas de estro. Obtiveram no total 70% de prenhez cujos partos ocorreram entre o final do inverno e início da primavera (agosto e setembro).

2.2 INFLUÊNCIA DO ESTRESSE NA REPRODUÇÃO

O sistema endócrino pode ser alterado por intermédio do estresse de três maneiras possíveis. Primeiro como resposta a um estímulo específico como ocorre com os hormônios envolvidos na regulação do fluído corpóreo mediante uma hemorragia ou alteração metabólica. Por outro lado alguns sistemas hormonais apresentam respostas generalizadas mediante um estímulo, donde a amplitude de resposta é correlacionada à severidade do estímulo, como é o caso do eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal. E por último, quando o hormônio tem um papel importante na função corpórea normal e o estresse pode trazer alterações deletérias às funções normais a exemplo do sistema reprodutivo. O estresse através da ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal promove a liberação de corticoesteróides, o principal deles é o cortisol, aumentando as concentrações plasmáticas desse corticóide. (SMITH & DOBSON, 2002).

Os corticóides são sintetizados e liberados quando necessário, não sendo estocados nas células adrenais. O principal estímulo para sua secreção é o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). A secreção do ACTH é regulada principalmente pelo hormônio liberador de corticotropina (CRH), de origem hipotalâmica. A secreção de CRH, por sua vez, é controlada pelos níveis de glicocorticóides e por estímulos do sistema nervoso central. Os glicocorticóides possuem ação hiperglicemiantes por antagonismo da ação da insulina e por promoção da gliconeogênese a partir de aminoácidos e ácidos graxos livres (SPINOZA et al., 2002)

Dobson e Smith (2000) e Smith e Dobson (2002), revisaram os efeitos do estresse sobre a fertilidade. Sugeriram que este interfere negativamente na fertilidade através de alterações nos mecanismos que regulam precisamente a fase de crescimento folicular e ovulação de três diferentes formas. Primeiro, durante um prolongado período de estresse (estresse crônico), a frequência de liberação e pulsatilidade do GnRH/LH apresenta-se abaixo do normal, ocorrendo a fase inicial de recrutamento folicular porém não sendo capaz de promover o adequado desenvolvimento folicular, logo, há uma falha na manutenção do ciclo estral culminando num período de anestro. Num segundo

plano, em situações de curtos períodos de estresse (menor intensidade), o padrão de liberação de GnRH/LH pode ser suficiente para o desenvolvimento folicular, porém, susceptível a alterações ou interrupções por quaisquer outros estímulos. Neste caso há comprometimento na qualidade das células da granulosa e do oócito, desta forma, mesmo que ocorra a ovulação e fertilização, há falha no desenvolvimento do conceito até a gestação. Por fim, há a chance de desenvolvimento folicular até folículos ovulatórios, todavia, com padrões gonadotróficos insuficientes que não permitam a adequada produção de estradiol pelo folículo, promovendo um pico de LH insuficiente, incapaz de causar ovulação e luteinização, ocasionando clinicamente um cisto ovariano.

A concentração plasmática de cortisol no período pré-parto (parto = D0) em búfalas foi objeto de estudo de um grupo de pesquisa brasileiro (RIBEIRO et al., 2001), que durante os últimos 7 dias da gestação obtiveram amostras sanguíneas a cada 12 horas. Os valores de cortisol foram mensurados pela técnica de RIA, em fase sólida, e mantiveram-se a níveis basais nos dias ($0,35 \pm 0,24$ no dia -7 e $0,33 \pm 0,21$ ng/mL no dia -1; $p > 0,05$) durante o período avaliado, com aumento significativo ($p < 0,05$) no dia do parto ($0,69 \pm 0,39$ ng/mL).

Recente estudo comportamental na espécie bubalina foi realizado por Thomas et al., (2005), com animais da raça Murrah ($n=6$) que foram submetidos a três tratamentos antes da ordenha sendo: sem estimulação mamária prévia, estimulação prévia da glândula mamária e estimulação mamária com fornecimento de concentrado protéico. Os autores mostraram padrões de cortisol diferentes e variados de acordo com o manejo proporcionado aos animais e fase da ordenha em que estes se encontravam. Frisaram que mesmo procedimentos rotineiros com a ordenha, são capazes de promover aumentos plasmáticos de cortisol.

2.3 FISILOGIA DO CICLO ESTRAL

Os folículos nos bubalinos desenvolvem-se em ondas tais como nos bovinos (BARUSELLI et al., 1997; SING et al., 2000), onde cada onda folicular é caracterizada pelo crescimento sincrônico de um grupo de folículos onde apenas um (ou número espécie-específico) continua seu crescimento enquanto os outros regridem em intervalos variados (EVANS, 2003). Durante cada onda um folículo é selecionado, tornando-se maior e dominante sobre os outros, pela inibição de seus crescimentos através da secreção de inibina. Depois da dominância, o folículo pode ovular (folículo dominante ovulatório) ou sofrer atresia (folículo dominante não ovulatório), dependendo se a fase de dominância é associada à luteólise ou não (TANEJA et al., 1996; MANIK et al., 1998).

Segundo Cruz (2000), a transformação de folículos primordiais até folículos em crescimento e folículos terciários, aparentaram ser muito ineficientes. Esta ineficiência foi também observada no número relativo de folículos atrésicos mensurados como porcentagem dos folículos totais maiores que 1.0mm de diâmetro, sendo que a quantidade de folículos atrésicos foi maior em búfalas, se comparada aos bovinos.

Com o uso da ultra-sonografia, Taneja et al. (1996); monitoraram 7 ciclos de 5 animais, observaram a ocorrência de uma (n=3 animais) e duas (n=4 animais) ondas de crescimento folicular, sendo que cada uma é caracterizada pelo desenvolvimento de um grande folículo, chamado dominante, e um variado número de folículos menores (não dominantes). Os autores não notaram diferença significativa na duração do ciclo estral com uma onda ($23,0 \pm 1,0$ dias) ou duas ($21,3 \pm 0,9$ dias). Para o padrão de uma onda, esta começou no dia $1,3 \pm 0,7$ com diâmetro máximo do folículo ovulatório de $15,7 \pm 0,3$ mm no dia $24,0 \pm 1,2$ do ciclo; para o padrão de duas, elas iniciaram, respectivamente, nos dias $1,8 \pm 0,6$ e $7,8 \pm 2,0$; com média do diâmetro máximo do folículo dominante na primeira e segunda onda, respectivamente, de $14,5 \pm 0,9$ mm e $15,5 \pm 0,9$ mm ($p > 0,05$) nos dias $11,3 \pm 1,3$ e $22,5 \pm 0,5$. Constataram também que animais avaliados por dois ciclos apresentaram duas ondas no primeiro e uma no segundo ciclo de crescimento folicular,

demonstrando que essa alteração no padrão de ondas não é reportada para os bovinos.

Já Baruselli et al. (1997), empregando a mesma técnica, avaliaram a dinâmica folicular em búfalas e notificaram em sua maioria (63,3%, n=19) o padrão de duas ondas foliculares com emergências de onda nos dias $1,16 \pm 0,50$ e $10,83 \pm 1,09$ (ovulação = dia zero), tendo também encontrado padrão de três ondas por ciclo (33,3%, n=10) com emergência de ondas nos dias $1,10 \pm 0,32$; $9,30 \pm 1,25$ e $16,80 \pm 1,22$; sendo o número de ondas correspondente à duração do ciclo. Ciclos de duas ou três ondas diferiram-se entre si ($p < 0,05$) no que diz respeito ao diâmetro máximo do primeiro folículo dominante ($15,10 \pm 2,33$ vs $11,90 \pm 1,68$ mm) e diâmetro do folículo ovulatório ($15,50 \pm 1,60$ vs $13,40 \pm 1,30$ mm).

Presicce et al. (2004) pesquisaram comparativamente a dinâmica folicular entre vacas pluríparas (n=10) e novilhas nulíparas (n=11) no ciclo seguinte a sincronização da ovulação com protocolo à base de progesterona (PRID®). Estes autores mostraram diferenças significativas nas taxas de crescimento folicular do primeiro folículo dominante (não ovulatório) ($1,6 \pm 0,0$ vs $1,2 \pm 0,0$ mm/dia; $p = 0,005$) e no máximo diâmetro deste ($13,8 \pm 0,6$ vs $10,5 \pm 0,6$ mm; $p = 0,006$) respectivamente para vacas e novilhas. A taxa de crescimento folicular do folículo dominante da segunda onda (ovulatório) e o diâmetro máximo também foi maior para vacas ($1,27 \pm 0,0$ vs $0,9 \pm 0,1$ mm/dia [$p = 0,032$]; $13,8 \pm 0,6$ vs $11,0 \pm 0,7$ mm [$p = 0,013$]) do que para novilhas.

Observações histológicas oriundas de ovários de abatedouros foram verificadas por Kumar et al. (1997), onde os autores avaliaram as populações foliculares presentes em 250 ovários de animais abatidos com diferentes idades e encontraram as proporções de área de folículos primordiais e estroma ovariano, respectivamente, de $38,1 \pm 2,5\%$ vs $61,8 \pm 2,5\%$ em novilhas pré-púberes e $28,7 \pm 5,1\%$ vs $58,7 \pm 7,1\%$ para animais senis. Ovários de animais adultos continham $14,4 \pm 6,2\%$ de tecido luteal ao passo que $40,62 \pm 3,6\%$ compunha-se de estroma ovariano, sendo esta relação (tecido luteal - estroma ovariano) apontada pelos autores como razão das baixas taxas de recuperação de oócitos de ovários contendo corpo lúteo, devido à alta proporção ovariana ocupada por células luteínicas, deste modo restringido o crescimento folicular.

Outro estudo da dinâmica folicular ovariana foi realizado por Ali et al. (2003), utilizando-se ovários de abatedouro, dividindo o ciclo estral das búfalas em quatro estágios: metaestro (dias 1º ao 4º), diestro precoce (5º ao 10º), diestro tardio (11º ao 17º) e proestro/estro (18º ao 21º). Através de estudos histológicos observaram que o número de folículos pequenos (<5mm) é maior no metaestro se comparado aos outros estágios do ciclo indicando que a onda folicular começa neste período. Não houve variação estatística ($p>0.05$) na quantidade de folículos de 5-8mm durante o metaestro e diestro tardio, sugerindo o padrão de duas ondas de crescimento folicular. Folículos maiores que 8 a 12mm de diâmetro são mais numerosos no diestro (tanto precoce, quanto tardio) do que no metaestro, proestro/estro. Foram encontrados maiores percentuais de folículos dominantes não atrésicos durante o diestro prematuro se comparado ao tardio (70% vs 43,8%), porém durante o proestro/estro, 100% dos folículos dominantes eram viáveis.

Presicce et al. (2005), com uso da ultra-sonografia, monitoraram por 60 dias a atividade ovariana de búfalas primíparas (G1, n=10) e pluríparas (G2, n=10) no período de pós-parto. Notaram que o tempo necessário para a completa involução uterina e foi de $31\pm 1,0$ dias para primíparas e de $33\pm 1,3$ dias para multíparas ($p=0,1$). A primeira ovulação pós parição ocorreu $25,5\pm 6,9$ dias para G1 e $15,5\pm 1,3$ dias para G2 e em 66,6% dos casos (8/12) ocorreu no ovário contra-lateral ao do corno gravídico. Os autores não observaram diferenças estatísticas entre os grupos 1 e 2 no que se diz respeito, respectivamente, às taxas de crescimento folicular do folículo ovulatório ($0,95\pm 0,18$ vs $1,07\pm 0,07$ mm/dia [$p=0,4$]) e diâmetro máximo deste ($13,5\pm 5$ vs $14,1\pm 0,4$ mm [$p=0,4$]).

2.3.1 ESTRO E OVULAÇÃO

Dias et al. (2001), trabalharam com diagnóstico ultra-sonográfico do momento ovulatório em búfalas inseminadas no estro espontâneo (Grupo Testemunha) e induzido por protocolos de inseminação artificial em tempo fixo com uso de progestágenos (Grupo Tratamento). Ambos os grupos foram inseminados artificialmente no momento da observação do maior diâmetro

folicular medido em milímetros, a partir das manifestações de estro. Estes autores verificaram que o intervalo médio entre o estro e a ovulação, aferido em horas, foi estatisticamente menor ($p < 0,01$) para as búfalas que ficaram gestantes se comparado às não gestantes, independente se tratadas ou não ($27 \pm 4,44$ vs $35,66 \pm 4,0h$). O intervalo (horas) médio entre a inseminação artificial e a ovulação (horas) para os animais gestantes e não gestantes foi de $12,55 \pm 5,68$ vs $19,10 \pm 2,79$ ($p < 0,01$), não encontrando diferenças estatísticas entre os tratamentos. Concluíram que a variabilidade do intervalo entre o início do estro e a ovulação não permitiu a obtenção de taxas mais elevadas de prenhez com IA pré-determinada e que, a I.A. realizada próxima à ovulação, em torno de 12 horas, foi eficaz na obtenção de prenhez.

A Inseminação Artificial com deposição cervical profunda de sêmen foi objeto de estudo proposto por Jacomini et al. (1991), utilizaram 21 búfalas e demonstraram que 56,45% dos estros iniciaram-se no período noturno. Com observação a cada quatro horas, 100% dos estros foram detectados. Já para observação a cada oito ou a cada doze horas, foi de 96,82 e 82,54%, respectivamente. A ovulação ocorreu em média, $21,04 \pm 4,56$ horas após o final do estro e $17,06 \pm 7,71$ horas após a inseminação artificial, sugerindo uma duração média do estro de 16 horas. Para as fêmeas que ficaram gestantes a ovulação ocorreu $14,5 \pm 5,21$ horas após a inseminação.

