ROBERTO MENDES PORTO FILHO

**Sincronização da ovulação para a inseminação artificial em
tempo fixo (IATF) durante a estação reprodutiva
desfavorável em fêmeas bubalinas**

São Paulo

2004

ROBERTO MENDES PORTO FILHO

**Sincronização da ovulação para a inseminação artificial em
tempo fixo (IATF) durante a estação reprodutiva
desfavorável em fêmeas bubalinas**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de doutor em
Medicina Veterinária.

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal.

Orientador:

Prof.Dr.Pietro Sampaio Baruselli

São Paulo

2004

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1404
FMVZ

Porto Filho, Roberto Mendes

Sincronização da ovulação para a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) durante a estação reprodutiva desfavorável em fêmeas bubalinas / Roberto Mendes Porto Filho. - São Paulo : R. M. Porto Filho, 2004.
99 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, 2004.

Programa de Pós-graduação: Reprodução Animal.
Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli.

1. Inseminação artificial em tempo fixo. 2. Búfalos. 3. eCG.
4. hCG. I. Título.

ERRATA

Folha	Parágrafo	Linha	Onde se lê	Leia-se
5	RESUMO	4	100 f.	99 f.
6	ABSTRACT	4	100 f.	99 f.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: PORTO-FILHO, Roberto Mendes

Título: Sincronização da ovulação para a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) durante estação reprodutiva desfavorável em fêmeas bubalinas

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Data: __/__/__

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

*À minha esposa CAROLINA, pelo apoio,
paciência, cumplicidade, carinho e amor,
tanto nas conquistas como nos momentos
difíceis.*

*Às minhas filhas LETÍCIA e BÁRBARA, por
todos os sorrisos. O simples fato de vocês
existirem enche a minha vida de alegria.*

*Aos meus pais ROBERTO e ALBA, e às
minhas irmãs CLÁUDIA e ADRIANA, que me
apoiaram e motivaram em todos os
momentos da minha vida, sempre com muito
carinho e amor.*

AMO VOCÊS!!!

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. PIETRO SAMPAIO BARUSELLI, pela orientação, apoio, amizade e paciência na condução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. ED HOFFMANN MADUREIRA, pelo incentivo, amizade e oportunidades oferecidas.

Ao Prof. Dr. RENATO CAMPANARUT BARNABE, pela amizade e dedicação aos pós-graduandos e ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal.

Ao Prof. Dr. CLÁUDIO ALVARENGA DE OLIVEIRA, pelo auxílio na realização das dosagens hormonais.

Ao amigo e companheiro NÉLCIO ANTONIO TONIZZA DE CARVALHO, pela inestimável colaboração na realização dos experimentos deste trabalho.

Ao MARCÍLIO NICHÍ, pelo auxílio na realização da análise estatística.

Aos Professores do Curso de Pós-Graduação em Reprodução Animal, pelos ensinamentos.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação em Reprodução Animal, pela amizade, constante troca de informações, e pelo grande auxílio nos momentos difíceis.

À HARUMI SHIRAISHI e à THAÍS SOTO, pela eficiência, paciência e dedicação aos pós-graduandos.

A todos os funcionários do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, pela amizade, gentileza e eficiência.

À Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, pela elaboração da ficha catalográfica e pela revisão das referências deste trabalho.

À MARIETINHA, pelo auxílio na normalização desta tese.

A todas as pessoas que, de qualquer maneira, colaboraram para a realização do presente estudo.

Muito obrigado !!!!

RESUMO

PORTO-FILHO, R.M. **Sincronização da ovulação para a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) durante estação reprodutiva desfavorável em fêmeas bubalinas.** [Synchronization of ovulation for fixed time artificial insemination (FTAI) during the off breeding season in buffalo]. 2004. 100 f.. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

Foram comparadas diferentes doses de eCG e hCG associadas a dispositivos intravaginais de progesterona (DIV), para avaliar o crescimento folicular e a ovulação, bem como a taxa de prenhez após a IATF e a funcionalidade do CL 12 dias após a sincronização em búfalas, durante a estação reprodutiva desfavorável. Para tanto, foram realizados cinco experimentos. Nos experimentos 1, 2 e 4, os grupos foram estabelecidos em função da ciclicidade dos animais, avaliada pelas concentrações plasmáticas de progesterona mediante colheita de sangue por punção da veia jugular no D-10 e no D0. Nos experimentos 3 e 5, os grupos foram estabelecidos em função da condição corporal e da ordem de parto. Em todos os experimentos as búfalas receberam um DIV associado a 2mg de Benzoato de Estradiol (BE) no D0. No D9 o DIV foi retirado, e procedeu-se à administração de 0,150mg de prostaglandina (PGF). No experimento 1, as búfalas do G1 (Controle, n=9) e do G2 (eCG, n=10) receberam 1500UI de hCG no D11; o G2 recebeu também 500UI de eCG no D-9; a IATF foi realizada no D12. Nesse experimento, o diâmetro máximo do folículo dominante (DMFD) foi de $12,6 \pm 3,0$ e $13,4 \pm 1,7$ mm para o G1 e o G2, respectivamente ($P>0,05$); o diâmetro do folículo ovulatório (DFO) foi de $14,9 \pm 2,9$ (G1) e de $14,0 \pm 1,6$ mm (G2; $P>0,05$); o intervalo entre a retirada do DIV e a ovulação (IROV) foi de $78,0 \pm 12$ (G1) e $68,0 \pm 9,0$ h (G2; $P>0,05$); a taxa de ovulação (TO) foi de 44,4 (G1) e 70,0% (G2; $P>0,05$). A área do CL (ACL) foi de $31,6 \pm 19,9$ (G1) e de $29,9 \pm 9,7$ mm² (G2; $P>0,05$); a concentração plasmática de P4 (P4) foi de $1,3 \pm 1,4$ (G1) e $2,0 \pm 1,6$ ng/ml (G2; $P>0,05$); a taxa de prenhez (TP) foi de 22,2 (G1) e 60% (G2; $P=0,11$). No experimento 2, as búfalas do G1 (1500 UI de hCG; n=21) e do G2 (1000UI de hCG; n=21) receberam 500UI de eCG no D9; no D11, o G1 recebeu 1500UI de hCG e o G2 1000UI de hCG. Os resultados desse experimento são relatados a seguir: DMFD de $12,4 \pm 2,3$ (G1) e $12,2 \pm 2,5$ mm (G2; $P>0,05$); DFO de $12,6 \pm 2,3$ (G1) e $12,5 \pm 2,7$ mm (G2; $P>0,05$); IROV de $67,7 \pm 18,1$ (G1) e $72,8 \pm 16,7$ h (G2; $P>0,05$); TO de 67,7 (G1) e 67,7% (G2; $P>0,05$); ACL de $24,8 \pm 9,2$ (G1) e $28,3 \pm 17,2$ mm² (G2; $P>0,05$); P4 de $2,3 \pm 1,4$ (G1) e $2,4 \pm 1,3$ ng/ml (G2; $P>0,05$). No experimento 3, os animais foram tratados de forma idêntica àqueles do experimento 2, porém as búfalas do G1 (n=83) e do G2 (n=91) receberam a IATF no D12. Nesse experimento, foi obtida TP de 53 (G1) e de 53,8% (G2; $P>0,05$). No Experimento 4, as búfalas do G1 (n=10) receberam 500UI e as do G2 (n=11) 400UI de eCG; os dois grupos receberam 1000UI de hCG no D11. Esse experimento teve como resultados: DMFD de $13,2 \pm 1,4$ (G1) e $13,8 \pm 1,8$ mm (G2; $P>0,05$); DFO de $13,7 \pm 1,1$ (G1) e $14,2 \pm 1,5$ mm (G2; $P>0,05$); IROV de $71,1 \pm 11,7$ (G1) e $75,0 \pm 5,5$ h (G2; $P>0,05$); TO de 70,0 (G1) e 72,7% (G2; $P>0,05$); ACL de $28,4 \pm 8,6$ (G1) e $31,6 \pm 10,3$ mm² (G2; $P>0,05$); P4 de $2,7 \pm 1,2$ (G1) e $3,3 \pm 2,9$ ng/ml (G2; $P>0,05$). No experimento 5 (G1/n=54; G2/n=51) foi adotado o mesmo protocolo do experimento 4, porém as búfalas receberam a IATF no D12. Esse experimento resultou em TP de 42,6 (G1) e 43,1% (G2; $P>0,05$). Assim, foi possível concluir que as concentrações de 400UI de eCG e de 1000UI de hCG, associadas ao DIV, foram suficientes para induzir o crescimento folicular, a ovulação e a prenhez em búfalas durante o período reprodutivo desfavorável.

Palavras-chave: Inseminação artificial em tempo fixo. Búfalos. eCG. hCG.

ABSTRACT

PORTO-FILHO, R.M. **Synchronization of ovulation for fixed-time artificial insemination (FTAI) during the off breeding season in buffalo.** [Sincronização da ovulação para a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) durante estação reprodutiva desfavorável em fêmeas bubalinas.]. 2004. 100 f.. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

Different dosage of eCG and hCG were compared in association to progesterone intravaginal device (IVD) in female buffalo during the off breeding season with the purpose of evaluating the follicular growing and ovulation as well as the pregnancy rate after FTAI and functionality of the CL, twelve days after the synchronization. For this, 5 experiments were done. For the establishments of the groups in the experiments 1,2 and 4 blood samples were collected for the analysis of plasmatic concentrations of P4 on D -10 and D0 to verify the cyclicity. In the experiments 3 and 5 the groups were established due body condition score and number of calving. In all the experiments the buffaloes received a IVD associated with 2mg of estradiol benzoate (EB) on D0. On D9 the IVD was extracted and it was followed by the administration of 0,150mg of prostaglandin (PGF). In the exp. 1 the buffaloes of G1 (control, n=9) and G2 (eCG, n=10) received 1500IU of hCG on D11. On G2 was administrated 500IU of eCG on D9. The FTAI was done on D12. The maximum diameter of dominant follicle (MDDF) was 12.6 ± 3.0 and 13.4 ± 1.7 mm to the G1 and G2, respectively ($P>0,05$). The diameter of the ovulatory follicle (DOF) was 14.9 ± 2.9 (G1) and 14.0 ± 1.6 mm (G2; $P>0,05$). The interval between the device withdrawn and ovulation (DWO) was 78.0 ± 12.0 (G1) and 68.0 ± 9.0 h (G2; $P>0,05$). The ovulation rate (OR) was 44.4 (G1) and 70.0% (G2; $P>0,05$). The CL area (CLA) was 31.6 ± 19.9 (G1) and 29.9 ± 9.7 mm² (G2; $P>0,05$). The plasmatic concentration of P4 (P4) was 1.3 ± 1.4 (G1) and 2.0 ± 1.6 ng/ml (G2; $P>0,05$). The pregnancy rate (PR) was 22.2 (G1) and 60% (G2; $P=0,11$). In the exp. 2 the buffalo females of G1 (1500IU of hCG; n=21) and G2 (1000IU of hCG; n=21) received 500IU of eCG on D9. On D11, G1 received 1500IU of hCG and G2 1000IU of hCG. The MDDF was 12.4 ± 2.3 (G1) and 12.2 ± 2.5 mm (G2; $P>0,05$), the DOF was 12.6 ± 2.3 (G1) and 12.5 ± 2.7 mm (G2; $P>0,05$), DWO was 67.7 ± 18.1 (G1) and 72.8 ± 16.7 h (G2; $P>0,05$), the OR was 67.7 (G1) and 67.7% (G2; $P>0,05$), the CLA was 24.8 ± 9.2 (G1) and 28.3 ± 17.2 mm² (G2; $P>0,05$) and the P4 was 2.3 ± 1.4 (G1) and 2.4 ± 1.3 ng/ml (G2; $P>0,05$). The exp. 3 was identical to exp.2, although the animals of G1 (n=83) and G2 (n=91) received the FTAI on D12. The PR was 53.0 (G1) and 53,8% (G2; $P>0,05$). In exp. 4, the animals of G1 (n=10) received 500IU and G2 (n=11) 400IU of eCG. Both groups received 1000IU of hCG on D11. The MDDF was 13.2 ± 1.4 (G1) and 13.8 ± 1.8 mm (G2; $P>0,05$), the DOF was 13.7 ± 1.1 (G1) and 14.2 ± 1.5 mm (G2; $P>0,05$), the DWO was 71.1 ± 11.7 (G1) and 75.0 ± 5.5 h (G2; $P>0,05$), the OR was 70.0 (G1) and 72.7% (G2; $P>0,05$), the CLA was 28.4 ± 8.6 (G1) and 31.6 ± 10.3 mm² (G2; $P>0,05$) and the P4 was 2.7 ± 1.2 (G1) and 3.3 ± 2.9 ng/ml (G2; $P>0,05$). In exp. 5 (G1/n=54; G2/n=51) was done the same protocol in the exp. 4, although the animals received the FTAI on D12. The PR was 42.6 (G1) and 43.1% (G2; $P>0,05$). Dosage of 400IU of eCG and 1000IU of hCG, associated to IVD for FTAI were enough to induce follicular growing, ovulation and pregnancy in buffalo females during the off breeding season.

Key words: Fixed-time artificial insemination. Buffalo. eCG. hCG.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1	ESTACIONALIDADE REPRODUTIVA	15
2.2	SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO COM HORMÔNIO LIBERADOR DE GONADOTROFINAS (GnRH)/HORMÔNIO LUTEINIZANTE (LH) ASSOCIADOS À PROSTAGLANDINA, PARA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO	17
2.3	ASSOCIAÇÃO DE PROGESTERONA OU PROGESTÁGENOS COM ESTRADIOL NA SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO PARA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO	26
2.4	USO DE GONADOTROFINA CORIÔNICA EQUINA E DE GONADOTROFINA CORIÔNICA HUMANA ASSOCIADO A PROGESTERONA OU PROGESTÁGENOS NA SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO PARA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO	36
3	MATERIAL E MÉTODO	44
3.1	LOCAL DOS EXPERIMENTOS	45
3.2	EXAMES REPRODUTIVOS	45
3.3	EXPERIMENTO 1: DINÂMICA FOLICULAR DURANTE O TRATAMENTO PARA SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO COM DISPOSITIVO INTRAVAGINAL DE PROGESTERONA ASSOCIADO OU NÃO AO eCG (0 VERSUS 500UI) E AO hCG (1500UI) EM FÊMEAS BUBALINAS EM FÊMEAS BUBALINAS, NA ESTAÇÃO REPRODUTIVA DESFAVORÁVEL	46
3.4	EXPERIMENTO 2: DINÂMICA FOLICULAR DURANTE O TRATAMENTO PARA SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO COM DISPOSITIVO INTRAVAGINAL DE PROGESTERONA ASSOCIADO AO eCG (500UI) E AO hCG (1000 VERSUS 1500UI) EM FÊMEAS BUBALINAS, NA ESTAÇÃO REPRODUTIVA DESFAVORÁVEL	50
3.5	EXPERIMENTO 3: TAXAS DE CONCEPÇÃO DE FÊMEAS BUBALINAS SUBMETIDAS À SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO PARA IATF COM DISPOSITIVO INTRAVAGINAL DE PROGESTERONA ASSOCIADO AO eCG (500UI) E A DIFERENTES DOSES DE hCG (1000 VERSUS 1500UI), NA ESTAÇÃO REPRODUTIVA DESFAVORÁVEL	53
3.6	EXPERIMENTO 4: DINÂMICA FOLICULAR DURANTE O TRATAMENTO PARA SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO COM DISPOSITIVO INTRAVAGINAL DE PROGESTERONA ASSOCIADO AO eCG (400 VERSUS 500UI) E AO hCG (1000UI) EM FÊMEAS BUBALINAS, NA ESTAÇÃO REPRODUTIVA DESFAVORÁVEL	56
3.7	EXPERIMENTO 5: TAXAS DE CONCEPÇÃO DE FÊMEAS BUBALINAS SUBMETIDAS À SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO PARA IATF COM DISPOSITIVO INTRAVAGINAL DE PROGESTERONA ASSOCIADO A DIFERENTES DOSES DE eCG (400 VERSUS 500UI) E AO hCG (1000UI), NA ESTAÇÃO REPRODUTIVA DESFAVORÁVEL	59
3.8	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA	61

4	RESULTADOS	63
4.1	EXPERIMENTO 1: DINÂMICA FOLICULAR DURANTE O TRATAMENTO PARA SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO COM DISPOSITIVO INTRAVAGINAL DE PROGESTERONA ASSOCIADO OU NÃO AO eCG (0 VERSUS 500UI) E AO hCG (1500UI) EM FÊMEAS BUBALINAS EM FÊMEAS BUBALINAS, NA ESTAÇÃO REPRODUTIVA DESFAVORÁVEL	64
4.2	EXPERIMENTO 2: DINÂMICA FOLICULAR DURANTE O TRATAMENTO PARA SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO COM DISPOSITIVO INTRAVAGINAL DE PROGESTERONA ASSOCIADO AO eCG (500UI) E AO hCG (1000 VERSUS 1500UI) EM FÊMEAS BUBALINAS, NA ESTAÇÃO REPRODUTIVA DESFAVORÁVEL	67
4.3	EXPERIMENTO 3: TAXAS DE CONCEPÇÃO DE FÊMEAS BUBALINAS SUBMETIDAS À SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO PARA IATF COM DISPOSITIVO INTRAVAGINAL DE PROGESTERONA ASSOCIADO AO eCG (500UI) E A DIFERENTES DOSES DE hCG (1000 VERSUS 1500UI), NA ESTAÇÃO REPRODUTIVA DESFAVORÁVEL	70
4.4	EXPERIMENTO 4: DINÂMICA FOLICULAR DURANTE O TRATAMENTO PARA SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO COM DISPOSITIVO INTRAVAGINAL DE PROGESTERONA ASSOCIADO AO eCG (400 VERSUS 500UI) E AO hCG (1000UI) EM FÊMEAS BUBALINAS, NA ESTAÇÃO REPRODUTIVA DESFAVORÁVEL	71
4.5	EXPERIMENTO 5: TAXAS DE CONCEPÇÃO DE FÊMEAS BUBALINAS SUBMETIDAS À SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO PARA IATF COM DISPOSITIVO INTRAVAGINAL DE PROGESTERONA ASSOCIADO A DIFERENTES DOSES DE eCG (400 VERSUS 500UI) E AO hCG (1000UI), NA ESTAÇÃO REPRODUTIVA DESFAVORÁVEL	74
5	DISCUSSÃO	75
6	CONCLUSÕES	84
	REFERÊNCIAS	86

1 INTRODUÇÃO

O crescente interesse dos criadores, aliado ao aumento dos rebanhos, têm feito com que a espécie bubalina venha se tornando uma fonte viável de produção de proteínas de origem animal em nosso país. Isto porque o búfalo é comprovadamente um animal de fácil adaptação a diferentes regiões do mundo (BARUSELLI, 1994b). A população bubalina mundial praticamente dobrou nos últimos 40 anos, e atualmente é estimada em aproximadamente 170 milhões de cabeças, das quais 100 milhões encontram-se na Índia (*Food and Agricultural Organization* - FAO -, 2004). No Brasil, estima-se que o rebanho bubalino seja constituído por aproximadamente 1,3 milhões de animais. Essa população aumentou 1905% nos últimos 40 anos (FAO, 2004), o que demonstra a adaptabilidade da espécie às nossas condições e as possibilidades futuras da bubalinocultura como atividade emergente no país.

A eficiência da espécie em nosso meio tem sido demonstrada por diversos grupos de pesquisa e, em diferentes sistemas de criação, o búfalo tem apresentado ótimo desempenho (BARUSELLI, 1992; VILLARES, 1994), não somente como produtor de leite - que pode atingir teores de até 11% de gordura -, mas também como produtor de carne - cuja aceitação pelo mercado vem aumentando. Além disso, como ressalta Vale (1988), em locais em que a agricultura ressenete-se da falta de equipamentos mecanizados, os búfalos também podem ser utilizados como força de trabalho.

Berber, Silva e Cardoso (2002) mencionam outra importante contribuição da espécie, que é a produção de esterco destinado à recuperação de solos fracos, aumentando a produção agrícola. Esses animais também produzem couro de alta qualidade e resistência que pode ser utilizado, inclusive, como isolante de componentes eletrônicos e na confecção de artigos de luxo.

Porém, para que os índices produtivos sejam satisfatórios, os animais devem apresentar boa eficiência reprodutiva (BARUSELLI, 1994b). Dentre os fatores que interferem na eficiência reprodutiva da espécie, a detecção do estro é o que mais se destaca, devido à descrição da sintomatologia e à necessidade de pessoal capacitado para executar essa tarefa (BARUSELLI, 1994a; BARUSELLI et al., 1997; OHASHI, 1994; RAO; RAO; VENKATARAMAIAH, 1995; ZICARELLI et al., 1997a). Assim, o uso de biotecnologias reprodutivas, como a inseminação artificial (IA) e a transferência de embriões (TE), torna-se limitado devido às citadas dificuldades e às características comportamentais da espécie (MOIOLI et al., 1998).

Uma outra característica apresentada pela espécie é a estacionalidade reprodutiva. Em localidades distantes da linha do equador, o comportamento reprodutivo dos búfalos é influenciado positivamente pela diminuição das horas de luz do dia. Assim, e de acordo com Zicarelli (1994), pode-se dizer que os búfalos são poliétricos estacionais de dias curtos.

Essa característica promove maior concentração das manifestações de estro durante o outono (BARUSELLI, 1994a; DANEV, 1997; ZICARELLI, 1994) e, em virtude da diminuição da produção em determinadas épocas do ano, causa transtornos consideráveis em propriedades destinadas à produção de leite (BARUSELLI; CARVALHO, 2003a).

A sincronização do estro, menciona Baruselli (1994a), pode facilitar o emprego da inseminação artificial e a introdução de material genético superior nos rebanhos bubalinos. Nesse sentido, Chauhan, Sharma e Singh (1985) e El-Belely et al. (1995) têm preconizado a utilização da prostaglandina e análogos para sincronizar o estro nesses animais. O emprego de agentes luteolíticos pode auxiliar na implementação da inseminação artificial ou da monta controlada (PORTO-FILHO,

2000), minimizando problemas com a detecção do estro (BARUSELLI, 1998; DIAZ; MIES FILHO, 1983).

Vários outros sistemas de sincronização do estro são utilizados com sucesso na espécie bubalina, mas esquemas que sincronizam a ovulação são considerados mais vantajosos pois diminuem a necessidade de mão-de-obra especializada para a detecção do estro e favorecem a utilização da inseminação artificial em tempo fixo - IATF - (BARUSELLI; CARVALHO, 2003b).

Em bovinos, numerosos protocolos farmacológicos têm sido investigados para sincronizar ovulações, porém somente alguns têm demonstrado resultados aceitáveis. A campo, as características desejáveis de um programa desse tipo devem incluir alta taxa de resposta ao tratamento hormonal - independentemente do estágio do ciclo estral em que o tratamento tenha início -, sincronização da ovulação, alta fertilidade da ovulação sincronizada e retorno ao estro com alta taxa de concepção nos serviços subseqüentes (HANLON et al., 1996).

No Brasil, há relatos de que a utilização da IATF em búfalas é prejudicada pela estacionalidade reprodutiva da espécie (BARTOLOMEU, 2003; BARUSELLI; CARVALHO, 2003a; MOURA, 2003; SINGH et al., 2004). Entretanto, desde 2001, a utilização de alguns protocolos - desenvolvidos com objetivo de minimizar a sazonalidade reprodutiva dos bubalinos - tem apresentado resultados satisfatórios, permitindo a realização da IATF mesmo durante a estação reprodutiva desfavorável (BARUSELLI et al., 2003a).

Mas há outros fatores envolvidos nas baixas taxas de concepção nas espécies bovina e bubalina, como a insuficiência luteínica - apontada por Binelli et al. (2001) e Singh, Khurana e Inderjeet (1998) como responsável pela morte embrionária precoce. Portanto, baixas concentrações plasmáticas de progesterona

(P4) estão diretamente ligadas a reduzidas taxas de prenhez após a utilização da inseminação artificial.

Dessa maneira, estratégias que possibilitem elevar as concentrações de P4 podem ser fundamentais para o desenvolvimento do conceito e para inibir a síntese de prostaglandina (PGF), que geralmente ocorre no chamado período crítico da gestação - 15 a 17 dias depois da IA (BINELLI et al., 2001).

Para aumentar a produtividade de carne e de leite, programas de melhoria genética, associados a biotecnologias da reprodução, devem ser implementados nos rebanhos bubalinos brasileiros. Porém, as características reprodutivas peculiares à espécie e a variabilidade dos resultados encontrados na literatura demandam novas pesquisas voltadas ao tema. Isto porque a utilização eficiente de biotecnologias - como a inseminação artificial durante todas as épocas do ano -, depende sobremaneira da maior compreensão dos fenômenos reprodutivos e dos aspectos comportamentais e fisiológicos peculiares à espécie.

Diante dessa realidade, o presente trabalho teve como objetivos:

- induzir o crescimento folicular e conseqüente ovulação em búfalas durante a estação reprodutiva desfavorável;
- comparar a resposta à administração de diferentes doses de Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG) e Gonadotrofina Coriônica Equina (eCG) associada a dispositivos intravaginais de progesterona em búfalas durante a estação reprodutiva desfavorável, avaliando os seguintes aspectos: dinâmica de crescimento folicular, ocorrência da ovulação, intervalo entre o tratamento e a ovulação, área do corpo lúteo, concentração plasmática de progesterona e taxa de prenhez após a IATF.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ESTACIONALIDADE REPRODUTIVA

Como mencionado no capítulo anterior, uma das principais características apresentada pela espécie bubalina é a estacionalidade das atividades reprodutivas. Em regiões distantes da linha do Equador - isto é, em localidades nas quais a duração das horas de luz diária durante o ano é mais variável -, o comportamento reprodutivo dos búfalos é influenciado pela diminuição das horas de luz do dia. Essa espécie animal pode ser caracterizada como poliéstrica estacional de dias curtos, semelhantemente aos ovinos e caprinos. Em decorrência dessa peculiaridade, observa-se maior concentração das manifestações de estro em búfalas durante o período de outono (BARUSELLI, 1994a; DANEV, 1997; ZICARELLI, 1994).

Segundo Singh, Nanda e Adams (2000), ainda não está totalmente esclarecido se o padrão sazonal reprodutivo da espécie bubalina é uma característica genética ou consequência de fatores ambientais. Entretanto, há evidências de que fatores biometeorológicos - amplitude do dia, temperatura ambiental, umidade relativa e pluviometria - exercem forte influência sobre o sistema endócrino dos búfalos (SHAH, 1988). Singh, Singh e Dhaliwal (1989), atribuem a diminuição da atividade reprodutiva dos búfalos ao aumento da temperatura ambiental, porém Razdan e Kaker (1980) associam essa diminuição ao aumento da extensão do dia.

De acordo com Zicarelli (1994), da mesma forma que ocorre em outras espécies, o hormônio responsável por sinalizar a alternância claro/escuro em búfalos é a melatonina. Para o autor, é a melatonina que controla o início ou o término da atividade cíclica na espécie. Os níveis plasmáticos de melatonina atingem altas

concentrações durante as horas de escuridão, particularmente no outono e no inverno.

El-Fouly, Korby e El-Sobhy (1976) e Obi-Reddy, Tripathi e Raina (1987), consideram que os dias curtos e as temperaturas frias são favoráveis ao aparecimento do estro em búfalas.