O intervalo entre o estro e a ovulação foi notificado por Baruselli em 1993, no Vale do Ribeira, estado de São Paulo. Foi constatado que a ovulação, ocorreu em média 17 horas após aceitação da monta.

A manipulação do desenvolvimento folicular e o controle da duração do ciclo estral e ovulação possibilitaram maior precisão e controle da sincronização de cio assim como da ovulação, sendo bom o suficiente para permitir a inseminação artificial em tempo fixo sem a necessidade da detecção do comportamento de cio (ABDULLAH et al., 2001). Além de que, nas averiguações do comportamento de estro na espécie bubalina ter sido menos marcante se comparado aos bovinos, talvez devido às concentrações de estradiol- 17β encontradas durante o ciclo estral normal serem relativamente mais baixas que a dos bovinos (CARVALHO et al., 2002).

Na Itália, Barile (2005) em revisão, descreveu que a variação da duração do comportamento de estro foi desde períodos curtos como 9 horas até períodos de 56 horas e que o melhor indicador que o animal está em cio foi a aceitação do macho; além de outros sinais mais fracos como micção freqüente, mugidos, edemaciação de vulva e descarga de muco vaginal. Indicaram como fatores determinantes na duração do ciclo estral e no grau de expressão comportamental de estro, o clima, a temperatura, o fotoperíodo e a nutrição, aos quais os animais são submetidos.

2.4 HORMÔNIOS UTILIZADOS PARA MANIPULAÇÃO DO CICLO ESTRAL

2.4.1 PROSTAGLANDINA (PGF_{2α})

Prostaglandinas endógenas são metabólitos do ácido aracdônico e sintetizadas principalmente pelas células do epitélio do endométrio uterino (FERNANDES et al., 1994). Exercem uma grande variedade de ações fisiológicas em todo o corpo, sendo que sua liberação ocorre em pulsos pelo endométrio uterino, sendo este o sinal luteolítico em algumas espécies, incluindo os bovinos (HAYASHI et al., 2003); sua ação é mediada por receptores de superfície celular no corpo lúteo (TSUBOI et al., 2002).

Seu efeito luteolítico é mencionado em diversos trabalhos (KOTWICA et al., 2002; WEBB et al., 2002), assim como o efeito luteolítico de seus análogos sintéticos tais como etiproston (COSTA et al., 2000), cloprostenol (ABDULLAH et al., 2001; WATTS et al., 2001; COLAZO et al., 2002), dinoprost (BRITO et al., 2002) e luprostiol (MISRA, 2003); sendo considerado a maior contribuição no processo de controle reprodutivo, pois a regressão do corpo lúteo é essencial para a ciclicidade normal, além de permitir o desenvolvimento de um novo folículo ovulatório (OKUDA et al., 2002; RUBIANES et al., 2003).

A utilização da prostaglandina e seus análogos sintéticos para a sincronização de cio têm sido uma técnica amplamente difundida em rebanhos bovinos (COSTA et al., 1997), sendo utilizada em diferentes doses e rotinas de aplicação. O efeito luteolítico de uma dose diminuída de cloprostenol (100 mg) administrada por via intra-vulvar em búfalas foi citada por Cruz (2000), tendo

igual eficácia de uma dose superior (500mg) administrada por via intramuscular.

2.4.2 PROGESTÁGENOS

Segundo Spinosa et al. (2002), para promover a sincronização de animais que se encontram em períodos distintos do ciclo, é necessário tratá-los com progesterona por um período equivalente à duração do ciclo estral, porém tratamentos de longa duração resultam em baixas taxas de gestação devido a alterações adversas no ambiente intra-uterino que inibem o transporte espermático, e para tratamentos de curta duração, se faz necessária a eliminação do corpo lúteo pré existente com utilização de um agente luteolítico.

A partir da década de 90, com base nos conhecimentos de dinâmica folicular, alteraram-se os princípios na concepção de protocolos com progestágenos devido a atresia do folículo dominante, impedindo a formação de folículos persistentes e possibilitando o desenvolvimento de uma nova onda folicular, resultando num folículo apto à fertilização (MADUREIRA, 2000).

Os tratamentos comumente usados para a reestabilização da ciclicidade ovariana nos bovinos, incluem a inserção de dispositivos de liberação de progesterona por 5 a 10 dias. Esses dispositivos mantêm as concentrações de progesterona por um período determinado (BARUSELLI et al., 2004b).

A retomada da atividade normal ovariana mediante curta exposição a progesterona foi revisada por Day (2004) e se dá em parte ao efeito desta no aumento da secreção de LH em vacas no período pós parto, onde foram encontradas maiores concentrações deste hormônio em torno de 72 horas após a remoção do implante nas vacas em anestro e durante a permanência do progestágeno em novilhas pré púberes. O aumento dos níveis de LH devido a pré-sensibilização do eixo hipotalâmico hipofisário pela progesterona, simula a condição normal de proestro, onde ocorre o pico pré ovulatório de LH.

Com a avaliação da concentração de progesterona plasmática, pode-se registrar a ocorrência de eventos como estro e prenhez, entre outros, além de se estimar aspectos como a duração do ciclo estral e reinício da atividade ovariana, cujo conhecimento se faz necessário para a aplicação de técnicas

como a inseminação artificial (RAMOS et al., 2001). Os mesmos autores mensuraram por 42 dias, a cada 48 horas, as concentrações plasmáticas de progesterona de 7 búfalas pluríparas pela técnica de radioimunoensaio em fase sólida e verificaram valores de $0,242 \pm 0,121$ ng/mL para a fase de estro; $0,324 \pm 0,217$ ng/mL para metaestro; $1,211 \pm 0,621$ ng/mL, diestro e de $1,098 \pm 0,580$ ng/mL durante o proestro.

Hernandez et al. (2001) observaram que as concentrações de progesterona de 29 fêmeas em lactação mantiveram-se inferiores a 1ng/mL até 60 dias pós-parto. Para esta observação, dosaram as concentrações de progesterona presentes no leite a partir dos 20 dias pós-parto, em amostras colhidas duas vezes por semana. Porém, as pluríparas (3 crias) apresentaram uma ligeira atividade luteal (0,24ng/mL) por volta do dia 37 pós-parto.

No entanto, Presicce et al. (2005), acompanharam com amostragens diárias os perfis de progesterona, a partir do dia da parição (período pós-parto). Relataram que os valores desse hormônio mantiveram-se a níveis basais de $0,19 \pm 0,0$ ng/mL para primíparas e $0,17 \pm 0,0$ ng/mL para pluríparas ($p=0,6$), até a ocorrência de ovulação.

2.4.3 ESTRADIOL

O estradiol é um estrógeno primário, biologicamente ativo, que age sobre o sistema nervoso central (SNC) induzindo o cio comportamental na fêmea, agindo também no útero para aumentar a amplitude e a frequência de contração, potencializando os efeitos da ocitocina e da $\text{PGF}_{2\alpha}$, induzindo assim a luteólise (HAFEZ et al., 1995).

Os sinais de estro são induzidos pela elevada concentração de estradiol na circulação, proveniente do folículo pré ovulatório sendo a ação do estradiol potencializada pela pré-exposição à progesterona (GONSALVES et al., 2002), ocorrendo desta forma durante o cio espontâneo, no qual a luteólise é seguida pelo desenvolvimento e maturação do folículo dominante, que secreta altas concentrações de estradiol, desencadeando a liberação do GnRH e LH pré-ovulatórios estimulando a ovulação (ABDULLAH et al., 2001).

As formas mais citadas na literatura são o estradiol-17 β , valerato de estradiol e benzoato de estradiol, são comumente usadas para sincronizar a emergência das ondas foliculares e a ovulação em bovinos em tratamento associando-os a implantes hormonais como o CIDR[®] (*Controlled Internal Drug Release*) (RYAN et al., 1999; COLAZO et al., 2003).

Martinez et al.(2001), demonstraram em estudos na espécie bovina, que os tratamentos com estradiol (e progesterona), causaram atresia dos folículos antrais existentes e a emergência de uma nova onda folicular aproximadamente 4 a 5 dias após o tratamento e que podem ser usadas para a sincronização tanto da emergência de ondas foliculares quanto da ovulação.

Já na espécie bubalina, Bartolomeu (2003) averiguou que a emergência de nova onda de crescimento folicular ocorreu tardiamente para o grupo animal tratado com valerato de estradiol (5mg) se comparado ao grupo tratado com benzoato de estradiol (1mg) ($8,7 \pm 0,27$ [3/15] vs $3,0 \pm 0,0$ dias [7/7]), não variando a fonte de progesterona (CRESTAR[®]).

2.5 SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO COM HORMÔNIO LIBERADOR DE GONADOTROFINAS (GnRH), HORMÔNIO LUTEINIZANTE (LH) ASSOCIADO À PROSTAGLANDINA PARA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO

O protocolo Ovsynch consiste de uma aplicação intramuscular de GnRH independente do dia do ciclo estral em que as fêmeas se encontram, provocando a ovulação do folículo dominante presente e iniciando ou coincidindo com o início de uma nova onda de crescimento folicular, sincronizando o desenvolvimento do próximo folículo dominante. Uma administração intramuscular de PGF_{2 α} é realizada sete dias após o GnRH, levando a regressão do corpo lúteo. Aplica-se a segunda dose de GnRH 24 a 48 horas após a PGF_{2 α} . Como os folículos pré-ovulatórios estão sincronizados em termos de desenvolvimento, a ovulação é sincronizada em um período de 8 horas em bovinos, 24 a 32 horas após esta segunda aplicação de GnRH (BARROS, 2000; VASCONCELOS, 2000).

Baruselli et al. (1999) estudaram a resposta ovariana de búfalas sincronizadas com protocolo Ovsynch (n=33). Os animais receberam 10 μ g (Grupo 1, G1; n=16) e 20 μ g (Grupo 2, G2; n=17) de GnRH (D0) no período pós-parto. Sete dias depois (D7) os animais receberam 15mg de prostaglandina. Dois dias depois (D9) os animais tiveram nova administração de GnRH (10 μ g, G1 e 2), e foram inseminados 16 horas depois. Observaram taxa de ovulação após a primeira administração de GnRH de (50% vs 75%, G1 vs G2). Verificou-se que os animais que ovularam apresentavam folículos de maior diâmetro do que aqueles que não ovularam (0,95 $\pm$ 0,17 vs 0,67 $\pm$ 0,24 mm, $p < 0,01$). O intervalo entre a primeira e segunda aplicação de GnRH e ovulação foi 33,0 $\pm$ 8,3h (n=20) e 32,0 $\pm$ 5,7h (n=26), respectivamente. Houve sincronização da ovulação em 75,8% (25/33) dos animais dos protocolos (G1, 68,7% [11/16]; G2, 82,3% [14/17])($p > 0,05$). A porcentagem de ovulações sincronizadas foi de 25% (4/16) para o G1 e 11,7%(2/17) para o G2.

Baruselli (2000) averiguaram que este tipo de protocolo sincroniza a ovulação, eliminando a necessidade de observação de cio, facilitando o manejo do rebanho e otimizando o emprego da IA a campo, possibilitando agrupar as inseminações em dias programados.

De acordo com o trabalho desenvolvido por Berber et al. (2002), na espécie bubalina, conseguiram bons resultados com o programa Ovsynch, com taxas de ovulação após a primeira e a segunda administração de GnRH de 86,6% e 93,3%, respectivamente, obtiveram índices de prenhez de 56,1% para fêmeas lactantes e 56,9% para não lactantes. Também afirmaram que a indução da luteólise com a PGF_{2 α} no D7 do tratamento proporcionou aumento nas concentrações plasmáticas de estradiol, entretanto, após o aparecimento dos pulsos endógenos de LH, houve um decréscimo na expressão do RNAm para a aromatase P450 nas células da granulosa, e que na sincronização da ovulação com GnRH, houve a liberação de LH, o qual provavelmente inibiu a liberação de estradiol pelo folículo pré-ovulatório.

Recentemente o protocolo Ovsynch foi utilizado por De Rensis et al. (2005) em 83 búfalas pluríparas (12 μ g GnRH, D0 e D9; 15mg PGF_{2 α} , D7) com inseminação artificial de 16 a 20 horas após a segunda administração de

GnRH, atingindo taxas de concepção de 35,7% (22/62) para animais com ciclicidade e 4,7% (1/21) para animais em anestro ($p < 0,05$). No estudo proposto animais que apresentaram folículo grande no dia da primeira administração de GnRH resultaram em taxas maiores de concepção, demonstrando que este tipo de protocolo foi afetado por algumas variáveis tais como idade, intervalo pós-parto e estágio de desenvolvimento folicular.

2.6 ASSOCIAÇÃO DE PROGESTERONA OU PROGESTÁGENOS COM ESTRÓGENOS NA SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO PARA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO

Bartolomeu et al. (1999), testaram dois protocolos hormonais com o uso de implantes, relataram que no Grupo 1 ($n=15$) foi utilizado CIDR-B® (*Controlled Internal Drug Release*) que é um implante intra-vaginal contendo 1,9g de progesterona por 9 dias, com administração de 1mg de benzoato de estradiol no momento da inserção do implante e prostaglandina (15mg de luprostiol) no momento da retirada do implante. Para o grupo 2 ($n=15$) foi dado CRESTAR® por 9 dias, com aplicação de 5 mg de valerato de estradiol e 3 mg de norgestomet via IM no momento da inserção do implante. Os autores observaram para os Grupos 1 e 2, respectivamente, taxas de ovulação de 66,6% e 6,7%, não observando eficiência luteínica do valerato de estradiol para bubalinos.