A concentração de partos conseqüente à estação reprodutiva da espécie faz com que a produção de leite durante o ano seja heterogênea (BARUSELLI; CARVALHO, 2003b; CATILLO et al., 2002). Além disso, e de acordo com Zicarelli (2003), falhas na concepção afetam diretamente a produção de leite porque o período de lactação das búfalas é menor que o dos bovinos, diminuindo ainda mais a quantidade de leite produzido em virtude do número de partos distribuídos durante o ano.

Trabalho desenvolvido na Itália por Zicarelli et al. (1997b) mostra que a colocação de novilhas – que são menos sensíveis ao fotoperíodo - em reprodução no período de primavera possibilita distribuição mais uniforme dos partos durante o ano.

A eficiência reprodutiva - um dos fatores que maior influência têm sobre a produtividade – em bubalinos pode ser prejudicada pela fraca expressão do estro no verão e pelo padrão reprodutivo estacional da espécie (MADAN, 1988; MADAN; DAS; PALTA, 1996). Conseqüentemente, a detecção do estro é uma das principais causas do fraco desempenho reprodutivo da maioria dos rebanhos nos quais são empregadas biotecnologias da reprodução – IA e TE -, principalmente na época reprodutiva desfavorável. Ohashi (1994) ressalta que, na espécie bubalina, as manifestações de estro pouco aparente, a baixa incidência de comportamento

homossexual e a grande variação na duração do estro são fatores limitantes para a obtenção de índices adequados de fertilidade.

2.2 SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO COM HORMÔNIO LIBERADOR DE GONADOTROFINAS (GnRH)/HORMÔNIO LUTEINIZANTE (LH) ASSOCIADOS A PROSTAGLANDINA PARA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO

Durante fase restrita do ciclo estral – diestro - a PGF provoca a regressão do corpo lúteo que, nesse período, torna-se responsivo a tal hormônio. A ação da PGF resulta em luteólise e queda dos níveis sanguíneos de progesterona. Esses eventos promovem as manifestações de estro, seguidas de ovulação dois a cinco dias após o tratamento (NEBEL; JOBST, 1998). A responsividade do corpo lúteo à PGF tem início no quinto dia do ciclo estral, aumenta até o 12º dia e permanece em fase de platô até o 17º dia, quando se inicia a regressão espontânea causada pela liberação endógena desse hormônio (LARSON; BALL, 1992; ODDE, 1990).

Também na espécie bubalina a utilização de PGF para a indução do estro tem sido objeto de estudo, tanto para melhorar a eficiência reprodutiva como para diminuir o intervalo entre os partos (CHAUHAN; SHARMA; SINGH, 1985; EL-BELELY et al., 1995).

O efeito do dia do tratamento com PGF sobre a resposta ao estro e a ovulação em bovinos independe do número de ondas foliculares por ciclo estral. Foi verificado que o folículo dominante, presente no momento do tratamento, torna-se ovulatório quando a luteólise é induzida durante sua fase de crescimento (DE RENSIS; PETERS, 1999; JACKSON et al., 1979; KASTELIC; KNOPF; GINTHER, 1990; MACMILLAN; HENDERSON, 1984; VIANA; FERREIRA; CAMARGO, 1999).

O mesmo foi constatado por Porto-Filho (2000) em búfalas. Esse autor verificou diferença significativa no intervalo entre a aplicação de PGF e a manifestação de estro ($40,7 \pm 10,9\text{h}$ versus $56,7 \pm 12,8\text{h}$; $P < 0,01$), e entre a aplicação desse hormônio e a ovulação ($70,0 \pm 11,3$ versus $85,6 \pm 12,5\text{h}$; $P < 0,01$), quando a PGF foi administrada em duas fases distintas do diestro - antes e depois do D-10. Tais resultados sugerem que, nos animais tratados no início do ciclo estral, provavelmente ocorreu a ovulação do folículo dominante da primeira onda, presente no momento da aplicação da PGF.

Entre as limitações da utilização da PGF estão a baixa taxa de sincronização do estro e da ovulação (TANABE; HANN, 1984). Em virtude desse comportamento, quando a indução do estro é realizada através da aplicação de PGF, é fundamental a observação do mesmo para realização da inseminação artificial, dificultando a implantação da IATF (BÓ et al., 2001; DRIANCOURT, 2000; KASTELIC et al., 1996).

Para minimizar essa baixa sincronização do estro, a PGF pode ser associada a outros fármacos. Nesse sentido, a utilização do hormônio liberador de gonadotrofinas tem sido amplamente pesquisada para controlar a dinâmica folicular em bovinos (BARROS et al., 1998; BARROS et al., 2000; LOPEZ-GATIUS; LOPEZ-BEJAR, 2002) e bubalinos (BARUSELLI et al., 1999).

O GnRH é um decapeptídeo gonadotrófico produzido e liberado pelo hipotálamo (HONLES, 2000), que induz a liberação de hormônio luteinizante pela adeno-hipófise (THATCHER et al., 2002; YAMADA et al., 2002).

O GnRH induz a ovulação ou a luteinização do maior folículo presente no momento do tratamento (MACMILLAN; THATCHER, 1991). Conseqüentemente, uma nova onda folicular é recrutada, aproximadamente dois dias mais tarde, e um

novo folículo dominante cresce por sete dias depois do tratamento, até se tornar capaz de ovular após a aplicação de PGF (THATCHER et al., 1993).

Macmillan, Segwagwe e Pino (2003) observaram que a utilização de GnRH aumentou a taxa de concepção em 8% em vacas normais, e em 22,5% em vacas consideradas repetidoras de cio. Segundo os autores, a emergência de uma nova onda de desenvolvimento folicular geralmente ocorre dentro de dois dias após a aplicação de GnRH somente em animais que possuam folículo dominante, o qual sofre ovulação e é luteinizado pelo LH.

O desenvolvimento de uma onda folicular fica inalterado se a aplicação do GnRH for realizada antes do estabelecimento da dominância folicular, lembram Ryan, Mihm e Roche (1998); além disso, os efeitos do GnRH sobre esse folículo e a emergência de uma nova onda de desenvolvimento folicular são dose-dependentes.

Twagiramungu, Guilbault e Dufour (1995) observaram que animais tratados com a associação de GnRH e PGF, com intervalo de seis dias entre as aplicações, não influenciou a taxa de prenhez em comparação ao grupo que recebeu apenas PGF. Tais autores comentam que o uso de um segundo tratamento com GnRH após a PGF, para assegurar a ovulação de um folículo dominante persistente, melhora a precisão do estro e permite a IATF sem efeitos adversos sobre as taxas de prenhez.

O esquema denominado *Ovsynch* compreende duas aplicações de GnRH com a administração de uma dose de PGF entre elas foi utilizado para a IATF por Seguin (1997) e Wiltbank (1997), sem a necessidade de observação do estro. Essa técnica promove a concentração das ovulações em um período de 8 a 12 horas, e permite a realização da inseminação entre 16 e 24 horas após a segunda aplicação do GnRH (BARROS, 2000).

Ainda de acordo com Seguin (1997) e Wiltbank (1997), a primeira aplicação de GnRH tem como objetivo induzir a liberação de LH e a ovulação ou luteinização, do folículo dominante, e resulta na emergência de uma nova onda folicular dois dias depois de ser implementada; a administração de PGF sete dias após a primeira aplicação de GnRH tem a função de promover a luteólise do CL originado, e a segunda aplicação de GnRH promove a ovulação sincronizada de um novo folículo dominante, induzido pelo GnRH; a IATF é realizada 24 horas após a segunda aplicação de GnRH.

O intervalo de sete dias entre a primeira aplicação de GnRH e a PGF é suficiente para o desenvolvimento de um novo folículo dominante (GAMBINI et al., 1998) e para a maturação do corpo lúteo, favorecendo resposta positiva à administração da PGF (BARROS, 2000).

No estudo realizado por Wiltbank (1997), os animais que receberam a segunda aplicação de GnRH apresentaram taxa ovulatória de 97%, contra 77% daqueles que não a receberam. O autor observou, ainda, que folículos de 9,0 a 10,0mm de diâmetro e na fase de crescimento ovularam mesmo na presença de corpo lúteo funcional, com altos níveis de progesterona, e que os folículos não ovulados sofreram luteinização.

Castilho et al. (2000), que empregaram o protocolo *Ovsynch* em novilhas girolandas, verificaram que 50% das fêmeas ovularam após a primeira aplicação de GnRH (buserelina). Para esses autores, o GnRH é capaz de induzir a ovulação em 100% dos folículos em crescimento e em 33% dos folículos em fase de platô; já os folículos atrésicos não ovulam.

A gonadorelina e a buserelina - análogos ao GnRH - produzem efeitos diferenciados na indução da ovulação do folículo dominante formado após a primeira

aplicação de GnRH. Isto porque, como postulam Macmillan, Segwagwe e Pino (2003), a buserelina é 40 a 200 vezes mais potente que a gonadorelina.

Avaliando os efeitos de vários análogos ao GnRH, Chenault et al. (1990) concluíram que o acetato de fertirelina promoveu aumento nas concentrações de LH e do hormônio folículo estimulante (FSH) quando administrado nas concentrações de 25 a 200µg. A buserelina é 10 a 20 vezes mais potente que o acetato de fertirelina, e a resposta observada nas concentrações de LH e FSH após a aplicação de 20µg de buserelina foi maior que aquelas obtidas com quaisquer doses de acetato de fertirelina e gonadorelina.

Pursley, Mee e Wiltbank (1995) comentam que a primeira aplicação de GnRH do protocolo *Ovsynch* apresenta melhor eficiência na taxa de ovulação em vacas lactantes (85%) do que em novilhas (54%).

A taxa de concepção em vacas inseminadas artificialmente pelo protocolo *Ovsynch* é bastante variável (26 a 55%; PURSLEY; MEE; WILTBANK, 1995; PURSLEY et al., 1997; VASCONCELOS, 1998), e os resultados obtidos sofrem a influência do período pós-parto no qual a técnica é empregada (PURSLEY; KOSOROK; WILTBANK, 1997).

Outro fator que pode interferir na resposta ao protocolo *Ovsynch* é a fase do ciclo estral na qual ele é iniciado. Segundo Vasconcelos (2000), vacas nas quais o tratamento teve início na primeira metade do ciclo estral (D-1 a D-12) apresentaram maior taxa de ovulação (91%) do que aquelas tratadas na segunda metade do ciclo estral (>D-12, 80%). No mesmo experimento, a taxa de sincronização não sofreu influência da fase do ciclo estral na qual o tratamento foi iniciado, mas foi influenciada pela resposta à primeira aplicação de GnRH (92% na presença de

ovulação versus 79% na ausência de ovulação; $P < 0,01$). A taxa de sincronização após a segunda aplicação de GnRH foi de 87%.

Nesse contexto, Thatcher et al. (2002) citam que, quando o programa é iniciado entre os dias 13 e 17 do ciclo estral, pode ocorrer regressão espontânea do corpo lúteo antes da aplicação da PGF, com conseqüente antecipação da ovulação. E comentam que tratamentos realizados no início do ciclo estral podem apresentar taxa de concepção reduzida porque, nessa fase, há predominância de pequenos folículos incapazes de sofrer a ação da primeira aplicação de GnRH, o que resulta em folículos que exercem dominância por período prolongado.

Baruselli et al. (1999) observaram que a taxa de ovulação à primeira aplicação de um análogo ao GnRH - acetato de buserelina - foi melhor em búfalas que receberam 20 μ g (70,5%) do que naquelas que receberam 10 μ g (50%). No mesmo experimento, os autores observaram tempo médio de ovulação de $33,0 \pm 8,3$ horas após a primeira aplicação de GnRH, e de $32,0 \pm 5,7$ horas após a segunda aplicação desse hormônio. Os animais que não ovularam à primeira aplicação de GnRH apresentaram intervalo mais curto entre a segunda aplicação desse hormônio e a ovulação do que aqueles que ovularam ($22,2 \pm 10,4$ vs $33,9 \pm 4,9$ horas). Dos 33 animais avaliados, 25 (75,8%) apresentaram ovulações sincronizadas, 6 (18,2%) ovularam entre a aplicação de PGF e a segunda dose de GnRH, e 2 (6,0%) não apresentaram ovulações.

A comparação entre a ação de dois agonistas do GnRH - buserelina e lecirelina - em búfalas durante época reprodutiva favorável não revelou diferença significativa: o grupo que recebeu buserelina apresentou taxa de concepção de 47% (62/132), e o grupo que recebeu lecirelina apresentou taxa de concepção de 50% (69/138), informam Baruselli et al. (2001).

Na espécie bubalina, Baruselli et al. (1999) e Berber, Baruselli e Madureira (2001) constataram que o diâmetro do folículo dominante foi maior para os que ovularam em comparação com aqueles folículos que não ovularam, indicando que folículos com maior diâmetro apresentam maior capacidade ovulatória.

Ainda na espécie bubalina, Baruselli et al. (1999) e Berber, Baruselli e Madureira (2001) constataram que as fêmeas que ovularam apresentavam maior diâmetro de folículo dominante que aquelas que não ovularam. Tais achados indicam que folículos com maior diâmetro apresentam maior capacidade ovulatória.

Berber, Madureira e Baruselli (2002), não observaram diferença significativa entre a administração de GnRH e LH na última aplicação do esquema *Ovsynch* em fêmeas bubalinas durante época reprodutiva favorável. O grupo que recebeu 10µg de GnRH - acetato de buserelina; n=154 - apresentou taxa de concepção de 56,5%, e o grupo que recebeu aplicação de 12,5mg de LH - n=151 - apresentou taxa de concepção de 64,2%.

Em publicação datada de 1998, Baruselli (1998) relata que a utilização do protocolo *Ovsynch* em búfalas proporcionou grande concentração de ovulações (82,3%) em um intervalo de 12 horas.