Implantes auriculares de liberação lenta de progestágenos foram estudados por Hattab et al. (2000). Avaliaram a utilização do CRESTAR®, consistindo de uma injeção intra-muscular de valerato de estradiol (5mg) e um implante auricular de silicone com norgestomet (3mg), tendo este permanecido por 9 ou 10 dias nos animais, concluíram que a utilização deste protocolo não foi eficiente na sincronização do estro na espécie bubalina visto que apenas um de cada seis animais respondeu com cio 2 dias após a retirada do implante, além do tratamento ter se demonstrado ineficaz nos 3 animais em anestro. Os autores discutiram ainda que a demora no aparecimento do cio após a retirada do implante pode ser atribuído a um efeito inibitório do norgestomet no

crescimento e desenvolvimento folicular pela supressão das secreções de LH ou FSH.

BARTOLOMEU (2003) em estação favorável à reprodução dos bubalinos, avaliaram o emprego de dois dispositivos de liberação de progesterona; CIDR[®] (9 dias; D0, 1mg de BE; D9, 15mg de PGF_{2α}; n=15) e CRESTAR[®] (9dias; D0, 3mg de norgestomet e 5mg de valerato de estradiol, n=15). O intervalo obtido entre o início do tratamento hormonal e a emergência da onda de crescimento folicular foi de $5,5 \pm 0,24$ vs $8,7 \pm 0,27$ dias para os grupos CIDR[®] (n=14/15) e CRESTAR[®] (n=3/15) ($p < 0,0001$). O diâmetro do maior folículo no dia da retirada da fonte de progesterona foi de $1,06 \pm 0,07$ (14/15) para o grupo CIDR[®] e $0,56 \pm 0,06$ (2/15) para o grupo CRESTAR. O intervalo entre o final do tratamento e ovulação foi de $70,2 \pm 7,4$ (8/15) vs $64,0 \pm 0,0$ (3/5) horas para os grupos CIDR[®] e CRESTAR[®], respectivamente, com taxas de ovulação de 53,3% para o primeiro e 6,7% para o segundo.

A emergência de nova onda de crescimento folicular com o uso de estradiol associado à progesterona na espécie bubalina foi avaliada por Moura (2003), que administrou diferentes doses de benzoato de estradiol no momento da inserção do implante de progesterona (CIDR[®]) em 24 animais (Grupo 1, n=8 – 1,0mg; Grupo 2 n=8 – 2,5mg e Grupo 3, n=8 – 5mg). Em seu experimento encontrou, na estação reprodutiva favorável à reprodução, intervalos entre a inserção do implante do dispositivo intravaginal e a emergência da nova onda de $5,8 \pm 0,8$; $6,1 \pm 0,7$ e $6,8 \pm 0,7$ dias para os grupos 1, 2 e 3 respectivamente ($p < 0,05$); o intervalo entre a retirada do implante e a ovulação foi de $79,3 \pm 16,5$ h para o G1, $68,7 \pm 24,6$ h para o G2 e de $66,7 \pm 16,5$ para o G3 ($p > 0,05$), com respectivas taxas de ovulação de 37,5%(3/8), 37,5%(3/8), 37,5%(3/8); para G1, 2 e 3. A mesma metodologia foi repetida na estação reprodutiva desfavorável, com um menor número de animais por grupo (Grupo 1=2=3, n=5). A emergência da nova onda ocorreu nos dias $4,9 \pm 0,8$ (G1); $3,7 \pm 0,6$ (G2) e $3,6 \pm 0,6$ (G3) ($p > 0,05$) após a inserção do implante, os intervalos entre a retirada do implante e a ovulação foram de $0,0 \pm 0,0$ h para G1, $72,00 \pm 0,0$ para G2 e $40,0 \pm 0,0$ h para G3, com taxas de ovulação de 0,0% (0/5), 20% (1/5), 20%(1/5) respectivamente para G1, 2 e 3.

Os protocolos Ovsynch e PRID[®] (*Progesterone Releasing Intravaginal Device*) foram comparados por Neglia et al. (2003). O Grupo A (n=111) foi tratado com Ovsynch (100µg de GnRH/ PGF_{2α}/ 100µg de GnRH) e Grupo B (n=117) recebeu um implante intravaginal contendo 1,55g de progesterona e uma cápsula de 10mg de benzoato de estradiol por 10 dias sendo que ao final deste período os implantes foram removidos e os animais receberam um agente luteolítico e eCG (1000UI). Os grupos foram comparados quanto aos índices de prenhez e concluíram que eles, no geral tenderam a ser superiores em búfalas sincronizadas com Ovsynch (36,0%) se comparados ao grupo que recebeu progesterona (PRID[®]; 28,2%) porém, relataram que essa diferença não foi significativa devido ao experimento ter sido efetuado em um período que corresponde à transição para o anestro sazonal dos bubalinos no sul da Itália. Assim os autores sugeriram que ambos os protocolos proporcionaram uma sincronia adequada do estágio do ciclo estral haja visto a presença de folículos $\geq 1\text{cm}$ no ovário ao final dos tratamentos, porém tratamento com PRID[®] induziu a ovulação num maior número de animais em anestro se comparado ao protocolo Ovsynch.

Dispositivos de progesterona foram associados ao protocolo Ovsynch na espécie bubalina por De Rensis et al. (2005). Oitenta e seis animais receberam em momento aleatório do ciclo estral 12µg de GnRH (D0) mais a inserção de um dispositivo de liberação lenta de progesterona (PRID[®]). Após sete dias (D7) foi administrada uma dose luteínica de PGF_{2α} (D7) e no nono dia (D9), ocorreu a segunda dose de GnRH (12µg) concomitante com a remoção do dispositivo. Todos os animais foram inseminados entre 16 e 20 horas a partir da última aplicação hormonal. Os autores observaram taxas de concepção de 30,0% (6/20) para animais em anestro e 51,5% (34/66) para animais ciclando. Discutiram que a suplementação do protocolo Ovsynch com progesterona causou efeito benéfico no aumento da taxa de concepção, devido à importância do contato prévio do folículo com este hormônio para que possa ser responsivo ao protocolo.

2.7 GONADOTROFINAS PLACENTÁRIAS (hCG/eCG)

Na espécie humana, ocorre a produção de hCG a partir do oitavo dia da gestação, sendo este hormônio constituído de duas sub unidades (α e β) de natureza glicoprotêicas, com meia vida de 12 a 24h apresentando bioatividade semelhante ao LH, com alta especificidade e afinidade a receptores específicos presentes nas células da camada da granulosa, teca e corpo lúteo, produzindo assim condições favoráveis à ovulação e/ou luteinização dos folículos (SPINOZA et al., 2002).

A Gonadotrofina Coriônica Eqüina (*Equine Chorionic Gonadotropin*) é um hormônio glicoprotêico produzido pelos cálices endometriais da égua prenhe e é encontrada na circulação sanguínea até o 130º dia da gestação. Consiste de duas sub-unidades (α com 96 aminoácidos e β com 149 aminoácidos sendo esta idêntica ao LH eqüino) e sua glicolisação confere uma maior meia vida (até 3 dias) se comparado a outros hormônios glicoprotêicos, com uma bioatividade de FSH e LH em outras espécies que não o eqüino (MURPHY E MARTINUK, 1991).

Takahashi et al. (2002) observaram em seus ensaios que as fêmeas que receberam eCG mostraram aumento significativo nas concentrações plasmáticas de estrógeno devido ao estímulo que esse hormônio realiza tanto no sistema de síntese de andrógenos nas células da teca como na aromatização nas células da granulosa. Os autores discutem que essas diferenças padrões de esteroidogênese podem ser dependentes da diferença da atividade biológica semelhante ao LH em cada preparação hormonal do eCG. Não foram observadas alterações na esteroidogênese quando da administração de hCG.

O eCG cria condições de crescimento folicular e de ovulação o seu uso têm se mostrado compensador em rebanhos bovinos com baixa ciclicidade em animais recém paridos (período pós parto inferior a 2 meses) e em animais com baixas condições de escore corporal (BARUSELLI et al., 2004a).

BARUSELLI et al., (2004b); revisaram em bovinos de corte, que conforme a severidade do anestro, aumenta-se o efeito positivo da droga, tendo-se um aumento significativo na produção de progesterona total pelo

corpo lúteo, porém sem aumento de tamanho deste. Embora o mesmo autor com outro grupo (BARUSELLI et al., 2000), em experimentação com novilhas mestiças (*Bos taurus* x *Bos indicus*) que receberam 800UI de eCG cinco dias após a inserção de implante de progesterona (CIDR), ou seja no momento esperado de emergência da onda, apresentaram área de corpo lúteo ($2,86 \pm 0,63$ vs $2,15 \pm 0,46 \text{ cm}^2$ [$p < 0,05$]) maior que as do grupo controle.

2.7.1 ASSOCIAÇÃO DE PROGESTERONA OU PROGESTÁGENOS E GONADOTROFINAS PLACENTÁRIAS (hCG/eCG) NA SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO PARA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO

O efeito de diferentes momentos da inseminação artificial sobre a taxa de concepção foi estudado por Barile et al. (2001b) em búfalas italianas (n= 56) sincronizadas com PRID[®], conforme protocolo anterior (PRID[®], 10dias; 1000UI eCG + PGF_{2α}, D7) e submetidas a duas inseminações (n=30; 72 e 96h) ou três (n=26; 48, 72 e 96h). Encontraram taxas de concepção menores nos animais inseminados três vezes se cotejados aos com duas inseminações (38,5% vs 56,7%, $p > 0,05$). Dentre os 56 animais, 89,3% apresentaram folículo ovulatório até 96 horas a partir da remoção da fonte de progesterona (42,3% dos animais até 48 h; 53,6% até 72h e 35,7% até 96 horas). Discutiram ainda que em estudo anterior os autores obtiveram intervalo entre a remoção do dispositivo e ovulação de aproximadamente 86 horas.

O mesmo autor com outro grupo de estudo (BARILE et al., 2001a), trabalharam com 40 novilhas bubalinas em dois grupos; Grupo A (n=20, idade ≤ 20 meses [16-20]) e Grupo B (n=20, idade ≥ 20 meses [21-26]), sendo os dois grupos tratados igualmente com PRID[®] (1,55g de progesterona) e 10mg de benzoato de estradiol, incluído no mesmo implante, estes permanecidos por 10 dias, com a administração de 1.000UI de eCG no sétimo dia e inseminação artificial 48 a 72 horas após a retirada do implante e presença de sintomatologia de estro. Como resultado obtiveram taxa de concepção de 37,5% (15 concepções / 40 inseminações) sendo não significativas as diferenças etárias entre os grupos. Discutiram que o tratamento com PRID[®] e

eCG foi eficaz tanto na indução do estro como na sincronização do ciclo, sendo hábil para induzir ciclos férteis em novilhas em anestro.

Campo e Jairo (2001) observaram taxa de resposta à sincronização do estro com progestágenos (CRESTAR[®], 10 dias; D9: 500UI eCG, n=20) de 85%, considerada alta. O intervalo de tempo entre o fim do tratamento e a apresentação do estro foi de 33 horas. Dos animais que apresentaram cio, 26,6% foi entre 25 a 36 horas, 33,3% de 37 a 48 horas, 33,3% de 49 a 60 horas e 6,6% de 61 a 72 horas após o final do tratamento.

Na estação reprodutiva desfavorável à reprodução da espécie bubalina, Pacelli et al. (2001), avaliaram os efeitos da redução de dose de eCG em novilhas não cíclicas com idade média de $19,8 \pm 1,3$ meses. Dividiram 30 animais em dois grupos (Grupo 1, n=15; Grupo 2, n=15). O tratamento hormonal constituiu-se da inserção de implante de progesterona (PRID[®]) por 10 dias, com a administração de eCG no sétimo (Grupo 1, 1000UI; Grupo 2, 750 UI). Os dois grupos foram inseminados por duas vezes, com 48 e 72 horas após a remoção do implante. Com esses tratamentos obtiveram 66,6% de indução do estro para o Grupo 1, e 73,3% para o Grupo 2, com taxas de concepção de 40,0 e 33,3% respectivamente. Discutiram os autores que doses menores de eCG são melhores para a indução do estro e conseqüente concepção em novilhas acíclicas, se comparadas a doses elevadas.

No estado do Pará (Brasil), Martins et al. (2002) correlacionaram as diferenças no período de resposta ao estro a partir da remoção do implante de progesterona com a fase do ciclo estral das fêmeas. Para tal, os autores aplicaram em 14 búfalas um implante auricular (CRESTAR[®]) com norgestomet (3mg) e 5mg de valerato de estradiol (IM) no dia zero (D0), no dia 9 (D9), junto da remoção do implante, os animais receberam 700UI de eCG (IM) com inseminação artificial 12 horas após a detecção do estro. Independentemente da fase do ciclo estral (proestro, diestro ou anestro) 97,68% dos animais apresentaram estro 48 horas após a remoção do implante, com exceção de um animal em proestro que apresentou cio dentro de 24 horas.

Marques et al. (2003) estudaram os efeitos da administração de 400UI de eCG no dia da remoção do dispositivo intra-vaginal de liberação de

progesterona. Vacas zebuínas no período pós-parto (n=50) foram divididas em dois Grupos (Grupo1: com eCG, n=25; Grupo 2: sem eCG, n=25). Granjearam taxas de ovulação e intervalo entre a retirada do implante e ovulação de 76,0% (19/25) e 74,2±4,0 horas para o Grupo 1 e 60,0% (15/25) e 78,0±3,1 horas (p>0,05).