Investigação realizada por Ribeiro Filho et al. (2003) revelou que búfalas com escore corporal $\leq 2,5$ apresentaram taxa de prenhez de 20% (4/20), significativamente menor ($P < 0,05$) que aquela de animais que apresentavam escore corporal $> 2,5$ (40%; 9/22). Também Baruselli e Carvalho (2003a), que trabalharam com 967 búfalas durante período reprodutivo favorável à espécie chegaram a essa constatação, pois encontraram diferença significativa entre a taxa de concepção de búfalas com escore corporal $\leq 3,0$ (31,4%) e aquela de animais com escore corporal $\geq 3,5$ (54,0%).

Bartolomeu et al. (2001) obtiveram taxa de concepção de 55,6% (10/18) em búfalas sincronizadas com o protocolo *Ovsynch* durante a estação reprodutiva favorável à espécie. Esse resultado é superior àquele relatado por Silva et al. (2003), que verificaram taxa de prenhez de 31,8% (7/22) com a utilização do mesmo protocolo.

Alguns pesquisadores têm utilizado o protocolo *Ovsynch* associado a dispositivos de liberação de progesterona. Wiltbank, Gumen e Sartori (2002) implantaram um dispositivo intra-vaginal de liberação de progesterona juntamente com a primeira aplicação de GnRH em vacas, mantendo-o por sete dias. A retirada do implante coincidiu com a aplicação de PGF, e a segunda aplicação de GnRH foi feita normalmente em ambos os grupos. As fêmeas submetidas ao protocolo tradicional apresentaram taxa de concepção de 55,2%, e aquelas que receberam a associação com progesterona tiveram taxa de concepção de 34,7%.

Uma outra variação do protocolo *Ovsynch* encontrada na literatura é a substituição da última aplicação de GnRH por estrógeno - cipionato de estradiol (ECP) -, com o objetivo de reduzir custos. Na presença de baixas concentrações de progesterona, o ECP induz o pico de LH pela estimulação do GnRH (BÓ et al., 1995; THATCHER et al., 2002) e/ou pela estimulação direta das células secretoras de LH na adeno-hipófise (NETT et al., 2002). Segundo Wiltbank e Haughian (2003), as taxas de concepção desse protocolo têm sido semelhantes àsquelas obtidas com o *Ovsynch* tradicional, e cerca de 75% das fêmeas apresentam cio depois do tratamento.

O uso do ECP em substituição ao GnRH para induzir a ovulação é uma alternativa viável: o aumento do tônus uterino - que facilita a realização da inseminação artificial - e a ocorrência do estro - que acontece após a administração

do hormônio - aumentam a sua aceitação, inclusive pelos inseminadores (THATCHER et al., 2002).

Entretanto, a utilização desse protocolo deve ser vista com maior reserva, pois os tratamentos com estrógenos implicam consequências potenciais, como a atresia folicular induzida. Assim, investigações mais detalhadas sobre o assunto devem ser realizadas (WILTBANK; HAUGHIAN, 2003).

Baruselli et al. (2003b) aplicaram GnRH sete dias antes do início do protocolo *Ovsynch* em um grupo de fêmeas bubalinas, e não observaram diferença significativa entre a taxa de ovulação destas e a dos animais que não foram objeto dessa aplicação (88% versus 87,5%). Já a taxa de concepção foi significativamente influenciada pelo tratamento (56% versus 39,5%, $P < 0,01$).

Ao compararem as taxas de concepção de búfalas submetidas ao protocolo *Ovsynch* em diferentes períodos do ano, Baruselli, Madureira e Marques (2001) verificaram diferenças significativas. O índice de prenhez foi maior nos animais tratados no período reprodutivo favorável - outono/inverno; 48,8%; $n=967$ - do que naqueles submetidos ao programa em época desfavorável - primavera; 6,9%; $n=86$. Tais achados sugerem que, mesmo após estimulação hormonal exógena, os bubalinos apresentam marcada estacionalidade reprodutiva.

Moura (2003), que utilizou o protocolo *Ovsynch* em búfalas durante período reprodutivo desfavorável, encontrou taxa de prenhez de 10,3% (3/29).

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

As limitações para a detecção do estro têm estimulado os pesquisadores a empregarem drogas para induzi-lo em períodos pré-determinados. Em geral, os dois sistemas mais utilizados para encurtar ou prolongar a fase luteínica do ciclo estral são os agentes luteolíticos e as drogas à base de progesterona. Tais métodos, embora adequados para programar o estro, são ineficientes para promover altas taxas de concepção à inseminação artificial (PORRAS; GALINA, 1992).

Nesse sentido, várias estratégias têm sido desenvolvidas para viabilizar ainda mais a IA. Essas novas metodologias envolvem a utilização de protocolos hormonais para sincronizar não somente o estro, mas também a onda folicular.

Assim, diferentes investigações sobre a eficácia da associação entre estrógenos - estradiol 17β (E- 17β), valerato de estradiol (VE) e benzoato de estradiol (BE) - e progesterona ou progestágenos em bovinos foram implementadas (BÓ et al., 1994a; BÓ et al., 1995; BÓ et al., 1996).

Segundo López-Gatius (2000), o uso de estrógeno em vacas pode induzir concentração máxima de LH - pico pré-ovulatório -, ovulação e exercer atividade luteolítica durante a fase luteal.

O estrógeno, quando associado a progesterona ou progestágeno, promove o crescimento sincronizado de uma nova onda folicular cerca de 4 a 5 dias após a sua aplicação, independentemente do estágio do ciclo estral no qual o tratamento é iniciado (BÓ et al., 1995; ROCHA, 2000).

Gordon (1976) e Wishart (1972) comentam que tratamentos com progestágenos por períodos prolongados sincronizam o estro com boa precisão,

mas ressaltam que as inseminações artificiais realizadas após esse estro sincronizado resultam em baixas taxas de prenhez.

O uso de progestágenos na manutenção da gestação e na inibição do ciclo estral se iniciou a partir da síntese do acetato de melengestrol (MGA), em 1962. A administração do MGA associado à alimentação foi uma prática muito utilizada para o controle do estro e da ovulação, porém logo foram verificadas dificuldades quanto à uniformidade no consumo desse progestágeno pelos animais tratados, o que fez com que tal protocolo caísse em desuso (BARUSELLI; MADUREIRA; MARQUES, 2001).

Vários produtos sincronizadores do estro e da ovulação estão disponíveis no mercado. Alguns são constituídos por progestágenos – norgestomet - associados ao valerato de estradiol - CRESTAR[®] e SYNCROMATE B[®] -, e são apresentados sob a forma de implantes subcutâneos (WILTBANK; GONZALEZ-PADILLA, 1975). Outros, à base de progesterona associada ou não ao estrógeno - *Controlled Internal Drug Release* (CIDR[®], CIDR-B[®]) e *Progesterone Releasing Intravaginal Device* (PRID[®]) -, constituem-se em dispositivos a serem posicionados na vagina (MACMILLAN; PETERSON, 1993). Recentemente, mais dois dispositivos intravaginais de liberação de P4 foram lançados: o *Bovine Intravaginal Device* (BID[®]) e o Cronipress[®].

Porém, de acordo com Driancourt (2000), protocolos eficientes para sincronizar a ovulação devem induzir a atresia de folículos grandes presentes nos ovários - seja qual for seu estágio de desenvolvimento -, proporcionando recrutamento de nova onda de crescimento folicular, desenvolvimento sincronizado de um novo folículo dominante em todas as fêmeas e ovulação em horário previsível.

O uso de estrógenos como agentes luteolíticos em conjunto com progestágenos foi inicialmente investigado por Wiltbank, Zimmerman e Ingalls (1965). Segundo Wishart e Youngg (1974), enquanto o estradiol é utilizado como agente luteolítico, o progestágeno é empregado para inibir o desenvolvimento do corpo lúteo em fêmeas que ovularam recentemente, ou para prevenir a ovulação se o tratamento for iniciado no final do ciclo estral.

Driancourt (2000), Pratt et al. (1991) e Wiltbank et al. (1996) comentam que o valerato de estradiol não é capaz de promover luteólise nos primeiros cinco dias do ciclo estral.

Sirois e Fortune (1990) observaram que os progestágenos também podem atuar sobre os folículos dominantes, mas Rajamahendran e Taylor (1991) não verificaram qualquer efeito do progestágeno sobre o curso normal da dinâmica folicular durante o diestro. Esses autores constataram que o folículo dominante permaneceu enquanto durou o tratamento quando este foi realizado no pró-estro e, conseqüentemente, não houve crescimento de folículos pequenos ou médios.

De modo geral, quando aplicado na presença de folículos FSH-dependentes, o estradiol provoca a atresia destes pois promove redução das concentrações de FSH - *feed-back* negativo. Quando os níveis de estradiol retornam a valores basais, ocorre a emergência de nova onda de crescimento folicular em virtude do novo aumento de FSH (BÓ et al., 1994a; BÓ et al., 1995). Já quando aplicado na presença de folículos LH-dependentes, o estradiol não induz a atresia folicular mas previne a emergência de nova onda de crescimento folicular até que tenha voltado a níveis basais. Sendo assim, o estradiol - que causa atresia de folículos FSH-dependentes - pode ser utilizado com maior sucesso em combinação com

progestágenos - que induzem atresia de folículos LH-dependentes (DRIANCOURT, 2000).

A duração da supressão das gonadotrofinas também pode ser afetada pela concentração e pelo tipo de estradiol utilizado, pela concentração de progesterona e por características individuais entre animais que se encontram em diferentes estágios reprodutivos (MACMILLAN; SEGWAGWE; PINO, 2003).

Ao compararem a administração de E-17 β (5mg) em novilhas de corte que haviam ou não recebido implante auricular de progestágeno - Syncromate B[®] (SMB[®]) - , Bó et al. (1994b) verificaram, em ambos os grupos, aumento sérico na concentração de estradiol 6 horas após a aplicação do E-17 β , e concentração máxima de LH entre 18 e 24 horas apenas nas fêmeas que não tinham recebido implante de progestágeno.

Lane et al. (2001) sincronizaram novilhas de corte de tal maneira que, no momento da aplicação do dispositivo intravaginal de liberação de progesterona – associado ao não a BE -, as fêmeas se encontravam em fases de emergência de nova onda folicular ou de dominância folicular. Não houve diferença entre os dois grupos com relação à manifestação de estro, mas as novilhas às quais foi administrado BE - independentemente da fase folicular em que se encontravam no início do tratamento - apresentaram menor intervalo entre a retirada do dispositivo e o início do estro (43 versus 59h, $P<0,05$). No grupo que estava em fase de dominância folicular no início do tratamento, as fêmeas que receberam o BE apresentaram maior taxa de prenhez (84%) que aquelas que não o receberam (65%, $P<0,05$).

Para Odde (1990), após a utilização do Syncromate B[®] as taxas de indução do estro podem variar de 77 a 100%, enquanto os índices de concepção podem

oscilar entre 33 e 68%; já Kesler e Favero (1996) apontam taxas de concepção entre 14 e 60% após o uso do SMB. Essas taxas são influenciadas pelo dia do ciclo estral em que o tratamento é iniciado (ODDE, 1990), e pela condição corporal dos animais (DUNN; KALTERBACH, 1980).

Ao compararem a utilização de CIDR[®] + E-17 β , de CIDR[®] exclusivamente, e de duas aplicações de PGF em intervalo de 11 dias em novilhas de corte, Bó et al. (1994a) obtiveram os seguintes resultados: 75% das novilhas do grupo CIDR[®] + E-17 β ovularam entre 72 e 84 horas após a retirada do implante; as novilhas que receberam somente o CIDR[®] apresentaram taxa de ovulação de 33%; as novilhas que receberam PGF atingiram índice de ovulação de 40% - estes dois últimos grupos também entre 72 e 84 horas após a retirada do implante.

Tribulo et al. (1995) observaram maior concentração de estros (93%) 48 horas após a retirada do CIDR[®] no grupo de animais que recebeu esse dispositivo associado ao E-17 β do que no grupo que recebeu apenas o CIDR[®] (80%) e naquele que recebeu somente uma aplicação de PGF (72%).

De 750 novilhas tratadas apenas com CIDR-B[®], 90,5% exibiram estro 48 a 72 horas após a remoção do dispositivo, enquanto que, em fêmeas que receberam BE (0,5mg) um dia depois da remoção do CIDR-B[®], 96,1% ($P < 0,05$) manifestaram estro (HANLON et al., 1996).

Em publicação datada de 1998, Rivera et al. (1998) relatam que vacas em anestro pós-parto que receberam CIDR[®] + E-17 β apresentaram menor dispersão na emergência de uma nova onda de desenvolvimento folicular e maior sincronia no crescimento folicular que aquelas que receberam somente o dispositivo intravaginal de progesterona.

Ao compararem a utilização de CIDR[®] e PRID[®] em novilhas, Broadbent et al. (1993) observaram 92,5 e 91,5% de manifestações de estro, com intervalos médios entre a retirada do dispositivo intravaginal e o início do estro de 50,4 e 55,5 horas, respectivamente.

MacMillan (1999) comparou a utilização de CIDR[®] por 7 (G1) ou 8 (G2) dias, associado a BE no D-0 - inserção do dispositivo -, PGF no momento da retirada deste e BE 48 horas após a aplicação de PGF. Houve maior concentração de estros um dia depois do tratamento no G2 (97,5%), e dois dias depois do tratamento no G1 (80,3%). As taxas de concepção dos dois grupos foram semelhantes (45,2% no G1 versus 47,4% no G2).

Para verificar qual o melhor momento para a aplicação do agente luteolítico associado ao CIDR[®] + BE, Sá Filho et al. (2003) dividiram 35 novilhas de corte em dois grupos. O grupo 1 (G1) recebeu o agente luteolítico no D-7 - D-0 = inserção do dispositivo intravaginal - e o grupo 2 (G2) recebeu o luteolítico no D-9, juntamente com a retirada do dispositivo intravaginal. O G1 apresentou tendência ($P=0,13$) a maior taxa de concepção na IATF (64,7%, 11/17) do que o G2 (38,9%, 7/18). Para os autores, esse fato poderia ser decorrente da manutenção de uma única fonte de progesterona nos animais tratados no D-7 – o que faria com que os níveis de P4 fossem mantidos a níveis subluteais, aumentando a pulsatilidade do LH, promovendo a manutenção e crescimento do folículo dominante, aumentando seu diâmetro e, conseqüentemente, favorecendo a formação de um CL com maior diâmetro.

Também Utt, Jousan e Beal (2003) constataram quadro semelhante. Esses autores compararam a administração do agente luteolítico no momento da inserção do dispositivo intravaginal e 24h antes da retirada deste em um grupo (G1), e

somente 24h antes da retirada do dispositivo em outro grupo (G2) de vacas de corte. As fêmeas do G1 apresentaram maior taxa de crescimento do folículo dominante do que as do G2 (1,5 versus 1,2mm/dia; $P<0,05$).

Já Duarte, Cavalheiro e Valentim (1999) utilizaram o protocolo CRESTAR[®] em vacas Nelore lactantes, e obtiveram taxa de prenhez de 60% (30/50).

Na Índia, búfalas sincronizadas durante a estação reprodutiva favorável à espécie com dispositivos à base de progestágeno apresentaram estro entre 25 e 72 horas após a remoção dos mesmos, e índice de prenhez de 43,7% (21/48) com dupla inseminação - 48 a 72 horas após o tratamento – (RAO; RAO, 1979). Em contrapartida, Pargaonkar, Bakshi e Joshi (1988) obtiveram 100% de estros ovulatórios em búfalas após a retirada do dispositivo.

Utilizando PRID[®] em 150 búfalas em período reprodutivo favorável, Rao e Kodagali (1983) obtiveram 93,3% (140/150) de estro em intervalo de 78 ± 8 horas após a retirada do dispositivo. Nesse mesmo experimento, 40,7% (61/150) das fêmeas se tornaram gestantes após a realização de dupla IA, 48 e 72 horas após a retirada do dispositivo .

Bodhipaksha, Chantaraprteep e Usanakornkl (1994) observaram a mesma taxa de concepção (40%) em 40 búfalas tratadas com PRID[®] e submetidas à monta natural ou à IA. Resultados inferiores foram encontrados por Rajamahendran e Thamothearam (1983) em búfalas tratadas com PRID[®] por 12 dias no período pós-parto (30 dias): as taxas de concepção foram de 26% com cobertura natural e de 33,3% com dupla IATF (60 e 84h).

A comparação entre o emprego de CIDR[®] + BE e de CRESTAR[®] em búfalas no período reprodutivo favorável revelou diferenças significativas quanto ao período para início de uma nova onda de desenvolvimento folicular ($5,5 \pm 0,24$ dias versus

8,7 $\pm$ 0,27 dias), ao intervalo entre a retirada do implante e a manifestação do estro (42,2 $\pm$ 7,9h versus 117,4 $\pm$ 31,2h) e ao diâmetro máximo do folículo ovulatório (1,06 $\pm$ 0,07cm versus 0,56 $\pm$ 0,06cm), comenta Bartolomeu (2003). Em outro experimento, constante da mesma publicação, o autor observou taxa de concepção significativamente menor com a associação de CIDR[®] + BE (22,8%), que aquela obtida com o protocolo *Ovsynch* (55,55%).

Moura (2003) comparou diferentes concentrações de BE (1,0mg=G1; 2,5mg=G2; e 5mg=G3) associadas ao CIDR[®] em búfalas tratadas no período reprodutivo favorável. O intervalo entre a retirada do dispositivo e o início de uma nova onda de desenvolvimento folicular foi significativamente maior para o G3 (6,8 $\pm$ 0,7 dias) do que para o G1 e o G2 (5,8 $\pm$ 0,8 dias e 6,1 $\pm$ 0,7 dias, respectivamente). O diâmetro máximo do folículo ovulatório foi de 0,89 $\pm$ 0,27cm, 0,96 $\pm$ 0,26cm e 1,11 $\pm$ 0,28cm, respectivamente, para os grupos 1, 2 e 3. O intervalo entre a retirada do CIDR[®] e a ovulação foi de 79,3 $\pm$ 16,5h para o G1, de 68,7 $\pm$ 24,6h para o G2 e de 66,7 $\pm$ 16,5h para o G3. Todos os grupos apresentaram taxa de ovulação de 37,5%.

Baruselli et al. (2003a) observaram taxa de concepção de 57,5% (61/106) ao utilizarem CIDR[®] associado ao protocolo *Ovsynch* em búfalas. Esse resultado não diferiu significativamente daquele verificado em fêmeas que receberam somente o protocolo *Ovsynch* (55,4%, 33/65).

Quando as búfalas são tratadas no período de anestro sazonal, os resultados ainda menos consistentes. Andurkar et al. (1997) realizaram uma série de experimentos nos quais utilizaram CIDR[®] por 12 dias + 0,25mg de PGF, CIDR[®] por 8 dias + BE + 0,25mg de PGF, e CIDR[®] por 12 dias, e constataram os seguintes

percentuais de búfalas que apresentaram estro: 85,71, 50,0, e 71,42%, respectivamente.

Singh et al. (1984) trataram búfalas em anestro com PRID[®] + GnRH (G1) e GnRH (G2), e obtiveram índices de ovulação de 43% (G1) e 11% (G2), e de concepção de 14% (G1) e 0% (G2). As búfalas do grupo controle (sem tratamento) não ovularam.

Já El-Belely et al. (1987) citam que o uso do PRID[®] proporcionou manifestações de estro em 80% (16) das 20 búfalas em anestro por eles avaliadas. Tratamento semelhante implementado por Pargaonkar, Bakshi e Joshi (1990) em nove búfalas com histórico de anestro promoveu estro em sete animais 29 horas após a remoção do implante. Luthra, Khar e Singh (1994) observaram estro 24 e 36 horas após a remoção do implante em 6/10 búfalas (86%), das quais 43% tornaram-se prenhes.

No Paquistão, Shah, Willense e Van de Wiel (1987) utilizaram SMB em búfalas no período de anestro sazonal, e obtiveram taxa de prenhez de 40%.

Também na espécie bubalina, Markandeya e Bharkad (2002) verificaram que tanto novilhas (n=6) como vacas (n=6) em anestro apresentaram 100% de estro comportamental após a utilização do protocolo CRESTAR[®].

Comparando a utilização de CIDR[®] + BE (D0) + PGF (D9; G1) e de CRESTAR[®] (G2) no período reprodutivo desfavorável em búfalas, Bartolomeu (2003) encontrou taxa de ovulação de 40% para as fêmeas do G1 e de 20% para as do G2. Nesse mesmo experimento, o intervalo decorrido para o início de uma nova onda folicular foi, em média, de $3,5 \pm 0,4$ dias e de $6,3 \pm 0,2$ dias para os grupos 1 e 2, respectivamente. O diâmetro máximo do folículo dominante da nova onda de crescimento folicular foi de $0,99 \pm 0,29$ cm (G1) e de $0,92 \pm 0,28$ cm (G2; $P > 0,05$). O

intervalo entre a retirada do dispositivo de liberação de P4 e a ovulação foi de 62,00 $\pm$ 5,6h para o G1 e de 64h para o G2.

Segundo Moura (2003), búfalas que receberam 1,0mg de BE associado ao CIDR[®] na estação reprodutiva desfavorável não ovularam; aquelas que receberam 2,5mg e 5,0mg de BE, também na estação reprodutiva desfavorável, apresentaram reduzidas taxas de ovulação (20%). O diâmetro máximo do folículo ovulatório foi, em média, de 1,03 $\pm$ 0,05cm para o grupo que recebeu 1,0mg de BE (G1; n=5), de 1,16 $\pm$ 0,31cm para as fêmeas que receberam 2,5mg de BE (G2; n=5), e de 0,92 $\pm$ 0,16cm para aquelas que receberam 5,0mg de BE (G3; n=5). O intervalo entre a retirada do CIDR[®] e a ovulação foi de 72h (1/5) no G2 e de 40h (1/5) no G3).

Em outro experimento, também realizado na estação reprodutiva desfavorável e constante da mesma publicação, Moura (2003) administrou 0,5 (G1) e 1,0mg (G2) de BE 24 horas após a retirada do CIDR[®]: as taxas de prenhez foram de 6,7% (G1; 2/30) e de 10,0% (G2; 3/30). O grupo controle (*Ovsynch*) também não apresentou resultados satisfatórios (10,3%; 3/29).

No entanto, em estudo posterior, Baruselli e Carvalho (2003a) verificaram que a associação de eCG no momento da retirada do dispositivo de liberação de P4, e de hCG - indutor da ovulação - 48 horas depois proporcionou melhor taxa de concepção (53,5%) que aquela obtida com o protocolo *Ovsynch* (28,2%) em búfalas tratadas na estação reprodutiva desfavorável.

2.4 USO DE GONADOTROFINA CORIÔNICA EQÜINA E DE GONADOTROFINA CORIÔNICA HUMANA ASSOCIADO A PROGESTERONA OU PROGESTÁGENOS NA SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO PARA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO

Apesar dos elevados índices de sincronização do estro e de ovulação alcançados com os diversos tratamentos existentes, nem sempre os resultados são traduzidos em prenhez (BARTOLOMEU, 2003). Rajamahendran e Thamothearam (1983) sugerem que as baixas taxas de prenhez obtidas com tratamentos à base de progesterona ou progestágenos podem ser decorrentes da assincronia entre os estros e o pico pré-ovulatório do LH e a ovulação, devido ao retardo na seleção do folículo ovulatório e ao estágio do ciclo estral no qual o tratamento é iniciado.

Além da baixa condição nutricional (BÓ et al., 2001), também as baixas concentrações plasmáticas de P4 têm sido citadas como possíveis causas das reduzidas taxas de prenhez (BINELLI et al., 2001).

Dessa maneira, estratégias que possibilitem elevar as concentrações de P4 podem ser fundamentais para o desenvolvimento do conceito e para inibir a síntese de PGF, que geralmente ocorre no chamado período crítico da gestação - 15 a 17 dias pós IA – (BINELLI et al., 2001). Nesse contexto, a gonadotrofina coriônica humana, que possui atividade biológica similar ao hormônio luteinizante, poderia ser utilizada (De Rensis; Peters, 1999). Isto porque o hCG permanece por um período maior na corrente sanguínea – de 1 a 1,3 dias -, e a sua dissociação dos receptores de LH ocorre de maneira gradual. Assim, sua administração pode promover ovulação e subsequente diferenciação das células da granulosa em células luteínicas grandes, responsáveis por 80% da síntese de progesterona do corpo lúteo (SCHMITT et al., 1996a).

López-Gatius (2000) cita que, em vacas e quando aplicado no início da fase luteal, o tratamento com hCG aumenta o tempo de vida do CL e a concentração de P4, induz a ovulação e promove a formação de CL acessório.

Segundo Baruselli e Carvalho (2003b), a utilização de hCG induz a ovulação sincronizada de folículos que tiveram desenvolvimento estimulado por outros mecanismos, como por exemplo o eCG.

O eCG possui meia-vida de aproximadamente 46 horas, e é a única gonadotrofina capaz de se ligar tanto aos receptores de FSH como aos de LH, isto é, possui atividade folículo estimulante e luteinizante (MURPHY; MARTINUK, 1991).

O eCG pode melhorar as concentrações de progesterona e, conseqüentemente, aumentar as taxas de prenhez, ressaltam Binelli et al. (2001). Ainda segundo os autores, o eCG pode aumentar a taxa de crescimento dos folículos, resultando em um folículo pré-ovulatório maior e, por conseqüência, em um CL maior ou, ainda, estimular o crescimento de vários folículos que poderiam ser induzidos a ovular e formar vários corpos lúteos.

Para Bó et al. (2001), a utilização de eCG tem proporcionado melhores porcentagens de prenhez em vacas em anestro pós-parto e com baixa condição nutricional.

Muitos dos relatos constantes da literatura indicam a utilização desses hormônios - hCG e eCG - para promover o aumento das concentrações plasmáticas de progesterona após a realização da IA, com o intuito de melhorar as taxas de concepção. Price e Webb (1989) administraram 1500UI de hCG em novilhas, e verificaram formação de corpo lúteo acessório entre os dias 4-6 e 14-16 do ciclo estral. De acordo com Sianangama e Rajamahendran (1996), a administração de

1000UI de hCG 7 ou 14 dias após a IA promove a ovulação do folículo dominante presente no momento da aplicação.

Schmitt et al. (1996b) constataram que 91% das fêmeas tratadas com hCG no 5º dia após a IA apresentaram formação de corpo lúteo acessório. Resultado semelhante foi encontrado por Sianangama e Rajamahendran (1996), os quais verificaram 100% de ovulação quando o hCG foi aplicado do D-7 do ciclo estral.

Vacas que receberam 1500UI de hCG no D-7 do ciclo estral apresentaram maior concentração plasmática de P4 entre os dias 13 e 17 do ciclo estral (MARQUES et al., 2002). Nesse mesmo experimento, os autores constataram que a fase luteal - número de dias com $P4 \geq 1,0\text{ng/ml}$ - também foi maior no grupo de vacas que recebeu o hCG.

Em publicação datada de 2000, Santos et al. comentam que 86,2% das vacas tratadas com hCG 5 dias após a IA apresentaram corpos lúteos acessórios. Os autores também observaram que a diferença nas concentrações de progesterona entre fêmeas tratadas ou não com hCG foi de +6,3ng/ml em primíparas, e de +3,1ng/ml em multíparas.

Marques et al. (2003) observaram aumento na concentração plasmática de P4, doze dias após a ovulação, em vacas de corte que receberam 400UI de eCG associado a dispositivos intravaginais de P4 para IATF ($8,1 \pm 0,9$), em relação àquelas que não receberam esse hormônio ($4,5 \pm 0,7\text{ng/ml}$; $P < 0,05$). Os resultados de Baruselli et al. (2004a) em novilhas corroboram tais achados. Animais tratados com 400UI de eCG (D-8) associado a dispositivos intravaginais de P4 apresentaram concentração plasmática de progesterona maior do que aqueles não tratados ($3,4 \pm 0,6$ versus $1,3 \pm 0,2\text{ng/ml}$; $P < 0,05$).