Barile et al. (2004) com a espécie bubalina, no início da estação reprodutiva desfavorável, em protocolo com fonte exógena de progesterona (PRID[®] com 10mg de benzoato de estradiol) mantida por 10 dias, utilizaram 1000UI de eCG como indutor de ovulação, associado à dose luteínica de PGF_{2α} (0,15mg de cloprostenol) no sétimo dia, e inseminação artificial 72 e 96 horas após a remoção do dispositivo, obtiveram taxa de concepção de 51,11% para animais ciclando e 38,46% para fêmeas em anestro.

O hCG foi administrado em búfalas no quinto dia após a inseminação artificial na dose de 1500UI por Neglia et al., (2004); que almejavam a diminuição da taxa de mortalidade embrionária. Observaram maiores concentrações plasmáticas de progesterona após 5 dias da administração desta gonadotrofina, se comparado a outros hormônios tais como GnRH (12μg) e progesterona (PRID[®] – 1,55g). Este fato foi legado à atuação do hCG no corpo lúteo existente e na formação de corpo lúteo acessório resultado da ovulação do folículo dominante presente no momento da administração dessa gonadotrofina.

Porto Filho (2004), testou a redução na dose de hCG para 1000UI. O trabalho foi conduzido nas condições brasileiras em estação reprodutiva desfavorável, com experimentação em dois grupos (Grupo 1=G1, n=21; DIB[®] - 9dias, D0 - 2mg de BE, D9 - 500UI eCG + PGF_{2α}, D11 - 1500 UI hCG) *versus* (Grupo 2=G2, n=21; DIB[®] - 9dias, D0 - 2mg de BE, D9 - 500UI eCG + PGF_{2α}, D11 - 1000 UI hCG). Os diâmetros máximos do folículo dominante (D9) e ovulatório formam respectivamente, 85,±2,2 e 12,6±2,3mm para G1; 8,4±2,2 e 12,5±2,7mm para G2 (p>0,05). Os intervalos entre a retirada do dispositivo intravaginal e entre a administração de hCG e ovulação foram de 67,7±18,1 e 26,6±9,3 horas para o G1 (p>0,05); 72,8±16,7 e 27±14,8 horas para o G2

($p>0,05$). Ambos os grupos apresentaram a mesma taxa de ovulação (66,7 [14/21]).

Na mesma publicação, mas com metodologia diferenciada, Porto Filho (2004) comparou o efeito da administração da gonadotrofina eqüina (eCG, 500UI) no nono dia do tratamento em fêmeas em anestro estacional (G1, $n=9$; DIB[®] - 9dias, D0 - 2mg de BE, D9 - 500UI eCG + PGF2 α , D11 - 1500 UI hCG) *versus* (G2, $n=10$; DIB[®] - 9dias, D0 - 2mg de BE, D9 - PGF2 α , D11 - 1500 UI hCG). Obteve como diâmetro do folículo dominante no D9; $7,8\pm2,9$ mm para o G1 e $8,5\pm2,2$ mm para o G2. Os intervalos entre a retirada do dispositivo intravaginal e a ovulação, e as taxas de ovulação, respectivamente, para os dois grupos foram: $78,0\pm12,0$ horas, 44,4% (4/9); $68\pm9,0$ horas, 70% (7/10) [$p>0,05$]. O autor observou ainda que, a adição do eCG ao protocolo, promoveu aumento numérico no diâmetro máximos do folículo dominante ($13,4\pm1,7$ mm; G2 vs $12,6\pm3,0$ mm, G1; $p>0,05$).

Sá Filho et al. (2004) analisaram a dinâmica folicular de vacas *Bos indicus* em anestro, sincronizadas com progestágenos e eCG. Os animais foram tratados com CRESTAR[®] e 5mg de valerato de estradiol associado a 3mg de norgestomet (IM) no dia 0, permanecendo com o implante durante 9 dias, com administração de 400UI de eCG no grupo experimental, no momento da retirada do implante, obtiveram como resultados aumento no diâmetro máximo do folículo dominante ($1,22\pm0,06$ vs $1,04\pm0,07$ mm) se comparado ao grupo controle (sem eCG); além de aumentar as taxas de ovulação (71,3% [19/26] *versus* 50,0% [12/24]) e de concepção (46,2% [12/26] *versus* 20,8%[5/24]).

3.0 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAL DO EXPERIMENTO

Os diferentes protocolos hormonais referentes a avaliação das taxas de ovulação de búfalas submetidas à sincronização da ovulação em tempo fixo foram realizados no Vale do Ribeira, Fazenda Barra do Capinzal (Rodovia Régis Bittencourt, km 456 – Sul), Município de Registro, Estado de São Paulo, região Sudeste do Brasil, no período de fevereiro de 2005 a março de 2005. A propriedade possui solos tanto do tipo arenoso, quanto argiloso tendo como principal atividade a pecuária leiteira à pasto; os pastos são constituídos de capins do gênero *Brachiaria sp*, com grandes áreas de várzea. No manejo da propriedade esta não acrescenta mineralização aos animais.

3.2 ANIMAIS

Foram utilizadas 24 búfalas mestiças Mediterrâneo-Murrah com idade entre 3 e 8 anos, intervalo médio de 45 dias de período pós parto e escore de condição corporal (ECC) médio de $3,5 \pm 0,5$ (1 a 5, 1=magra e 5=muito gorda). Os animais eram ordenhados todos os dias pela manhã a partir das 04:00 horas e após as avaliações ultra-sonográficas eram liberados para o pastejo juntamente com sua prole. Todos os animais foram previamente submetidos a exame clínico reprodutivo e não apresentaram quaisquer alterações que por ventura pudessem interferir nos dados da pesquisa.

3.3 DELINAMENTO EXPERIMENTAL

3.4 DIVISÃO EM GRUPOS

As 24 fêmeas foram distribuídas ao acaso em três grupos experimentais com 8 animais cada, sendo Grupo 1 (G1), Grupo 2 (G2) e Grupo 3 (G3).

3.5 TRATAMENTOS HORMONAIS

As aplicações hormonais foram realizadas com seringa plástica (BD®) de 3mL e agulha 40x12, via intramuscular profunda, assim como o implante intra-auricular foi introduzido no tecido subcutâneo por meio de aplicador apropriado (Aparelho aplicador de Crestar®, Intervet), após a anti-sepsia local da pele com solução aquosa de permanganato de potássio na diluição de 400mg/litro.

3.6 GRUPO 1 (G1)

Em momento aleatório de ciclo estral, os animais receberam um implante intra-auricular de liberação de progesterona (3mg de norgestomet, CRESTAR®, Intervet) mais 2.0mg de benzoato de estradiol, intra-muscular (IM) (Benzoato de Estradiol®, Index), este dia considerado como dia zero (D0, 13:00h). Os implantes permaneceram por 9 dias (D9, 13:00h) e no momento da remoção foi administrado dose luteolítica de um análogo da $\text{PGF}_{2\alpha}$ (0,15mg d-cloprostenol, Croniben®, Biogenesis) associada a 500 UI de eCG, IM, (Novormon®, Syntex). Dois dias após (D11, 06:00h), as búfalas receberam 1000UI de hCG, IM (Vetecor®, Calier), 42 horas após a remoção do implante. O esquema da administração hormonal está representado na Figura 1.

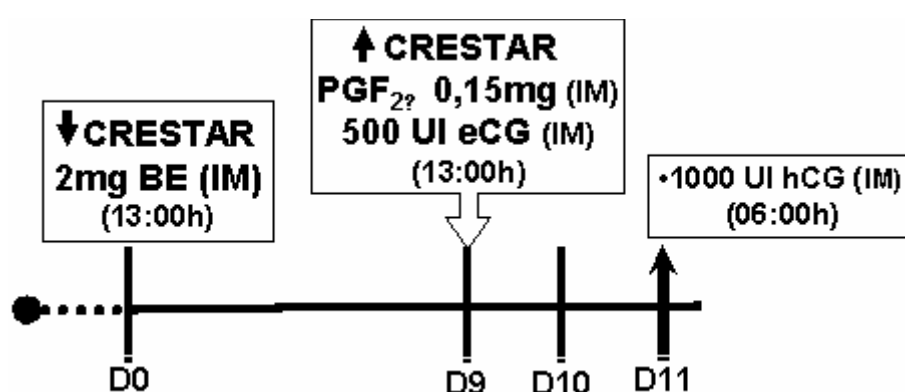


FIGURA 1: Tratamento hormonal administrado ao Grupo 1 (n=8), com a aplicação de eCG (500UI) no dia 9 e hCG (1000UI) no dia 11 do protocolo para sincronização da ovulação.

3.7 GRUPO 2 (G2)

Em momento aleatório do ciclo estral, os animais receberam um implante intra-auricular de liberação de progesterona (3mg de norgestomet, CRESTAR[®], Intervet) mais 2,0mg de benzoato de estradiol, IM, (Benzoato de Estradiol[®], Index), este dia considerado como dia zero (D0, 13:00h). Os implantes permaneceram por 9 dias (D9, 13:00h) e no momento da remoção foi administrada dose luteolítica de um análogo da PGF_{2α} (0,15mg d-cloprostenol, Croniben[®], Biogenesis). Dois dias após (D11, 06:00h), as búfalas receberam 1000UI de hCG, IM (Vetecor[®], Calier), 42 horas após a remoção do implante. O esquema da administração hormonal está representado na Figura 2.

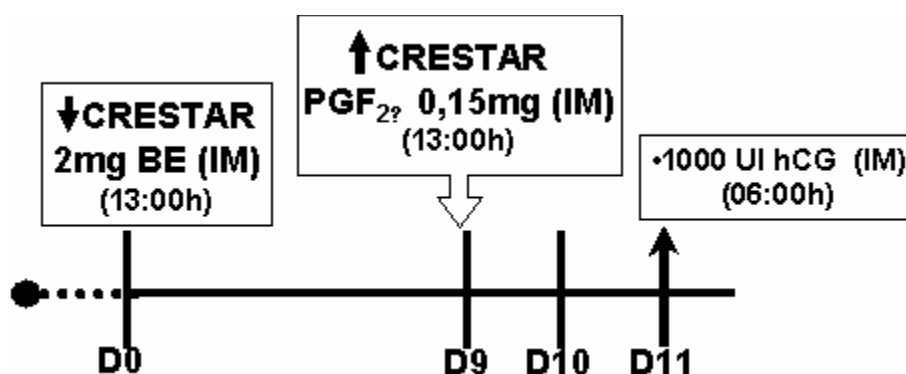


FIGURA 2: Tratamento hormonal administrado ao Grupo 2 (n=8), somente com a aplicação de hCG (1000UI) no dia 11 do protocolo para sincronização da ovulação.

3.8 GRUPO 3 (G3)

Independentemente da fase do ciclo estral, os animais receberam um implante intra-auricular de liberação de progesterona (3mg de norgestomet, CRESTAR[®], Intervet) mais 2,0mg de benzoato de estradiol, IM (Benzoato de Estradiol[®], Index), este dia considerado como dia zero (D0, 13:00h). Os implantes permaneceram por 9 dias (D9, 13:00h) e no momento da remoção foi administrada dose luteolítica de um análogo da PGF_{2α} (0,15mg d-cloprostenol, Croniben[®], Biogenesis) associada a 500 UI de eCG, IM (Novormon[®], Syntex).

O esquema da administração hormonal e do acompanhamento ultra-sonográfico (US) está representado na Figura 3.

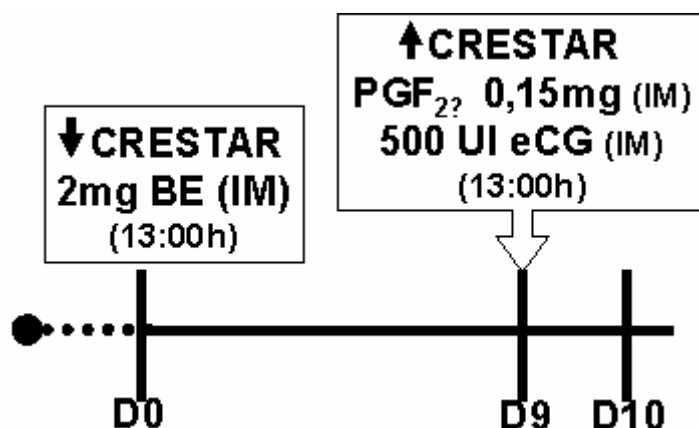


FIGURA 3 – Tratamento hormonal administrado ao Grupo 3 (n=8), somente com a aplicação de eCG (500UI) no dia 9 do protocolo.

3.9 EXAMES ULTRA-SONOGRÁFICOS

A avaliação da dinâmica folicular após a remoção do implante e a determinação do momento ovulatório foram realizadas através da análise ultra-sonográfica pela técnica transretal com o auxílio de sonda linear de 5MHz (Alloka® 500). Foram realizados exames nos dias 0, 9 e 10 do protocolo, uma vez ao dia às 13:00h; já nos dias 11, 12, 13 e 14; o exame foi realizado duas vezes ao dia, ou seja, a cada 12 horas às 06:00 e 18:00 horas (Figura 4). Considerou-se como indicativo de ovulação o desaparecimento de folículos $\geq 10,0\text{mm}$, sendo o horário da ovulação determinado como média entre o penúltimo e último exame, no qual foi diagnosticada a ovulação.