Portanto, protocolos de sincronização da ovulação associados a aplicações de eCG e/ou hCG e progesterona ou progestágenos podem aumentar os índices de prenhez pois promovem desenvolvimento folicular, ovulações sincronizadas e aumento das concentrações de progesterona. Exemplo disso é a investigação de Bó et al. (2001) que, ao compararem a utilização de CIDR[®] com ou sem a associação de 300UI de eCG, encontraram taxas de prenhez de 71,4% e 46,6%, respectivamente.

Diferença significativa nas taxas de prenhez de vacas de corte no período pós-parto - 60 a 90 dias - submetidas à sincronização da ovulação para IATF com dispositivos intravaginais de P4 +BE associados ou não a 400UI de eCG foi encontrada por Baruselli et al. (2004b): 51,9% (138/266) versus 38,8% (101/260).

Moura, Marques e Baruselli (2003) não verificaram diferença significativa nos índices de concepção de vacas de corte ao associarem o protocolo Crestar[®] com 400UI de eCG (D-9= retirada do implante) + 1mg de BE (D-10). Os grupos foram divididos em Crestar[®] + eCG (G1) e Crestar[®] + eCG + BE (G2). As taxa de concepção foram de 51,2% (42/82) para o G1, e de 50,6% (38/75) para o G2. Em virtude dos resultados obtidos, os autores sugerem que a utilização de BE após a associação entre o protocolo Crestar[®] e o eCG é desnecessária.

Ao compararem a associação de 400UI de eCG na retirada do Crestar[®] (G1) com o protocolo Crestar[®] (G2) em vacas de corte, Cavalieri et al. (1997) observaram redução no intervalo entre o final do tratamento e o início do estro (41,9 versus 45,6h, respectivamente), entre o final do tratamento e a ocorrência da concentração máxima de LH (41,6 versus 47,4h), e entre o final do tratamento e as ovulações (67,3 versus 68,8h).

Silva et al. (1997) utilizaram PRID[®] por 12 dias ou Crestar[®] por 8 dias; todas as vacas receberam uma aplicação de 500UI de eCG após o final do tratamento. Os índices de concepção foram de 60,0 e 71,4%, e as taxas de parição foram de 52,4 e 65%, respectivamente.

Utilizando fêmeas em anestro, Singh, Khurana e Inderjeet (1998) verificaram taxas de prenhez de 71,8% em novilhas, e de 51,2% em vacas, todas tratadas com Crestar[®] + 500UI de eCG. No grupo controle (sem tratamento), nenhuma fêmea ficou prenhe.

Cutaia et al. (2003) avaliaram as respostas à utilização CIDR[®] + 400UI de eCG em vacas que apresentavam corpo lúteo (G1), vacas que apresentavam folículos >8,0mm de diâmetro (G2) e vacas que não apresentavam estruturas palpáveis (G3). Ao comparar as taxas de prenhez entre o grupo controle – que não recebeu eCG - e as fêmeas tratadas verificaram que, nos animais ciclando - com CL; G1 -, o eCG não interferiu significativamente (52,7% versus 59,6%); já naqueles que apresentavam somente folículos e naqueles que não tinham estruturas palpáveis, o eCG influenciou significativamente nas taxas de prenhez (31,3% versus 50,9% e 30,6% versus 54,2%, respectivamente).

Ao compararem a associação (G1) ou não (G2) de 400UI de eCG (D-8) com CIDR[®] em novilhas de corte, Baruselli et al. (2004a) verificaram diferença significativa na taxa de ovulação (76 versus 50%, $P < 0,05$). Entretanto, nenhum efeito foi observado no diâmetro do folículo ovulatório ($10,9 \pm 0,3$ versus $11,2 \pm 0,3$ mm), no intervalo entre a retirada do dispositivo e a ovulação ($72,0 \pm 2,5$ versus $72,0 \pm 3,1$ h) e na área do CL ($2,4 \pm 0,2$ versus $2,0 \pm 0,1$ mm²).

A redução da dose de eCG não interferiu negativamente na taxa de prenhez de receptoras de embrião. Fêmeas tratadas com 400, 500 e 600UI de eCG

apresentaram taxas de prenhez de 42,3% (85/201), 36,0% (71/197) e 42,9% (84/196), respectivamente (REIS et al., 2004).

Nesse mesmo sentido, Marques et al. (2004) verificaram que a utilização de 500, 1000 ou 1500UI de hCG associado ao CIDR[®] + BE e a 400UI de eCG não interferiu nas taxas de prenhez de vacas de corte, que foram de 31,0% (500UI), 21,1% (1000UI) e 34,1% (1500UI).

A espécie bubalina apresenta respostas eficientes à sincronização da ovulação para a IATF durante a estação reprodutiva favorável - outono e inverno -, mas búfalas tratadas durante a estação reprodutiva desfavorável apresentam baixas taxas de concepção (BARUSELLI; CARVALHO, 2003a).

Os primeiros experimentos de tratamento hormonal em búfalas em anestro estacional foram realizados na Índia por Singh et al. (1983), que utilizaram PRID[®] associado a 700UI de eCG em um grupo, e somente PRID[®] em outro. Os índices de ovulação e de concepção foram significativamente maiores nas fêmeas tratadas com PRID[®] + eCG (58,3% - 7/12, e 41,6% - 5/12, respectivamente), do que naquelas tratadas somente com PRID[®] (33,3 - 4/12 e 8,3% - 1/12, respectivamente).

Para confirmar a necessidade da aplicação de eCG após o tratamento com progestágenos em búfalas em anestro, Saini et al. (1986) compararam a utilização de PRID[®] e PRID[®] + 1000UI de eCG. As búfalas do primeiro grupo manifestaram sintomas de estro 2 a 4 dias após o tratamento, mas nenhuma delas concebeu após a IA. Já no grupo tratado com PRID[®] e eCG, todas as búfalas exibiram estro cerca de 30 horas após a remoção do dispositivo intravaginal, e 42,8% (3/7) delas conceberam.

Já Singh et al. (1988a), que utilizarem PRID[®] + 800 UI de eCG e realizaram duas inseminações - 48 e 72 horas após a retirada do implante - nos meses de maio,

junho e julho, obtiveram taxas de ovulação no estro induzido de 88, 90 e 100%, respectivamente. Esses elevados índices de ovulação foram atribuídos à aplicação de eCG no momento da retirada do PRID[®]. Nesse mesmo estudo, as taxas de prenhez foram de 50, 60 e 50%, respectivamente. No grupo controle – que não recebeu tratamento -, nenhuma fêmea exibiu estro ou ovulação.

Em publicação datada de 1997, Andurkar et al. (1997) relatam que 71,42% das búfalas apresentaram estro após receberem a associação de CIDR[®] por 8 dias + 500UI de eCG.

Ao avaliarem a eficiência de tratamentos com SMB + 400UI de eCG (G1), SMB + PGF (G2) e SMB + 400UI de eCG + PGF (G3) para indução de estro e atividade cíclica em animais que estavam em anestro por 6-10 meses, Rao, Sreemannarayana e Rao (1985) observaram comportamento estral 24-96 horas após a retirada dos implantes. A porcentagem de animais que apresentaram estro foi de 53,3% (G1), 20,0% (G2) e 68,4% (G3). A taxa de prenhez foi de 20,0% (G1), 6,7% (G2) e 42,1% (G3). Já Shah, Willemse e Van de Wiel (1987) – que também utilizaram SMB associado a 600UI de eCG em animais em anestro sazonal e realizaram IATFs 48 e 72 horas após a retirada dos implantes - obtiveram taxa de prenhez total de 53,3%, e índices de concepção para animais de primeira, segunda e terceira parições de 40, 44,4 e 72%, respectivamente.

Singh et al. (1988b) utilizaram SMB associado a 700UI de eCG, e verificaram que a maioria das ovulações ocorreu entre 48 e 72 horas após o tratamento (71,0%), com taxa de ovulação de 65%.

Utilizando norgestomet ou norgestomet + 500UI de eCG em novilhas e vacas búfalas, Virakal et al. (1988) observaram, 60 dias após a inseminação, taxas

de prenhez de 20 e 70% para novilhas, e de 30,77 e 39,13% para vacas, respectivamente.

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 LOCAL DOS EXPERIMENTOS

Os experimentos 1, 2 e 4 - voltados ao estudo da dinâmica folicular de búfalas submetidas a diferentes tratamentos para sincronização da ovulação - foram realizados na Fazenda Várzea Grande, Município de Pariquera-Açu (SP) - latitude 24° 42' 54" Sul, longitude 47° 52' 52" Norte -, região Sudeste do Brasil, no período de dezembro de 2003 a janeiro de 2004.

Já os experimentos 3 e 5 - relativos às taxas de concepção de fêmeas bubalinas submetidas à sincronização da ovulação para IATF com diferentes tipos de tratamentos - foram realizados, respectivamente, em diferentes propriedades do Estado de São Paulo no período de novembro de 2002 a fevereiro de 2003, e em três propriedades do Vale do Ribeira-SP, entre dezembro de 2003 e fevereiro de 2004.

3.2 EXAMES REPRODUTIVOS

Antes do início dos tratamentos realizados nos experimentos 1, 2 e 4, as fêmeas passaram por exames reprodutivos completos para detecção de possíveis alterações que pudessem interferir no desenvolvimento da pesquisa. Não houve necessidade de retirar qualquer fêmea dos experimentos realizados.

3.3 EXPERIMENTO 1: DINÂMICA FOLICULAR DURANTE O TRATAMENTO PARA SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO COM DISPOSITIVO INTRAVAGINAL DE PROGESTERONA ASSOCIADO OU NÃO AO eCG (0 VERSUS 500UI) E AO hCG (1500UI) EM FÊMEAS BUBALINAS, NA ESTAÇÃO REPRODUTIVA DESFAVORÁVEL

3.3.1 ANIMAIS

Foram utilizadas 19 búfalas da raça Murrah lactantes, entre 4 e 8 anos de idade, mantidas a pasto e suplementadas com mineral *ad libitum*. O escore de condição corporal (ECC) médio desses animais era de $4,0 \pm 0,5$ (1 a 5; 1=magra e 5=muito gorda).

3.3.2 ESTABELECIMENTO DOS GRUPOS DE TRATAMENTO E SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO

Os grupos de tratamento foram estabelecidos em função da ciclicidade dos animais, avaliada pelas concentrações plasmáticas de progesterona mediante colheita de sangue por punção da veia jugular. Foram colhidas duas amostras de cada fêmea, com intervalo de 10 dias. Aquelas que apresentaram concentração $\leq 1,0\text{ng/ml}$ nas duas análises foram consideradas em anestro estacional. As fêmeas que apresentaram concentração $\geq 1,0\text{ng/ml}$ em apenas uma ou em ambas as amostras analisadas foram consideradas cíclicas.

Desta forma, o Grupo 1 (n=9) foi constituído por 55,6% (5/9) de fêmeas em anestro, e o Grupo 2 (n=10) por 60,0% (6/10) de fêmeas em anestro.

O protocolo de sincronização da ovulação para a IATF utilizado no experimento consta da Figura 1.

Grupo 1 - Controle (n=9) **Grupo 2 – 500UI de eCG no D9 (n=10)**

1. Benzoato de Estradiol® - Syntex

4. Ovisyn® - Syntex

2. BID® - Syntex

5. Novormon® - Syntex

3. Prolise® - Arsa

Figura 1 - Representação esquemática dos tratamentos para sincronização da ovulação com dispositivo intravaginal de progesterona associado ou não ao eCG (0 versus 500UI) e ao hCG (1500UI) em búfalas, durante período reprodutivo desfavorável. Pariquera-Açu (SP), 2003.

Portanto, considerando o tratamento com eCG no momento da retirada do dispositivo intravaginal de PG (D9), os dois grupos foram estabelecidos como segue:

- **G1- Sem eCG no D9 (controle; n=9);**
- **G2- Com eCG no D9 (500UI; n=10).**

As aplicações dos medicamentos foram realizadas com seringa de 3ml e agulha 40/12 por via intramuscular (IM) no período da tarde (17h00), e as inseminações artificiais foram efetuadas no período da manhã (9h00), 16 horas após a aplicação do hCG no D11. Após a assepsia local, os dispositivos intravaginais eram depositados no fundo da vagina por meio de aplicador próprio.

3.3.3 EXAMES ULTRA-SONOGRÁFICOS

Os exames ultra-sonográficos, realizados pela técnica transretal com o auxílio de sonda linear de 8,0MHz¹, tiveram início no D9 do protocolo de sincronização - isto é, no momento da retirada dos dispositivos intravaginais de progesterona -, e foram repetidos em intervalos de 12 horas até que fosse constatada a ovulação. Os folículos foram mensurados para acompanhamento da dinâmica de crescimento folicular e determinação do diâmetro máximo do folículo ovulatório. O desaparecimento dos folículos $\geq 1,0$ cm anteriormente identificados foi considerado como indicativo de ovulação. O horário da ovulação foi estabelecido como a hora intermediária entre o penúltimo e o último exame, no qual foi diagnosticada a ovulação.

Para detectar a presença e a área do corpo lúteo, outro exame foi realizado 12 dias após a administração de hCG.

¹ Piemedical Scanner 100®.

3.3.4 COLETA DE SANGUE E ANÁLISE HORMONAL

Para a análise dos perfis de progesterona, com base nos quais foram estabelecidos os grupos de tratamento (item 3.3.2), o sangue foi colhido no D -10 e no D0. Uma amostra de sangue também foi colhida 12 dias após a aplicação do hCG, para comprovar a presença e a funcionalidade do CL, confirmando a ovulação. O sangue foi colhido por punção da veia jugular com agulha 40/16 descartável, em tubos de 10ml com anticoagulante Ácido Etilenodiaminatetracético (EDTA). Os testes para detecção das concentrações plasmáticas de progesterona foram realizados por radioimunoensaio em fase sólida² no Laboratório de Análises Hormonais do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP). A sensibilidade do teste foi de 0,07ng/ml, e os coeficientes de variação intra e interensaio foram inferiores a 10%.

3.3.5 DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO

O diagnóstico de gestação foi realizado 28 dias após a inseminação artificial, por meio de exame ultra-sonográfico pela técnica transretal, com sonda linear de 6MHz.

² Coat-a-Count®-Progesterone Diagnosis Products Co.

3.4 EXPERIMENTO 2: DINÂMICA FOLICULAR DURANTE O TRATAMENTO PARA SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO COM DISPOSITIVO INTRAVAGINAL DE PROGESTERONA ASSOCIADO AO eCG (500UI) E AO hCG (1000 VERSUS 1500UI) EM FÊMEAS BUBALINAS, NA ESTAÇÃO REPRODUTIVA DESFAVORÁVEL

3.4.1 ANIMAIS

Foram utilizadas 42 búfalas da raça Murrah lactantes, entre 4 e 9 anos de idade, mantidas a pasto e suplementadas com mineral *ad libitum*. O escore de condição corporal médio desses animais era de $3,9 \pm 0,1$.

3.4.2 ESTABELECIMENTO DOS GRUPOS DE TRATAMENTO E SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO

Os grupos de tratamento foram estabelecidos em função da ciclicidade, avaliada pelas concentrações plasmáticas de progesterona, como descrito no item 3.3.2. Desta maneira, o Grupo 1 (n=21) foi composto por 61,9% (13/21) de fêmeas em anestro, e o Grupo 2 (n=21) por 57,1% (12/21) de fêmeas em anestro.

O protocolo de sincronização da ovulação está representado na Figura 2.

Grupo 1 – 1500UI de hCG no D11 (n=21)

Grupo 2 – 1000UI de hCG no D11 (n=21)

Figura 2 - Representação esquemática dos tratamentos para sincronização da ovulação com dispositivo intravaginal de progesterona associado ao eCG (500UI) e ao hCG (1000 versus 1500UI) em búfalas durante período reprodutivo desfavorável. Pariquera-Açu (SP), 2003.

Considerando as doses de hCG utilizadas, os dois grupos foram estabelecidos como segue:

- **G1- 1500UI de hCG no D11 (n=21)**
- **G2- 1000UI de hCG no D11 (n=21)**

As aplicações dos medicamentos foram realizadas como descrito no item 3.3.2.

3.4.3 EXAMES ULTRA-SONOGRÁFICOS

Os exames ultra-sonográficos, realizados pela técnica transretal como descrito no item 3.3.3, tiveram início no D9 do esquema de sincronização, e foram repetidos em intervalos de 12 horas até que fosse constatada a ovulação.

Para detectar a presença e a área do corpo lúteo, outro exame foi realizado 12 dias após a administração de hCG.

3.4.4 COLETA DE SANGUE E ANÁLISE HORMONAL

Para a análise dos perfis de progesterona, o sangue foi colhido e analisado como descrito no item 3.3.4, também com a finalidade de avaliar a presença de ciclicidade e funcionalidade do corpo lúteo antes e depois do tratamento.

3.5 EXPERIMENTO 3: TAXAS DE CONCEPÇÃO DE FÊMEAS BUBALINAS SUBMETIDAS À SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO PARA IATF COM DISPOSITIVOS INTRAVAGINAIS DE PROGESTERONA ASSOCIADOS AO eCG (500UI) E A DIFERENTES DOSES DE hCG (1000 VERSUS 1500UI), NA ESTAÇÃO REPRODUTIVA DESFAVORÁVEL

3.5.1 ANIMAIS

Foram utilizadas 174 búfalas leiteiras das raças Murrah e Mediterrâneo alocadas, como mencionado no item 3.1, em diferentes propriedades do Estado de São Paulo, mantidas a pasto e suplementadas com mineral *ad libitum*. O experimento foi realizado durante os meses de novembro de 2002 a fevereiro de 2003.

3.5.2 ESTABELECIMENTO DOS GRUPOS DE TRATAMENTO E SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO

As fêmeas foram divididas aleatoriamente em dois grupos, de acordo com condição corporal, idade e presença do bezerro.

O protocolo de sincronização da ovulação para a IATF pode ser observado na Figura 3.

Grupo 1 – 1000UI de hCG no D11 (n=83) **Grupo 2 – 1500UI de hCG no D11 (n=91)**

Figura 3 - Representação esquemática dos tratamentos para sincronização da ovulação com dispositivo intravaginal de progesterona associado ao eCG (500UI) e ao hCG (1000 versus 1500UI) em búfalas, durante período reprodutivo desfavorável. São Paulo, 2003.

Considerando as doses de hCG utilizadas, os dois grupos foram estabelecidos como segue:

- **G1- 1000UI de hCG no D11 (n=83);**
- **G2- 1500UI de hCG no D11 (n=91).**

As aplicações dos medicamentos foram conduzidas como descrito no item 3.3.2. As inseminações artificiais foram realizadas 16 horas após a aplicação de hCG (9h00).

3.5.3 EXAMES ULTRA-SONOGRÁFICOS

Os exames ultra-sonográficos para o diagnóstico de gestação foram realizados pela técnica transretal, como descrito no item 3.3.3, entre 30 e 35 dias após a realização das inseminações artificiais em tempo fixo.

3.6 EXPERIMENTO 4: DINÂMICA FOLICULAR DURANTE O TRATAMENTO PARA SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO COM DISPOSITIVO INTRAVAGINAL DE PROGESTERONA ASSOCIADO AO eCG (400 VERSUS 500UI) E AO hCG (1000UI) EM FÊMEAS BUBALINAS, NA ESTAÇÃO REPRODUTIVA DESFAVORÁVEL

3.6.1 ANIMAIS

Foram utilizadas 21 búfalas da raça Murrah lactantes, entre 4 e 8 anos de idade, mantidas a pasto e suplementadas com mineral *ad libitum*. O escore de condição corporal médio desses animais era de $3,9 \pm 0,1$.

3.6.2 ESTABELECIMENTO DOS GRUPOS DE TRATAMENTO E SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO

Os grupos de tratamento foram estabelecidos como descrito no item 3.3.2. Portanto, o Grupo 1 (n=10) foi composto por 60,0% (6/10) de fêmeas em anestro e o Grupo 2 (n=11) por 54,5% (6/11) de fêmeas em anestro.

O protocolo de sincronização da ovulação para IATF está representado na Figura 4.

Grupo 1 – 500UI de eCG no D9 (n=10)

Grupo 2 – 400UI de eCG no D9 (n=11)

Figura 4 - Representação esquemática dos tratamentos para sincronização da ovulação com dispositivo intravaginal de progesterona associado ao eCG (400 versus 500UI) e ao hCG (1000UI) em búfalas durante período reprodutivo desfavorável. Pariquera-Açu (SP), 2003.

Considerando a administração de eCG no D9, os dois grupos foram estabelecidos como segue:

- **G1- 500UI de eCG no D9 (n=10)**
- **G2- 400UI de eCG no D9 (n=11)**

As aplicações dos medicamentos foram realizadas como consta do item 3.3.2.

3.6.3 EXAMES ULTRA-SONOGRÁFICOS

Os exames ultra-sonográficos, realizados pela técnica transretal como descrito no item 3.3.3, tiveram início no D9 do protocolo de sincronização - isto é, no momento da retirada dos dispositivos intravaginais de progesterona -, e foram repetidos em intervalos de 12 horas até que fosse constatada a ovulação.

Para detectar a presença e a funcionalidade do corpo lúteo, outro exame foi realizado 12 dias após a administração de hCG.

3.6.4 COLETA DE SANGUE E ANÁLISE HORMONAL

Para a análise dos perfis de progesterona, o sangue foi colhido e analisado como descrito no item 3.3.4.

3.7 EXPERIMENTO 5: TAXAS DE CONCEPÇÃO DE FÊMEAS BUBALINAS SUBMETIDAS À SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO PARA IATF COM DISPOSITIVO INTRAVAGINAL DE PROGESTERONA ASSOCIADO A DIFERENTES DOSES DE eCG (400 VERSUS 500UI) E AO hCG (1000UI), NA ESTAÇÃO REPRODUTIVA DESFAVORÁVEL

3.7.1 ANIMAIS

Foram utilizadas 105 búfalas das raças Murrah e Mediterrâneo alocadas, como mencionado no item 3.1, em três propriedades do Vale do Ribeira (SP), mantidas a pasto e suplementadas com mineral *ad libitum*. O experimento foi realizado durante os meses de dezembro de 2003 a fevereiro de 2004.

3.7.2 ESTABELECIMENTO DOS GRUPOS DE TRATAMENTO E SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO

As fêmeas foram divididas aleatoriamente em dois grupos, de acordo com condição corporal, idade e presença do bezerro.

O protocolo de sincronização da ovulação para a IATF pode ser observado na Figura 5.

Grupo 1 – 500UI de eCG no D9 (n=54) **Grupo 2 – 400UI de eCG no D9 (n=51)**

Figura 5 - Representação esquemática dos tratamentos para sincronização da ovulação com dispositivo intravaginal de progesterona associado ao eCG (400 versus 500UI) e ao hCG (1000UI) em búfalas, durante período reprodutivo desfavorável. Vale do Ribeira (SP), 2003.

Considerando as doses de eCG utilizadas, os dois grupos foram estabelecidos como segue:

- **G1- 500UI de eCG no D9 (n=54)**
- **G2- 400UI de eCG no D9 (n=51)**

As aplicações dos medicamentos foram conduzidas como descrito no item 3.3.2. As inseminações artificiais foram realizadas 16 horas após a aplicação de hCG (9h00).

3.7.3 EXAMES ULTRA-SONOGRÁFICOS

Os exames ultra-sonográficos para o diagnóstico de gestação foram realizados pela técnica transretal, como descrito no item 3.3.3, entre 30 e 35 dias após a realização das inseminações artificiais em tempo fixo.

3.8 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizado delineamento experimental inteiramente casualizado, sendo os grupos divididos de acordo com: ciclicidade - concentração plasmática de P4 no D-10 e D0), condição corporal e ordem de parto.

Os dados foram analisados através do programa *SAS System for Windows*³ (SAS, 2000). Através do aplicativo *Guided Data Analysis*, os dados foram testados quanto à normalidade dos resíduos e à homogeneidade das variâncias. Caso não obedecessem a tais premissas, eram transformados (logaritmo na base 10 - $\text{Log}_{10}X$;

³ SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 2000.

Raiz quadrada - RQ X ; Quadrado - X^2) e, se a normalidade não fosse obtida, empregava-se o procedimento NPAR1WAY de análise de variância não paramétrica.

Para a descrição dos resultados foram empregados os erros padrões e as médias (média $\pm$ erro padrão) e os níveis de significância (p) dos dados originais, quando obedecessem às premissas; dos dados transformados, quando necessária a transformação; e dos dados analisados através da análise não paramétrica, quando não obedecessem às premissas e não houvesse transformações possíveis.

O nível de significância utilizado para rejeitar H_0 (hipótese de nulidade) foi de 5%, isto é, para um nível de significância menor que 0,05, considerou-se que ocorreram diferenças estatísticas entre as variáveis classificatórias – tratamentos - para uma determinada variável resposta.

Na análise de variância foram verificados os efeitos das variáveis classificatórias eCG (0 ou 500UI), hCG (1000 ou 1500UI) e eCG (400 ou 500UI).

As variáveis resposta analisadas nos experimentos 1, 2 e 4 foram diâmetro do folículo dominante no D9, no D10 e no D11, diâmetro máximo do folículo dominante, diâmetro máximo do folículo ovulatório, intervalo entre a retirada do dispositivo e a ovulação, taxa de ovulação, área do corpo lúteo, concentração plasmática de progesterona e concentração plasmática de progesterona das fêmeas que ovularam.

As taxas de prenhez dos experimentos 1, 3 e 5 foram analisadas pelo teste de Qui-Quadrado com nível de significância de 5%.

Como os experimentos 3 e 5 foram realizados em diferentes propriedades, foi verificada a interação entre os tratamentos e as propriedades. O experimento 2 foi realizado em duas repetições, sendo verificada a interação entre os tratamentos e as repetições.

4 RESULTADOS

4.1 EXPERIMENTO 1: DINÂMICA FOLICULAR DURANTE O TRATAMENTO PARA SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO COM DISPOSITIVO INTRAVAGINAL DE PROGESTERONA ASSOCIADO OU NÃO AO eCG (0 VERSUS 500UI) E AO hCG (1500UI) EM FÊMEAS BUBALINAS, NA ESTAÇÃO REPRODUTIVA DESFAVORÁVEL

Os diâmetros dos folículos dominantes no D9 - retirada do dispositivo intravaginal -, no D10 e no D11 foram de $7,8 \pm 2,9$, $9,6 \pm 3,2$ e $11,2 \pm 3,7$ mm, respectivamente, para as fêmeas do G1 – controle -, e de $8,5 \pm 2,2$, $10,1 \pm 2,1$ e $12,2 \pm 2,6$ mm, respectivamente, para as fêmeas do G2 - 500UI de eCG – (Tabela 1). Não foi verificada diferença estatística entre os grupos ($P>0,05$).

Tabela 1 - Efeito do tratamento com eCG no diâmetro ($\emptyset$) do folículo dominante no D9, no D10 e no D11, em búfalas sincronizadas com dispositivos intravaginais de P4 para IATF na época reprodutiva desfavorável - Pariquera-Açu, 2003

Grupos	N	$\emptyset$ D9 (mm)	$\emptyset$ D10 (mm)	$\emptyset$ D11 (mm)
G1 (s/eCG)	9	$7,8 \pm 2,9$	$9,6 \pm 3,2$	$11,2 \pm 3,7$
G2 (500UI eCG)	10	$8,5 \pm 2,2$	$10,1 \pm 2,1$	$12,2 \pm 2,6$

Os diâmetros máximos dos folículos dominantes foram de $12,6 \pm 3,0$ e $13,4 \pm 1,7$ mm para o G1 e o G2, respectivamente ($P>0,05$). Os diâmetros dos folículos ovulatórios foram de $14,9 \pm 2,9$ mm para os animais do G1, e de $14,0 \pm 1,6$ mm para os animais do G2 ($P>0,05$). A Tabela 2 apresenta esses resultados.