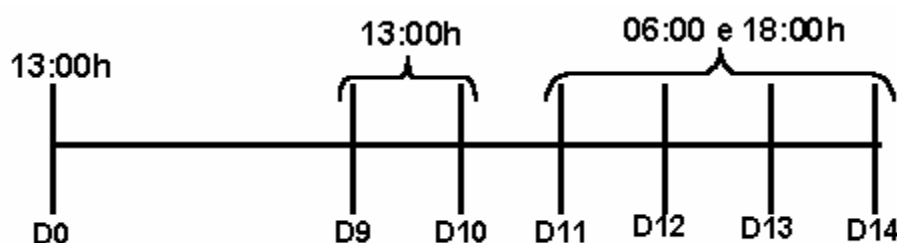


FIGURA 4: Representação esquemática da avaliação ultra-sonográfica durante os diferentes protocolos de sincronização da ovulação.

3.10 COLHEITA DE SANGUE E ANÁLISE HORMONAL

Para a determinação das concentrações de progesterona e cortisol plasmáticas, foi colhido sangue de todos os animais dos 3 grupos nos dias zero (D0), nove (D9) e 11 (D11), ou seja, nos dias de administração dos protocolos hormonais para não interferir no manejo, evitando estresse aos animais.

O sangue foi colhido por punção da veia jugular com sistema a vácuo (Sistema Vaccontainer[®]) e depositado em tubos heparinizados, mantidos em temperatura ambiente por 1 hora para sedimentação e então submetidos a centrifugação por 5 minutos a 3.500g. O plasma foi armazenado a 20°C negativos em tubos plásticos de 2 mililitros (Ependorff[®] 2,0mL) previamente identificados.

Foram utilizados *kits* para detecção das concentrações plasmáticas de progesterona pelo método de radioimunoensaio em fase sólida (Coat-a-Count[®]-Progesterone Diagnosis Products Co., MedLab), contados por um minuto no contador Gama Count Cobra II e para o cortisol foi utilizada a mesma técnica, com *kit* comercial (Coat-a-Count[®]-Cortisol Diagnosis Products Co., MedLab), no Laboratório de Análises Hormonais do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu – SP. A sensibilidade dos testes para progesterona e cortisol foi, respectivamente, de 0.01 ng/mL e 0,01µg/mL, e os coeficientes de variação intra e interensaio foram, respectivamente, de 6,4 e 1,3% para a progesterona e de 2,7 e 1,6% para o cortisol.

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram dispostos em planilha eletrônica e dispostos aos seguintes tratamentos: média aritmética, desvio padrão e porcentagem. Para confrontar duas porcentagens foi utilizado o teste do Qui-Quadrado. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), através do programa computacional *Statistical Analysis System* (SAS, Intitute Inc., 2002). Para as

diferenças que implicavam em proporções entre as médias, adotou-se o teste de Tukey com 5% de probabilidade ($p=0,05$), considerando-se como significância $P<0,05$. Para a averiguação de possíveis correlações estatísticas entre eventos como por exemplo ovulação e concentração de cortisol, utilizou-se o teste de correlação pelo Produto de Person.

4.0 RESULTADOS

As taxas de ovulação para os três diferentes grupos de búfalas até o dia 13 foram de 62,5% (5/8) para o Grupo 1 (G1, eCG + hCG), 50% (4/8) para o Grupo 2 (G2, hCG) e 75% (6/8) para o Grupo 3 (G3, eCG) (Figura 5).

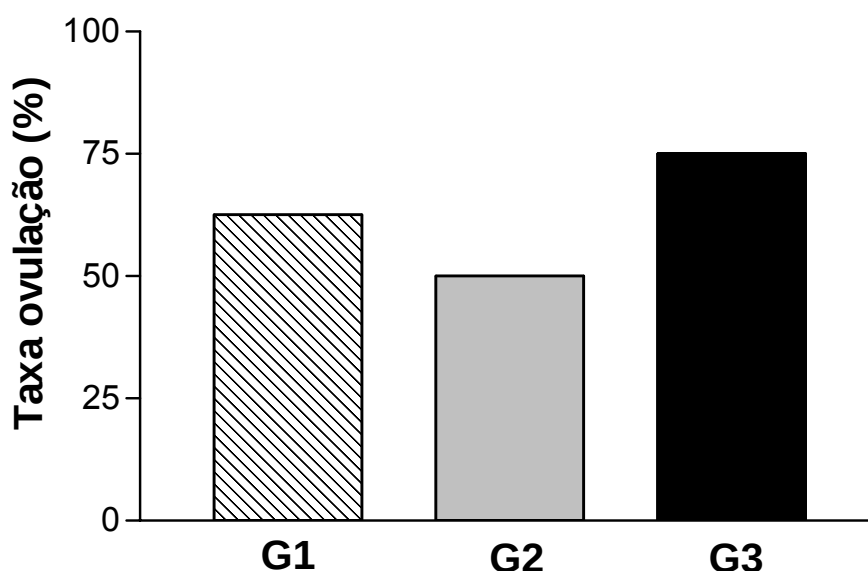


Figura 5: Taxa de ovulação (%) até 101 horas (D13, 18:00h) após a remoção do implante de progesterona em cada grupo experimental.

A sincronia da ovulação para os animais que ovularam entre os dias 11,5 (D11, 18:00h) e 13 (D13, 18:00h) foi de 50% (3/6) para o G1, 100% (4/4) para o G2 e 85,71% (6/7) para o G3 ($p>0,05$). Levando-se em conta a totalidade de animais por grupo ($n=8$), ocorreu diferença estatística na sincronia da ovulação neste determinado intervalo: G1, 37,5%(3/8); G2, 50% (4/8) e G3, 75% (6/8); $p<0,05$ (Tabela 1).

Nos três grupos a sincronia dos folículos responsivos ao hCG, ou seja folículos que no momento da administração desta gonadotrofina apresentavam-se com diâmetro $\geq 10\text{mm}$, foi de 37,5% (3/8, D11 - 06:00h) para o G1, 62,5% (5/8, D12 - 18:00h) para o G2 e de 100% (8/8, D11 - 18:00h) para o grupo 3. Esta sincronia foi estatisticamente maior no grupo 3 comparando-se ao 1 ($p<0,01$) (Tabela 2).

TABELA 1: Sincronia da ovulação: animais que apresentaram ovulação no intervalo compreendido entre D11(18:00h) a D13(18:00h) nos três grupos experimentais.

Sincronia da Ovulação		
Ovulação entre D11(18:00h) e D13 (18:00h)		
	Somente animais que ovularam	Totalidade de animais / Grupo
Grupo 1	50% (3/6)	37,5% ^A (3/8)
Grupo 2	100% (4/4)	50% ^B (4/8)
Grupo 3	85,71% (6/7)	75% ^C (6/8)
	p>0,05	p<0,05

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna (A,B) indicam diferença estatística (p<0,05)

TABELA 2: Animais (%) com folículos responsivos a indução da ovulação no momento da administração (D11, 18:00h) e momento ótimo para a administração de hCG.

Responsividade ao hCG (folículos de diâmetro $\geq 10\text{mm}$)		
	% animais	Momento ótimo para a administração de hCG
Grupo 1	37,5% ^A (3/8)	D11 - 06:00h
Grupo 2	62,5% ^{AB} (5/8)	D12 – 18:00h
Grupo 3	100% ^B (8/8)	D11 – 18:00h

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna (A,B) indicam diferença estatística (p<0,05)

Os diâmetros máximos em milímetros (mm) do folículo pré-ovulatório dos animais que ovularam, independentemente do dia da ovulação, nos diferentes protocolos do Grupo 1, Grupo 2 e Grupo 3, foi respectivamente, de $12,9 \pm 2,9$ (n=6); $14,2 \pm 1,8$ (n=4); $14,3 \pm 1,4$ (n=7) ($p=0,47$). No momento da remoção do implante (D9), o diâmetro dos folículos que se tornaram ovulatórios e posteriormente ovularam foi de $5,8 \pm 2,7$ mm (n=6); $8,9 \pm 1,6$ mm (n=4) e $9,2 \pm 1,4$ mm (n=7) para G1, G2 e G3 respectivamente ($p<0,019$); já para os folículos que não ovularam foram de $5,0 \pm 2,1$ mm (G1, n=2); $8,9 \pm 1,6$ mm (G2, n=4) e $0,9 \pm 0$ (G3, n=1) ($p=0,332$; Tabela 3, Figuras 6 e 7).

As taxas de crescimento folicular do folículo dominante, a partir da indução da ovulação com hCG (D11 – 06:00 horas), até a ovulação, com medidas aferidas pelo menos três vezes foram de $2,8 \pm 0,9$ mm para o G1; $2,2 \pm 1,4$ mm para o G2 e $1,8 \pm 0,3$ mm para o G3, com $p=0,221$.

TABELA 3: Médias ($\pm$ erro padrão) dos diâmetros foliculares de búfalas ($\varnothing$ F1) no dia da remoção do implante (D9) nos 3 diferentes grupos experimentais, expressos em milímetros.

	G1	G2	G3
$\varnothing$ F1 ovulatório no D9 ($p<0,019$)	$5,8 \pm 2,7$ ^{Ab} (n=6)	$8,9 \pm 1,6$ ^{Aab} (n=4)	$9,2 \pm 1,4$ ^{Aa} (n=9)
$\varnothing$ F1 não ovulatório no D9 ($p=0,332$)	$5,0 \pm 2,1$ ^{Aa} (n=2)	$6,9 \pm 1,9$ ^{Aa} (n=4)	$9,0 \pm 0$ ^{Aa} (n=1)

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna (A,B) indicam diferença estatística ($p<0,05$)

Letras minúsculas diferentes na mesma linha (a, b) indicam diferença estatística ($p<0,05$)

O dia da detecção da ovulação, a partir do início do protocolo (D0) foi de $12,08 \pm 1,36$ (n=6); $12,5 \pm 0,71$ (n=4); $12,86 \pm 0,63$ (n=7) para os Grupos 1, 2 e 3; não revelando no entanto diferenças estatísticas significativas ($p=0,377$). Também não foram encontradas diferenças significativas no intervalo entre a administração de hCG e a ovulação para os grupos 1 ($26 \pm 13,86$ horas, n=3) e 2 ($30 \pm 16,97$ horas, n=4) ($p=0,754$).

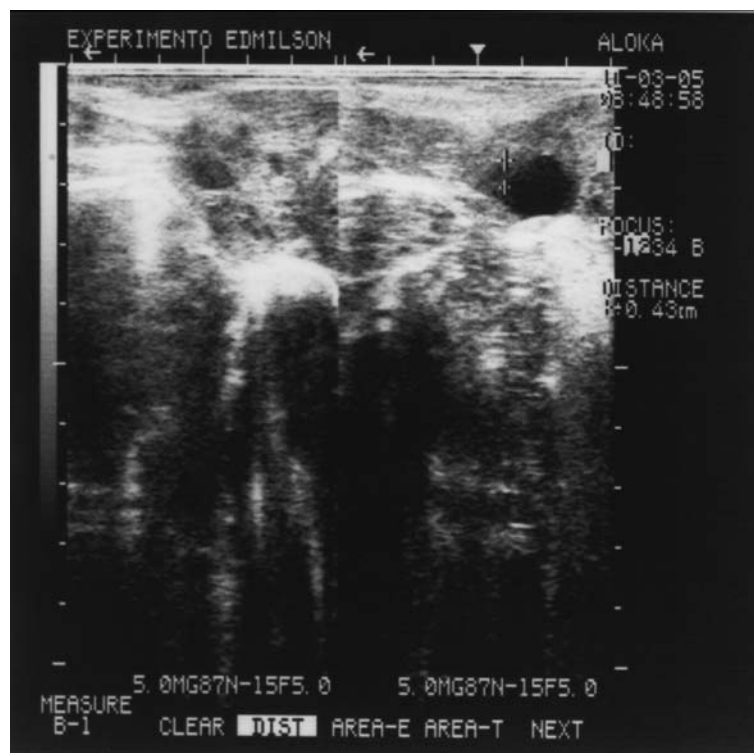


FIGURA 6: Avaliação do diâmetro folicular ovariano de búfala (553), no momento da indução da ovulação (D11, 18:00h) através do uso da ultrasonografia.

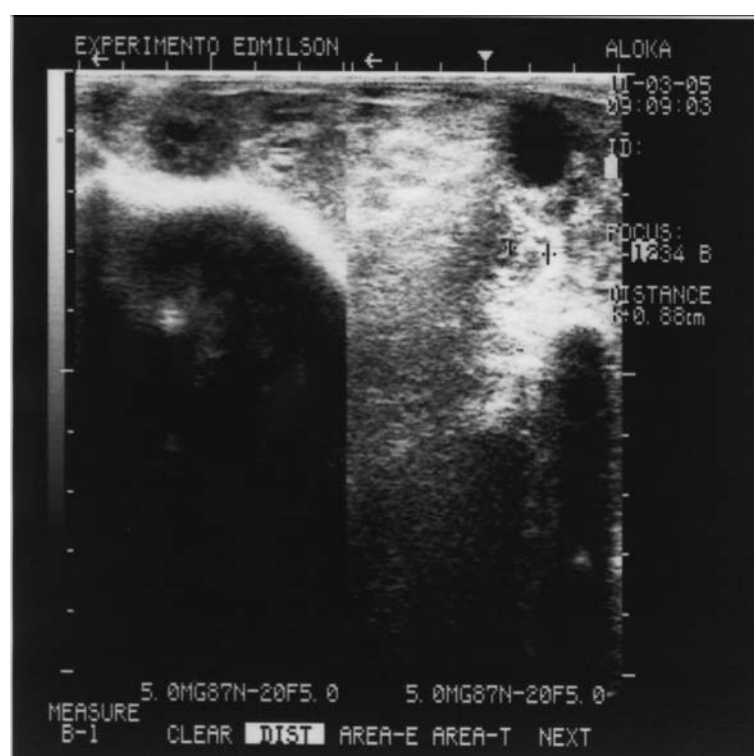


FIGURA 7: Avaliação do diâmetro folicular ovariano de búfala (038), no momento da indução da ovulação (D11, 18:00h) através do uso da ultrasonografia.

O intervalo em horas entre a retirada do implante e a ovulação foi de $63 \pm 30,77$ no G1, $72 \pm 16,97$ no G2 e $68,57 \pm 15,04$ no G3 ($p=0,812$) (Tabela 4).

As concentrações plasmáticas de progesterona, mantiveram-se abaixo de 1ng/mL indicando que os protocolos descritos foram utilizados em animais no período de anestro pós-parto, com exceção dos animais de número 91 (G1, D0) e 511 (G2, D9), os quais apresentaram atividade luteal ($P_4 > 1\text{ng/mL}$). Não houve diferenças estatísticas significativas entre os grupos, porém as concentrações deste hormônio diferem estatisticamente entre os dias 0, 9 e 11 no Grupo 1 ($p=0,022$). Os valores médios das concentrações de progesterona com seus respectivos erros padrões estão representados na Tabela 5 e Figura 8.

As concentrações plasmáticas de cortisol ($\mu\text{g/dl}$) foram crescentes no decorrer do experimento (Tabela 6 / Figura 9). Não foram encontradas diferenças estatísticas significantes entre os grupos (G1, G2 e G3), mas os grupos 1 e 3, mostraram-se estatisticamente diferentes entre seus dias (G1: $D0 < D9 < D11$, $p=0,014$; G2: $D0 < D9 < D11$, $p=0,01$).

Houve correlação estatística inversa entre as concentrações individuais de cortisol e a ocorrência de ovulação quando os três grupos foram avaliados em conjunto ($n=24$), com coeficiente de correlação de $-0,48$; obtido através do Produto de Person (Tabela 7).

TABELA 4.: Intervalo em horas entre a remoção do implante e a ocorrência da ovulação nos três diferentes grupos experimentais.

Intervalo (em horas) entre a remoção do implante e a ovulação		
G1	G2	G3
$63 \pm 30,77$	$72 \pm 16,97$	$68,57 \pm 15,04$
$p=0,812$		

TABELA 5: Concentrações médias ($\pm$ erro padrão) de progesterona (ng/mL) nos diferentes grupos experimentais de búfalas durante os protocolos hormonais.

	G1	G2	G3
P4 D0 ($p=0,505$)	$0,49 \pm 0,13^{Aa}$	$0,35 \pm 0,07^{Aa}$	$0,34 \pm 0,09^{Aa}$
P4 D9 ($p=0,968$)	$0,29 \pm 0,07^{ABa}$	$0,29 \pm 0,12^{Aa}$	$0,32 \pm 0,09^{Aa}$
P4 D11 ($p=0,976$)	$0,11 \pm 0,04^{Ba}$	$0,10 \pm 0,04^{Aa}$	$0,10 \pm 0,03^{Aa}$
	($p=0,022$)	($p=0,111$)	($p=0,066$)

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna (A,B) indicam diferença estatística ($p<0,05$)

Letras minúsculas diferentes na mesma linha (a, b) indicam diferença estatística ($p<0,05$)

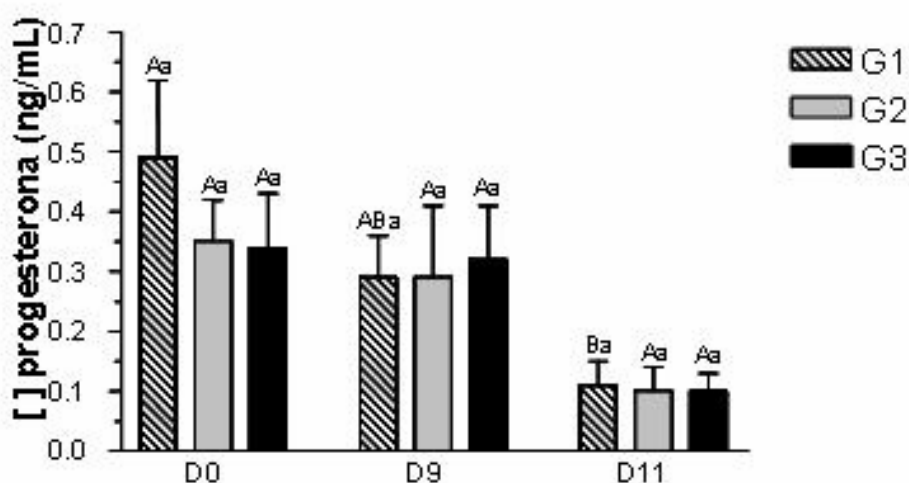


FIGURA 8: Concentrações plasmáticas de progesterona (ng/mL) nos 3 diferentes protocolos, com diferença estatística entre os dias do mesmo grupo (letras maiúsculas) e no mesmo dia entre os tratamentos (letras minúsculas) em búfalas.

TABELA 6: Médias ($\pm$ erro padrão) das concentrações de cortisol ($\mu\text{g/dL}$) nos diferentes grupos (G1, G2 e G3) de búfalas durante os protocolos hormonais.

	G1	G2	G3
Cortisol D0 ($p=0,460$)	$0,42 \pm 0,05^{\text{Ba}}$	$0,48 \pm 0,13^{\text{Aa}}$	$0,32 \pm 0,07^{\text{Ba}}$
Cortisol D9 ($p=0,547$)	$0,68 \pm 0,10^{\text{ABa}}$	$0,62 \pm 0,15^{\text{Aa}}$	$0,50 \pm 0,09^{\text{Aba}}$
Cortisol D11 ($p=0,338$)	$0,83 \pm 0,11^{\text{Aa}}$	$1,22 \pm 0,37^{\text{Aa}}$	$0,76 \pm 0,11^{\text{Aa}}$
	($p=0,014$)	($p=0,096$)	($p=0,010$)

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna (A,B) indicam diferença estatística ($p<0,05$)

Letras minúsculas diferentes na mesma linha (a, b) indicam diferença estatística ($p<0,05$)

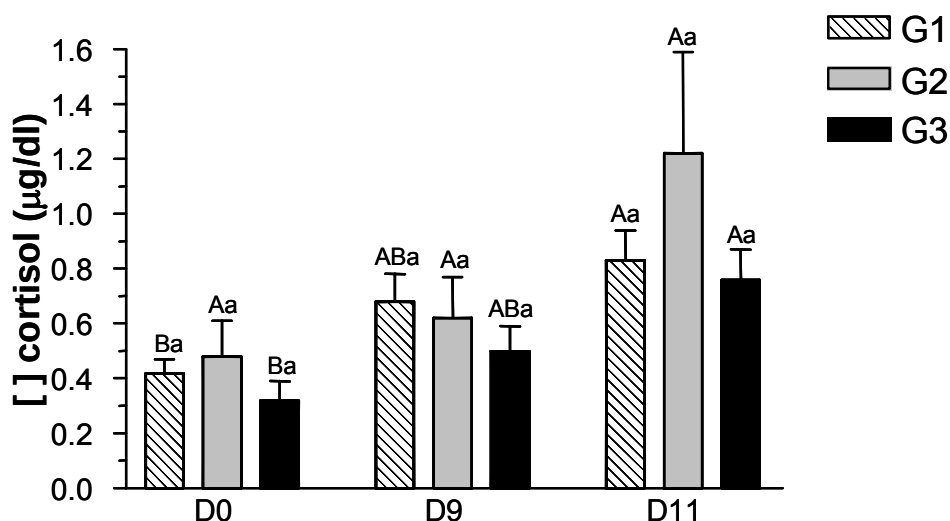


FIGURA 9: Concentração plasmática de cortisol ($\mu\text{g/dl}$), com diferença estatística entre os dias do mesmo grupo (letras maiúsculas) e no mesmo dia entre os tratamentos (letras minúsculas) em búfalas.

TABELA 7: Concentrações médias ($\pm$ erro padrão) de cortisol ($\mu\text{g/dL}$) dos animais de acordo com a ocorrência da ovulação nos 3 diferentes grupos experimentais.

	Animais que ovularam	Animais que não ovularam	Nível de Significância
Grupo 1 (n=8)	0,75 $\pm$ 0,12 (n=5)	0,96 $\pm$ 0,20 (n=3)	0,37
Grupo 2 (n=8)	0,71 $\pm$ 0,24 (n=4)	1,7 $\pm$ 0,63 (n=4)	0,18
Grupo 3 (n=8)	0,73 $\pm$ 0,14 (n=6)	0,84 $\pm$ 0,10 (n=2)	0,70
Totalidade de animais (n=24)	0,73 $\pm$ 0,08 (n=15)	1,21 $\pm$ 0,30 (n=9)	0,04

5.0 DISCUSSÃO

Para facilitar o entendimento, a discussão dos resultados foi iniciada pela taxa de ovulação em cada grupo experimental..

A taxa de ovulação obtida no Grupo 1 (62,5%), foi semelhante à obtida por Sá filho et al.,(2004) (60%) em fêmeas *Bos indicus*, porém foi inferior à reportada por Porto Filho (2004), na estação reprodutiva desfavorável para a reprodução dos búfalos, o qual observou taxa de ovulação para o mesmo tratamento de 66,7% (14/21). Os diâmetros foliculares do folículo dominante no momento da remoção da fonte de progesterona (D9) foram inferiores aos obtidos pelo mesmo autor ($8,5\pm 2,2\text{mm}$ vs $5,8\pm 2,7\text{mm}$), no entanto, dados similares foram encontrados por Bartolomeu (2003), ($5,6\pm 0,6\text{mm}$); com o mesmo tipo de dispositivo de liberação de progestágeno (CRESTAR®) mas sem o uso de gonadotrofinas.

O diâmetro máximo dos folículos ovulatórios do grupo 1 (G1, $12,9\pm 2,9\text{mm}$) foram semelhantes aos descritos por Baruselli et al. (1997) durante o ciclo estral de animal com três ondas de crescimento folicular ($1,34\pm 0,13\text{cm}$), por Presicce et al. (2004) em vacas após tratamento hormonal para sincronização da ovulação com PRID® ($13,8\pm 0,6\text{mm}$) e por Porto Filho (2004) com o mesmo protocolo em questão ($12,5\pm 2,7\text{mm}$).

No grupo 1, o intervalo entre a retirada do implante (CRESTAR®, D9) e a ovulação ($63\pm 30,77$ horas); mostrou-se compatível aos achados de Moura (2003), com emergência de onda induzida com 5mg de BE e CIDR® como fonte de progesterona ($66,7\pm 16,5$ horas), já o mesmo intervalo, no Grupo 2 ($72\pm 16,97$ horas) do presente trabalho chegou próximo ao relatado pelo autor em questão durante a estação reprodutiva desfavorável com utilização de 2,5mg de BE em mesma fonte progesterona. Porém, para o grupo 2, o intervalo é superior ao obtido por Bartolomeu (2003) ($64,0\pm 0,0$ horas), que utilizou CRESTAR® associado a 5mg de VE.

A taxa de ovulação obtida no Grupo 2, também foi constatada por Porto Filho (2004) (50 vs 44,4%) em protocolo sem administração da eCG; entretanto, foi inferior a estudos prévios em condições italianas (ZICARELLI et

al.; 1997) onde 59,4% das búfalas ovularam num intervalo de 96 horas após a remoção da fonte de progesterona. O diâmetro máximo do folículo ovulatório desse grupo ($14,2 \pm 1,2\text{mm}$, $n=4$) foi maior que o encontrado por autores como Porto Filho (2004) ($12,6 \pm 3,0\text{mm}$) e Presiccer et al., (2004) ($13,8 \pm 0,6\text{mm}$), porém a taxa de ovulação foi a menor dos três grupos, possivelmente devido às concentrações plasmáticas de cortisol serem maiores neste grupo se comparado aos outros. O estresse interferiu na taxa de ovulação provavelmente através de alterações endocrinológica que culminaram na diminuição dos níveis de GnRH circulantes causando alteração da frequência de liberação e amplitude dos pulsos de LH, privando o folículo do suporte adequado desse hormônio (SMITH & DOBSON, 2002). Porém esse aumento nas concentrações de cortisol do grupo 2 deve-se ao fato de que 3 animais apresentaram níveis deste corticoesteróide entre 1,0 e $1,4\mu\text{g/dL}$, ademais, uma búfala deste grupo (516) apresentou a maior concentração de todas ($3,57\mu\text{g/dL}$). Todavia, foi averiguado aumento nas concentrações de cortisol no decorrer do experimento, nos três grupos experimentais. Provavelmente pela interferência do manejo inadequado da propriedade, onde os animais não eram condicionados a passar no tronco de contenção.

Notou-se, nos três tratamentos hormonais, correlação inversamente proporcional entre a concentração plasmática de cortisol e a ocorrência de ovulação, porém esta analogia não se aplica quando se compara o diâmetro máximo do folículo pré ovulatório e as concentrações de cortisol devido ao fato que o primeiro dado foi calculado apenas com base nas búfalas que ovularam e o seguinte, na totalidade dos animais por grupo.

A taxa de ovulação referente ao Grupo 3 (75%) foi numericamente superior aos dados de Barile et al. (2001a), porém esses autores trabalharam com indução do estro em novilhas e obtiveram em dois ensaios distintos 85% e 80% ($n=20$) de manifestações de estro num intervalo de 72 horas pós remoção do implante tipo PRID®. Porém, em outro experimento (BARILE et al. 2001b) verificaram taxa de ovulação de 60,9% até 96 horas pós remoção do PRID®. Na espécie bovina (*Bos indicus*), Marques et al. (2003) observaram taxa de ovulação de 76% (19/25) com 400UI de eCG e, Sá Filho et al.(2004), 73,1%

(19/26). O aumento no diâmetro do folículo ovulatório encontrado no G3, também são similares com os achados no experimento desses últimos autores provavelmente devido ao efeito benéfico do eCG na taxa de crescimento folicular por sua bioatividade semelhante ao FSH (BOLAND et al. 1991), embora esse efeito não tenha sido observado no Grupo 1. O intervalo de tempo entre a retirada do progestágeno e a ovulação ($68,57 \pm 15,04$ horas) foi de acordo com os dados obtidos por Campo e Jairo (2001) os quais relataram que a maior porcentagem de manifestação de cio ocorreu 60 horas após a remoção do implante (CRESTAR[®]), permanecendo por 9 dias e no momento da retirada os animais receberam 500UI de eCG. O Grupo 3 apresentou a maior taxa de ovulação talvez devido às concentrações de cortisol serem as menores dos três grupos e à emergência da onda ter acontecido precocemente pelo que indicam os diâmetros dos folículos dominantes no dia 9.

. Os animais com eCG (G1 e G3) apresentaram intervalo médio entre a remoção do implante e ovulação numericamente menor quando comparados ao Grupo 2 (G1, $63 \pm 30,77$; G2, $72 \pm 16,97$ e G3, $68,57 \pm 15,04$ horas). Neste sentido, Marques et al. (2003), também manifestaram a ocorrência do mesmo fato em vacas *Bos indicus* onde os animais do grupo que recebeu 400UI de eCG apresentaram ovulação anterior aos que não receberam ($74,2 \pm 4,0$ vs $78,0 \pm 3,1$ horas). Takahashi et al. (2002) observaram em seus ensaios que as fêmeas tratadas com eCG mostraram aumento significativo nas concentrações plasmáticas de estrógeno, no entanto não foram observadas alterações na esteroidogênese quando da administração de hCG.

O período do ano no qual foi realizado o experimento foi considerado favorável à reprodução da espécie bubalina conforme destacou BARUSELLI (1993); no entanto, pela aferição das concentrações plasmáticas de progesterona e pela data da última parição, os animais apresentavam-se em anestro pós-parto ($P4 < 1\text{ng/mL}$), com exceção dos animais de número 91 (Grupo 1, D0) e 511 (Grupo2, D9). Os resultados das concentrações plasmáticas de progesterona foram semelhantes aos encontrados por Hernandez et al. (2001), verificando que as concentrações de progesterona em fêmeas em lactação ($n=29$) mantiveram-se inferiores a 1ng/mL até 60 dias pós-parto. Os dados obtidos nas dosagens hormonais de progesterona também

concordam com os de Ramos et al.(2001), que verificaram concentrações de $0,24 \pm 0,12$ ng/mL para animais em estro, fase do ciclo onde sabidamente não há atividade luteal; e, recentemente, por Presicce et al., (2005); os quais constataram níveis basais desse hormônio ($0,17 \pm 0,0$ ng/mL) para vacas pluríparas, até a ocorrência de ovulação.

Os protocolos nos quais ocorreu a administração da Gonadotrofina Coriônica Equina pareceram promover melhores taxas de ovulação em búfalas em anestro pós-parto; já o administrado ao Grupo 3, ou seja somente com a administração de eCG, apresentou maior taxa de ovulação, foi eficiente na sincronização da ovulação.

Novos estudos com este ou outros protocolos devem ser realizados para obtenção de melhores taxas de ovulação e conseqüentemente melhores índices de prenhez.

6.0 CONCLUSÕES

Nas condições de realização do presente trabalho concluiu-se que:

- Os três protocolos foram eficazes para a indução da ovulação em búfalas em anestro pós-parto;
- O protocolo utilizado no Grupo 3, somente com a administração de eCG no momento da remoção do implante de progestágeno proporcionou maior taxa de ovulação;
- As concentrações de progesterona nos três grupos experimentais indicaram que os animais apresentavam-se no período de anestro pós-parto;
- As concentrações plasmáticas de cortisol exerceram influência inversamente proporcional à ocorrência de ovulação;

7.0 REFERÊNCIAS¹

ABDULLAH, P.; WILLIAMSON, N.B.; PARKINSON, T.J.; FATHALLA, M. Comparison of estrus synchronization programmes in dairy cattle using oestradiol benzoate, short-acting progesterone and cloprostenol, or buserelin and cloprostenol. **New Zealand Veterinary Journal**, Wellington, v.49, n-5, p.201-210, 2001.

ALI, A.; ABDEL-RAZEK, A.K.; ABDEL-GHAFFAR, S.; GLATZEL, P.S. Ovarian Follicular Dynamics in Buffalo Cows (*Bubalus bubalis*). **Reproduction of Domestic Animals**. Berlin, v.38, p.214-218, 2003.

BARILE, V.L.; GALASSO, A.; MARCHIORI, E.; PACELLI, C.; MONTEMURO, N.; BERGHESE, A. Effect of PRID treatment on conception rate in mediterranean buffalo heifers. **Livestock Production Science**. Amsterdam. v.68, p.283-287, 2001a.

BARILE, V.L.; GALASSO, A.; CARRETTA, A.; MARCHIORI, E.; BORGHESE, A. Evalution of different timed inseminations on conception rate in synchronized Italian buffaloes. In: WORD BUFFALO CONGRESS, 4., 2001. Maracaibo. Proceddings... Maracaibo, 2001b. v.2, p.172-178, CD-ROM.

BARILE, V.L.; PACELLI, C.; DE SANTIS, G.; PENNA, L.; VELOCCIA, C.; ALLEGRI, S.; LOMOLINO, R.; BARBATO, O.; BORGHESE, A. Fixed time artificial insemination in buffalo using two differente hormonal schedule for oestrus synchronization. Preliminary results. In: WORD BUFFALO CONGRESS, 7., 2004, Makati. Proceddings...Makati, 2004. v.2, p. 585-587.

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

¹ ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação – Referências –Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 22p.
 BIOSIS: **Serial sources for the BIOSIS preview database**. Philadelphia, 1996. 468p.

BARNABE, R.C.; BARNABE, V.H.; GUIDO, M.C.; GAMBARINI, M.L.; ZOGNO, M.A.; BARUSELLI, P.S. Desestacionalização de novilhas búfalas por suplementação alimentar. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte. v.19 (1-2), p.47-59, 1995.

BARROS, C.M. Controle farmacológico de ciclo estral e superovulação em zebuínos de corte. In: SIMPÓSIO SOBRE CONTROLE FARMACOLÓGICO DO CICLO ESTRAL EM RUMINANTES, 2000, São Paulo, **Anais...**, São Paulo, 2000, p.158-159.

BARTOLOMEU, C.C.; DEL REI, J.A.; MADUREIRA, E.H.; CARVALHO, N.A.T.; BARNABE, R.C.; BARUSELLI, P.S. Sincronização do ciclo estral e da ovulação com utilização de CIDR-B e CRESTAR em bubalinos. **Arquivo da Faculdade de Veterinária UFRGS**, Porto Alegre, v.27, p.208, 1999.

BARTOLOMEU, C.C. Estudo da dinâmica folicular durante o tratamento com CIDR-B e Crestar visando a inseminação artificial em tempo fixo em fêmeas bubalinas (*Bubalus bubalis*). 2003. 158f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

BARUSELLI, P.S. Manejo reprodutivos de bubalinos. Registro, 1993. 46p. (Monografia Apresentada ao Instituto de Zootecnia, Estação Experimental de Zootecnia do Vale de Ribeira).

BARUSELLI, P.S. Controle farmacológico de ciclo estral e superovulação em zebuínos de corte. In: SIMPÓSIO SOBRE CONTROLE FARMACOLÓGICO DO CICLO ESTRAL EM RUMINANTES, 2000, São Paulo, **Anais...**, São Paulo, 2000, p.190-254

BARUSELLI, P.S.; BÓ, G.A.; REIS, E.L.; MARQUES, M.O. Inseminação artificial em tempo fixo em bovinos de corte. In... SIMPÓSIO INTERNACIONAL

DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA 1º, 2004, Londrina. **Anais...** Londrina, 2004 a., p.155-161

BARUSELLI, P.S, MARQUES, M.O.; MADUREIA, E.H.; COSTA NETO, W.P.; GRANDINETI, R.R.; BO, G.A. Increased pregnancy rates in embryo recipients treated with CIDR-B devices. **Theriogenology**, Stonehann v.55, p.335, 2001.

BARUSELLI, P.S.; BERNARDES, O.; BRAGA, D.P.A.F.; ARAUJO, D.C.; TONHATI, H. Calving distribution throughout the year in buffalo raised all over Brazil. In: WORD BUFFALO CONGRESS, 4., 2001. Maracaibo. Proceedings... Maracaibo, 2001, v.2, p.234-239, CD-ROM.

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 da ovulação artificial em tempo fixo. Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS, v.27, p.210, 1999.

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

BARUSELLI, P.S.; REIS, E.L.; MARQUES, M.O.; NASSER, L.F.; BO, G.A. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrous beef cattle in tropical climates. **Animal Reproduction Science**. Amsterdam, v.82-83, p.479-486, 2004b

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

BÓ, G.A.; CUTAIA, I.; BARUSELLI, P.S. Programas de inseminación artificial y transferencia de embriones a tiempo fijo. In...SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 1., 2004, Londrina. **Anais...** Londrina, 2004. p.56-81.

BOLAND, M.P.; GOULDING, D.; ROCHE, J.F. Alternative Gonadotrophins for superovulation in cattle. *Theriogenology*, Amsterdam, v.35(1), p.5-17, 1991.

BRITO, L.F.C.; SATRAPA, R.; MARSON, E.P.; KASTELIC, J.P. Efficacy of PGF2 α to synchronize estrus in water buffalo cows (*Bubalus bubalis*) is dependente upon plasma progesterone concentration, corpus luteum size and ovarian follicular status before treatment. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.73, p.23-35, 2002.

CAMPO, E.; JAIRO, J. Sincronización de celo e inseminación artificial y su evaluación económica en búfalas de río. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 4., 2001. Maracaibo. Proceedings... Maracaibo, 2001, v.2, p.295-304, CD-ROM, 2001.

CARVALHO, N.A.T.; BARUSELLI, P.S.; ZICARELLI, L.; MADUREIRA, E.H.; VISINTIN, J.A.; D'OCCHIO, M.J. Control of ovulation with a GnRH agonist after superstimulation and follicular growth in buffalo: fertilization and embryo recovery. **Theriogenology**, Stoneham, v.58, p.1641-1650, 2002.

COLAZO, M.G.; MARTÍNEZ, M.F.; KASTELIC, J.P.; MAPLETOFT, R.J. Effects of dose and route of administration of cloprostenol on luteolysis, estrus and ovulation in beef heifers. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.72, p.47-62, 2002.

COLAZO, M.G.; KASTELIC, J.P.; MAPLETOFT, R.J. Effects of estradiol cypionate (ECP) on ovarian follicular dynamics, synchrony of ovulation and fertility in CIDR-based, fixed-time AI programs in beef Heifers. **Theriogenology**, Stoneham, v.60, p.855-865, 2003.

COSTA, D.S.; TORRES, C.A.A.; FERNANDES, C.A.C.; GUIMARÃES, J.D.; SANTOS, M.D. Aplicação de diferentes doses de buserelina, prévia à indução da luteólise em bovinos. In: **REUNIÃO DA SBZ**, 34, 1997, Juiz de Fora-MG., **Anais...** Juiz de Fora, 1997

COSTA, D.S.; HENRY, M.; WHITE, C.R. Sincronização de cio em vacas zebu com etiproston. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, v.20, n.117, p.23-25, 2000.

CRUZ, L.C. Reproductive biotechniques in water buffalo. In: **Technical Bulletin of Food and Fertilizer Technology Center**, v.59, n.153, p.1-14, 2000.

DAY, M.L. Hormonal induction of estrus cycles in anestros *Bos taurus* beef cows. **Animal Reproduction Science**, v.82-83, p.487-494, 2004.

DE RENSIS, F.; RONCI, G.; GUARNERI, P.; NGUYEN, B.X.; PRSCICCE, G.C.; HUSZENICZA, G.; SCARAMUZZI, R.J. Conception rate after fixed time insemination following ovsynch protocol with and without progesterone supplementation in cyclic and non-cyclic Mediterranean Italian Buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, v.63,p.18-24-1831, 2005.

DIAS, J.D.S.; OLIVEIRA, A.T.D.; AGUIAR, P.R.L.; RODRIGUES, J.L. Diagnóstico ultra-sonográfico do momento ovulatório em búfalas (*Bubalus bubalis*) inseminados no estro espontâneo e induzido. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.31, n.4, p.657-662, 2001.

DOBSON, H.; SMITH, R.F. What is stress, and how does it affect reproduction? **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.734-752, 2000.

EVANS, A.C.O. Characteristics of Ovarian Follicle Development in Domestic Animals. **Reproduction of Domestic Animals**, v.38, p.240-246, 2003

FERNANDES, C.A.C.; TORRES, C.A.A.; COSTA, E.P. Comparação entre doses e vias de aplicação de cloprostenol para sincronização de estro em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.18, n.3-4, p.105-109, 1994.

GONSALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo; Varela, 2002. p.97-125.

GORDON, I. **Controlled Reproduction in Sheep and Goats**. New York: CAB International, 1999. p.76-77.

HAFEZ, E.S.E. **Reprodução animal**, 6^o ed. São Paulo: Manoele, 1995. p.79-81.

HAYASHI, K.; ACOSTA, T.J.; BERISHA, B.; KOBAYASHI, S.; OHTANI, M., SCHAMS, D.; MIYAMOTO, A. Changes in prostaglandin secretion by the regressing bovine corpus luteum. **Prostaglandin and other Lipid Mediators**, New York, v.70, p.339-349, 2003.

HATTAB, S.A.; KADOOM, A.K.; PALME, R.; BAMBERG, E. Effect of CRESTAR on estrus synchorization and the relationship between fecal and plasma concentrations of progestagens in buffalo cows. **Theriogenology**, Stoneham, v.54, p.1007-1017, 2000.

HERNÁNDEZ, A.; MONTIEL, N.; ROJAS, N.; ANGULO, F.; CAHUAO, N.; TORRES, I.; FERRE, E.; LUTZ, L.; PITA, N.; QUINTERO, R. Niveles de progesterone en búfalas postparto. In: World Buffalo Congress, 4., 2001. Maracaibo. Proceddings... Maracaibo, 2001, v.2, p.263-270, CD-ROM.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.
<http://www.Sidra.ibge.gov.br/dba/tabela/>. 2005. Acesso em: 10/ago/2005.

JACOMINI, J.O.; CHOW, L.A.; LARA, J.L.R.; ANDRADE, V.J.; MELO, P.S. Detecção do estro e inseminação artificial em búfalas (*Bubalus Bubalis*).

Revista Brasileira de Reprodução Animal, Belo Horizonte, v.15, n.1-2, p.19-24, 1991.

KOTWICA, J.; BOGACKI, M.; REKAWIECKI, R.; Neural Regulation of the bovine corpus luteum. **Domestic Animal Endocrinology**, Auburn, v.23, p.299-308, 2002.

LARSEN, P.R.; KRONENBERG, H.M.; MELMED, S.; POLONSKY, K.S. **Williams textbook of endocrinology**. 10 ed., Philadelphia:SAUNDERS, 2003. cap. 7, pag. 93

MADAN, M.L.; DAS, S.K.; PALTA, P. Applications of reproductive technology to buffaloes. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.42, p.299-306, 1996.

MADUREIRA, E.H. Controle farmacológico do ciclo estral com emprego de progesterona e progestágenos em bovinos. In: SIMPÓSIO SOBRE CONTROLE FARMACOLÓGICO DO CICLO ESTRAL EM RUMINANTES, 2000, São Paulo. **Anais...** São Paulo, 2000, p.89-98.

MANIK, R.S.; SINGLA, S.K.; PALTA, P.; MADAN, M.L. Effect of presence of a dominante follicle on the superovulatory response in buffalo (*Bubalus bubalis*). **Therigenology**, Stoneham, v.50, p.841-852, 1998.

MARTINEZ, M.F.; KASTELIC, J.P.; ADAMS, G.P.; MAPLETOFT, R.J. The use of GnRH or estradiol to facilitate fixed-time insemination in MGA-based synchronization regimen in beef cattle. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.67, p.221-229, 2001.

MARTINS, R.P.; OLIVEIRA, F.F.DE.; RIBEIRO, H.F.L.; QUIRINO, C.R. Estrous induction and synchronization using CRESTAR in buffaloes in the Para State, Brazil. In...BUFFALO SYMPOSIUM OF AMERICAS, 1., 2002. Estação das Docas. **Proceedings...** Estação das Docas, 2002, p.439-442p.

MARQUES, M.O.; REIS, E.L.; CAMPOS FILHO, E.P.; BARUSELLI, P.S. Efeitos da administração de eCG e de Benzoato de Estradiol para sincronização da ovulação em vacas zebuínas no período de pós-parto. In: Simpósio Internacional de Reprodución Animal, 5., 2003, Córdoba, Argentina. **Proceedings...** Córdoba, Argentina, 2003, p.392 (Abstract).

MAUPAUX, B.; VIGUIÉ, C.; SKINNER, D.C.; THIÉRY, J.C.; PELLETIER, J.; CHEMINEAU, P. Seasonal breeding in sheep: Mechanism of action of melatonin. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.42, p.109-117, 1996

MISRA, A.K.; PANT, H.C. Estrus induction following PGF2 α . Treatment in the superovulated buffalo (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, Stoneham, v.59, p.1203-1207, 2003.

MOURA, A.J.D.R. **Sincronização da ovulação com dispositivo intrvaginal de progesterona (CIDR.) associado a estrógeno e prostaglandina F2 α em búfalas (*Bubalus bubalis*) tratadas em estações reprodutivas distintas.** 2003. 127f. Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

MURPHY, B.D; MARTINUK, S.D. Equine chorionic gonadotropin. **Endocrine Reviews**, v.12, p.27-44, 1991.(Abstract)

NEGLIA, G.; GASPARINI, B.; DI PAULO, R.; ROSA, C.D.; ZICARELLI, L.; CAMPANILE, G. Comparison of pregnancy rates with two estrus synchronization protocols in Italian Mediterranean Buffalo cows. **Theriogenology**, Stoneham, v.60, p.125-133, 2003.

NEGLIA, G.; DI PAULO, R.; GASPARINI, B.; PRANDI, A.; ZICARELLI, L.; D'OCCHIO, M.J.; CAMPANILE, G. Corpus luteum function and embryonic mortality in buffaloes treated with a GnRH agonist, hCG and progesterone. In... WORLD BUFFALO CONGRESS, 2., 2004, Corrientes. **Proceedings...** Makati, 2004. p.592-595.

OBA, E. Tópicos atualizados ligados à reprodução na espécie bubalina. **In:** Contribuição ao Estudo dos Bubalinos: período de 1972-2001. Palestras. Botucatu: UNESP, FMVZ, 2003a. p. 179-198.

OBA, E. Biotecnologia da reprodução aplicada aos recursos genéticos animais. **In:** Contribuição ao Estudo dos Bubalinos: período de 1972-2001. Palestras. Botucatu: UNESP, FMVZ, 2003b. p. 279-293.

OKUDA, K.; MIYAMOTO, Y.; SKARZYNSKI, D.J. Regulation of endometrial prostaglandin F2 α synthesis during luteolysis and early pregnancy in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, Auburn, v.23, p.255-264, 2002.

PACELLI, C.; BARILE, V.L.; LENZA, R.; TERZANO, G.M.; MONTEMURRO, N.; BORGHESE, A. Comparison of two different doses of PMSG on conception rate in mediterranean buffalo heifers treated with PRID. **In:** WORD BUFFALO CONGRESS, 4., 2001. Maracaibo. **Proceddings...** Maracaibo, 2001, v.2, p.160-165, CD-ROM, 2001.

PORTO FILHO, R.M. **Sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo (IATF) durante a estação reprodutiva desfavorável em fêmeas bubalinas.** 2004. 100f. Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

PRESICCE, G.A.; SENATORE, E.M.; BELLA, A.; DE SANTIS, G.; BARILE, V.L.; DE MAURO, G.J.; TERZANO, G.M.; STECCO, R.; PARMEGGIANI, A. Ovarian follicular dynamics and hormonal profiles in heifer and mixed-parity Mediterranean Italian buffaloes (*Bubalus bubalis*) following an estrus synchronization protocol. **Theriogenology**, Stoneham, v.61, p.1343-1355, 2004.

PRESICCE, G.A.; BELLA, A.; TERZANO, G.M.; DE SANTIS, G.; SENATORE, E.M. Postpartum ovarian follicular dynamics in primiparous and pluriparous

Mediterranean Italian buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, Stoneham, v.63, p.1430-1439, 2005.

RAMOS, A.A. Bubalinocultura: Uma alternativa da produção de carne e leite. **In:** Contribuição ao Estudo dos Bubalinos: período de 1972-2001. Palestras. Botucatu:UNESP, FMVZ, 2003. p. 425-450.

RAMOS, A.A.; POLASTRE, R.; ROCHA, G.P. Aspectos do comportamento produtivo e reprodutivo e do melhoramento genético dos bufalinos. **In:** Contribuição ao Estudo dos Bubalinos: período de 1972-2001. Palestras. Botucatu:UNESP, FMVZ, 2003. p. 295-352.

RAMOS, D.; MARTÍNEZ, N.; COLMENARES, O.; BIRBE, B.; HERRERA, P.; REGGETI, F.; REGGETI, J. Niveles referenciales de progesterone durante el ciclo estral en búfalas de agua (*Bubalus bubalis*) en condiciones de sabanas mal drenadas. **In:** WORLD BUFFALO CONGRESS, 4., 2001. Maracaibo. **Proceddings...** Maracaibo, 2001, v.2, p.199-203, CD-ROM.

RIBEIRO, H.F.L.; CAMELO, A.S.A.; VALE, W.G.; SOUSA, J.S.; SILVA, A.O.A. Plasma concentrations of progesterone, oestradiol-17 β and cortisone before and during paturion in cross-bred buffalo cows raised under the hot conditions of the amazon region. **In:** WORLD BUFFALO CONGRESS, 4., 2001. Maracaibo. **Proceddings...** Maracaibo, 2001, v.2, p.204-209, CD-ROM, 2001.

RYAN, D.P.; GALVIN, J.A.; O'FARRELL, K.J. Comparison of oestrus synchronization regimens for lactating dairy cows. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.56, p.153-168, 1999.

RUBIANES, E.; MENCHACA, A.; CARBAJAL, B. Response of the 1-5 day-aged ovine corpus luteum to prostaglandin F2 α . **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.78, p.47-55, 2003.

SÁ FILHO, M.F.; REIS, E.L.; VIEL JR, J.O.; NICHI, M.; MADUREIRA, E.H.; BARUSELLI, P.S. Dinâmica folicular de vacas Nellores lactantes em anestro tratadas com progestágeno, eCG, e GnRH. **Acta Scientiae Veterinarie**, Porto Alegre, v.32 (suppl), p.235, 2004.

SAS. **SAS User's Guide Statistics**. Statistical Analysis System Institute. Cary, NC, v.8, 2002.

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

SMITH, R.F.; DOBSON, H. Hormonal interaction within the hypothalamus and pituitary with respect to stress and reproduction in sheep. **Domestic Animal Endocrinology**, v.23, p.75-85, 2002

SPINOSA, H.S.; GÓNIKI, S.L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 3.ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 239-245, 311,319, 529-531.

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

THOMAS, S.C.; BRUCKMAIER, R.M.; OSTENSSON, K.; SVENNERSTEN-SJAUNJA, K. Effect of different milking routines on milking-related release of the hormones oxytocin, prolactin and cortisol, and on milk yield and milking performance in Murrah buffaloes. **Journal of Dairy Science**, v.72, p.10-18, 2005.

TAKAHASHI, T.; HIRAKO, M.; PATEL, O.V.; SHIMIZU, M.; HASEGAWA, Y.; DOMEKI, I.; HASHIZUME, K. Plasma steroid profiles following follicle-stimulating hormone or Equine Chorionic Gonadotropin injection in cows chronically treated

with Gonadotropin-Releasing Hormone Agonist. **Journal of Veterinary Medical Science**. v.68(8), p.731-734, 2002.

TSUBOI, K.; SUGIMOTO, Y.; ICHIKAWA, A.; Prostaglandin E2 and F2 α in mouse reproduction. **International Congress Series**, Amsterdam, v.1233, p.397-404, 2002.

ULLAH, A.; SAEED, A.; YAQOOB, T.; AHMAD, N. Effect of norgestomet end GnRH on induction of estrus and fertility in postpartum non suckled Nili-Ravi buffaloes. In... **WORLD BUFFALO CONGRESS**, 7., 2004, Corrientes. **Proceddings...** Makati, 2004. p.698-701

VALE, W.G. Recentes avanços na reprodução dos bubalinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v19, n.1-2, p.35-46, 1995.

VALE, W.G.; SNEL-OLIVEIRA, M.V.; MINISTÉRIO, E.F.; MONDADORI, R.G. Some reproductive patterns of female Murrah bufaloes in the Brazilian Central Region. In: **World Buffalo Congress**, 4., 2001. Maracaibo. **Proceddings...** Maracaibo, 2001, v.2, p.248-255, CD-ROM.

VASCONCELOS, J.L.M. Controle do estro e da ovulação visando a inseminação artificial em tempo fixo em bovinos de leite. In: **SIMPÓSIO SOBRE CONTROLE FARMACOLÓGICO DO CICLO ESTRAL EM RUMINANTES**, 2000, São Paulo, **Anais...** São Paulo, 2000, p.115-157.

WATTS, J.R.; WRIGHT, P.J.; PARRY, B.W. Sodium cloprostenol administered at a continuous low dosage induces polydipsia and suppresses luteal function in early diestrus bitches. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.67, p.113-123, 2001.

WEBB, R.; WOAD, K.J.; ARMSTRONG, D.G. Corpus luteum (CL) function: local control mechanisms. **Domestic Animal Endocrinology**, Auburn, v. 23, p.277-285, 2002.

ZICARELLI, L.; DE FILLIPO, C.; FRANCILLO, M.; PACELLI, C.; VILLA, E.
Influence of insemination technique and ovulation time on fertility percentage in
synchronized buffaloes. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 5.
Proceedings...Caserta, 1997, p.732-737.