Tabela 2 - Efeito do tratamento com eCG no diâmetro ($\emptyset$) máximo do folículo dominante (FD) e no diâmetro do folículo ovulatório (FO), em búfalas sincronizadas com dispositivos intravaginais de P4 para IATF na época reprodutiva desfavorável - Pariquera-Açu, 2003

Grupos	N	$\emptyset$ FD (mm)	$\emptyset$ FO (mm)
G1 (s/eCG)	9	$12,6 \pm 3,0$	$14,9 \pm 2,9$
G2 (500U eCG)I	10	$13,4 \pm 1,7$	$14,0 \pm 1,6$

Os intervalos entre a retirada do dispositivo intravaginal e a ovulação foram de $78,0 \pm 12,0$ e $68,0 \pm 9,0$ horas para o G1 e o G2, respectivamente ($P>0,05$). Apesar de um aumento de 25,6%, as taxas de ovulação não apresentaram diferença estatística relacionada aos tratamentos ($P>0,05$). As taxas de ovulação foram de 44,4% para o G1 (4/9), e de 70% para o G2 (7/10), como demonstra a Tabela 3.

Tabela 3 - Efeito do tratamento com eCG no intervalo entre a retirada do dispositivo intravaginal e a ovulação (Ret-Ov) e na taxa de ovulação, em búfalas sincronizadas com dispositivos intravaginais de P4 para IATF na época reprodutiva desfavorável - Pariquera-Açu, 2003

Grupos	N	Intervalo Ret-Ov (h)	Taxa de Ovulação (%)
G1 (s/eCG)	9	$78,0 \pm 12,0$	44,4 (4/9)
G2 (500UI eCG)	10	$68,0 \pm 9,0$	70,0 (7/10)

Os dados referentes à área do CL e às concentrações de progesterona podem ser observados na Tabela 4. A área do CL formado foi de $31,6 \pm 19,9\text{mm}^2$ para os animais do grupo controle - G1 -, e de $29,9 \pm 9,7\text{mm}^2$ para os animais que receberam eCG – G2 - ($P>0,05$). As concentrações plasmáticas de progesterona, detectadas 12 dias após a aplicação do hCG, foram de $1,3 \pm 1,4$ e $2,0 \pm 1,6\text{ng/ml}$ ($P>0,05$) para as fêmeas do G1 e do G2, respectivamente. Quando foram considerados apenas os animais que apresentaram ovulação, as concentrações plasmáticas de progesterona foram de $3,2 \pm 0,6\text{ng/ml}$ para os animais do G1, e de $3,1 \pm 1,2\text{ng/ml}$ para os animais do G2 ($P>0,05$).

Tabela 4 - Efeito do tratamento com eCG na área do corpo lúteo, nas concentrações plasmáticas de progesterona (P4) e nas concentrações plasmáticas de progesterona das fêmeas que ovularam (P4-OV), 11 dias após a IATF, em búfalas sincronizadas com dispositivos intravaginais de P4 para IATF na época reprodutiva desfavorável - Pariquera-Açu, 2003

Grupos	N	Área do CL (mm ²)	P4 (ng/ml)	P4-OV (ng/ml)
G1 (s/eCG)	9	31,6 ± 19,9	1,3 ± 1,4	3,2 ± 0,6
G2 (500UI eCG)	10	29,9 ± 9,7	2,0 ± 1,6	3,1 ± 1,2

As taxas de prenhez foram de 22,2% (2/9) e de 60% (6/10) para os G1 e G2, respectivamente (P=0,11). Apesar de não diferir estatisticamente, houve um aumento de 37,8% na taxa de concepção dos animais tratados com eCG. Quando foram consideradas as taxas de prenhez somente das fêmeas que ovularam, observou-se que 50% (2/4) dos animais do G1, e 85,7% (6/7) dos animais do G2 ficaram gestantes (Tabela 5).

Tabela 5 - Efeito do tratamento com eCG na taxa de prenhez e na taxa de prenhez das fêmeas que ovularam, em búfalas sincronizadas com dispositivos intravaginais de P4 para IATF na época reprodutiva desfavorável - Pariquera-Açu, 2003

Grupos	N	Taxa de Prenhez (%)	Taxa de Prenhez das Ovuladas (%)
G1 (s/Ecg)	9	22,2 (2/9)*	50,0 (2/4)
G2 (500UI eCG)	10	60,0 (6/10)*	85,7 (6/7)

* P=0,11

4.2 EXPERIMENTO 2: DINÂMICA FOLICULAR DURANTE O TRATAMENTO PARA SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO COM DISPOSITIVO INTRAVAGINAL DE PROGESTERONA ASSOCIADO AO eCG (500UI) E AO hCG (1000 VERSUS 1500UI) EM FÊMEAS BUBALINAS, NA ESTAÇÃO REPRODUTIVA DESFAVORÁVEL

As doses de hCG utilizadas (1000UI e 1500UI) não interferiram significativamente no diâmetro do folículo dominante.

Os diâmetros foliculares encontrados no D9 - retirada do dispositivo intravaginal -, no D10 e no D11 foram de $8,5 \pm 2,2$, $9,5 \pm 1,8$ e $11,1 \pm 2,6$ mm, respectivamente, para o G1 (1500UI). Os animais do G2 (1000UI) apresentaram diâmetros de $8,4 \pm 2,2$, $9,1 \pm 2,4$ e $11,0 \pm 2,8$ mm, respectivamente, para os mesmos intervalos de avaliação (Tabela 6).

Tabela 6 - Efeito do tratamento com hCG no diâmetro ($\emptyset$) do folículo dominante no D9 - retirada do dispositivo intravaginal -, no D10 e no D11, em búfalas sincronizadas com dispositivos intravaginais de P4 para IATF na época reprodutiva desfavorável - Pariquera-Açu, 2003

Grupos	N	$\emptyset$ D9 (mm)	$\emptyset$ D10 (mm)	$\emptyset$ D11 (mm)
G1 (1500UI hCG)	21	$8,5 \pm 2,2$	$9,5 \pm 1,8$	$11,1 \pm 2,6$
G2 (1000UI hCG)	21	$8,4 \pm 2,2$	$9,1 \pm 2,4$	$11,0 \pm 2,8$

Os diâmetros máximos dos folículos dominantes foram de $12,4 \pm 2,3$ e $12,2 \pm 2,5$ mm ($P>0,05$), respectivamente, para as fêmeas do G1 e do G2. Os animais do G1 apresentaram diâmetros máximos dos folículos ovulatórios de $12,6 \pm 2,3$ mm, e os do G2 de $12,5 \pm 2,7$ mm ($P>0,05$), como pode ser observado na Tabela 7.

Tabela 7 - Efeito do tratamento com hCG no diâmetro ($\varnothing$) máximo do folículo dominante (FD) e no diâmetro do folículo ovulatório (FO), em búfalas sincronizadas com dispositivos intravaginais de P4 para IATF na época reprodutiva desfavorável - Pariquera-Açu, 2003

Grupos	N	$\varnothing$ FD (mm)	$\varnothing$ FO (mm)
G1 (1500UI hCG)	21	12,4 $\pm$ 2,3	12,6 $\pm$ 2,3
G2 (1000UI hCG)	21	12,2 $\pm$ 2,5	12,5 $\pm$ 2,7

Os intervalos entre a administração de hCG (D-11) e a ovulação foram de 26,0 $\pm$ 9,3 para o G1, e de 27,2 $\pm$ 14,8 horas para o G2 ($P > 0,05$; Tabela 8).

Tabela 8 - Intervalo entre o tratamento com hCG e a ovulação (HCG-Ov), em búfalas sincronizadas com dispositivos intravaginais de P4 para IATF na época reprodutiva desfavorável - Pariquera-Açu, 2003

Grupos	N	HCG-Ov (h)
G1 (1500UI hCG)	21	26,0 $\pm$ 9,3
G2 (1000UI hCG)	21	27,2 $\pm$ 14,8

Os intervalos entre a retirada do dispositivo intravaginal e a ovulação foram de 67,7 $\pm$ 18,1 para o G1, e de 72,8 $\pm$ 16,7 horas para o G2 ($P > 0,05$; Tabela 9).

As taxas de ovulação (Tabela 9) foram iguais para os dois grupos, isto é, ambos apresentaram taxas de ovulação de 66,7% (G1=66,7%; 14/21 e G2=66,7%; 14/21).

Tabela 9 - Efeito do tratamento com hCG no intervalo entre a retirada do dispositivo intravaginal e a ovulação (Ret-Ov), e nas taxas de ovulação, em búfalas sincronizadas com dispositivos intravaginais de P4 para IATF na época reprodutiva desfavorável. Pariquera-Açu-SP, 2003.

Grupos	N	Ret-Ov (h)	Taxa de Ovulação (%)
G1 (1500UI hCG)	21	67,7 $\pm$ 18,1	66,7 (14/21)
G2 (1000UI hCG)	21	72,8 $\pm$ 16,7	66,7 (14/21)

A área do CL (Tabela 10) 12 dias após a aplicação de hCG foi de $24,8 \pm 9,2\text{mm}^2$ para as fêmeas que receberam 1500UI de hCG (G1), e de $28,3 \pm 17,2\text{mm}^2$ para aquelas que receberam 1000UI de hCG (G2; $P>0,05$).

As concentrações plasmáticas de progesterona foram de $2,3 \pm 1,4$ e $2,4 \pm 1,3\text{ng/ml}$ ($P>0,05$) para as fêmeas do G1 e do G2, respectivamente (Tabela 10). Quando foram considerados apenas os animais que apresentaram ovulação, as concentrações plasmáticas de progesterona foram de $3,0 \pm 1,2\text{ng/ml}$ para os animais do G1, e de $3,1 \pm 1,0\text{ng/ml}$ para aqueles do G2 ($P>0,05$).

Tabela 10 - Efeito do tratamento com hCG na área do corpo lúteo, nas concentrações plasmáticas de progesterona (P4) e nas concentrações plasmáticas de progesterona das fêmeas que ovularam (P4-OV), 12 dias após a administração, em búfalas sincronizadas com dispositivos intravaginais de P4 para IATF na época reprodutiva desfavorável - Pariquera-Açu, 2003

Grupos	N	Área do CL (mm^2)	P4 (ng/ml)	P4-OV (ng/ml)
G1 (1500UI hCG)	21	$24,8 \pm 9,2$	$2,3 \pm 1,4$	$3,0 \pm 1,2$
G2 (1000UI hCG)	21	$28,3 \pm 17,2$	$2,4 \pm 1,3$	$3,1 \pm 1,0$

4.3 EXPERIMENTO 3: TAXAS DE CONCEPÇÃO DE FÊMEAS BUBALINAS SUBMETIDAS À SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO PARA IATF COM DISPOSITIVO INTRAVAGINAL DE PROGESTERONA ASSOCIADO AO eCG (500UI) E A DIFERENTES DOSES DE hCG (1000 VERSUS 1500UI), NA ESTAÇÃO REPRODUTIVA DESFAVORÁVEL

As doses de hCG utilizadas nos dois grupos (G1 = 1000UI e G2 = 1500UI) não influenciaram estatisticamente as taxas de prenhez encontradas após a realização da IATF ($P>0,05$), que foram de 53,0% (44/83) para os animais do G1 e de 53,8% (49/91) para aqueles do G2. A taxa de prenhez total foi de 53,4% (93/174; Tabela 11).

Tabela 11 - Efeito de diferentes doses de hCG (1000 versus 1500UI) nas taxas de prenhez, em búfalas sincronizadas com dispositivos intravaginais de P4 para IATF na época reprodutiva desfavorável - São Paulo, 2003

Grupos	N	Taxa de Prenhez (%)
G1 (1000UI hCG)	83	53,0 (44/83)
G2 (1500UI hCG)	91	53,8 (49/91)
TOTAL	174	53,4 (93/174)

4.4 EXPERIMENTO 4: DINÂMICA FOLICULAR DURANTE O TRATAMENTO PARA SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO COM DISPOSITIVO INTRAVAGINAL DE PROGESTERONA ASSOCIADO AO eCG (400 VERSUS 500UI) E AO hCG (1000UI) EM FÊMEAS BUBALINAS, NA ESTAÇÃO REPRODUTIVA DESFAVORÁVEL

O tratamento utilizado não teve influência significativa ($P>0,05$) sobre o diâmetro do folículo dominante. Os diâmetros dos folículos dominantes encontrados no D9 - retirada do dispositivo intravaginal -, no D10 e no D11 foram de $8,4 \pm 2,2$, $9,41 \pm 1,5$ e $12,3 \pm 1,7$ mm, respectivamente, para as fêmeas do G1 (500UI de eCG). Os animais tratados com 400UI de eCG (G2) apresentaram diâmetros dos folículos dominantes de $8,0 \pm 1,2$, $9,4 \pm 1,6$ e $12,2 \pm 2,6$ mm, respectivamente, para os mesmos intervalos de avaliação, como ilustra a Tabela 12.

Tabela 12 - Efeito do tratamento com eCG no diâmetro ($\emptyset$) do folículo dominante no D9 - retirada do dispositivo intravaginal -, no D10 e no D11, em búfalas sincronizadas com dispositivos intravaginais de P4 para IATF na época reprodutiva desfavorável - Pariquera-Açu, 2003

Grupos	N	$\emptyset$ D9 (mm)	$\emptyset$ D10 (mm)	$\emptyset$ D11 (mm)
G1 (500UI eCG)	10	$8,4 \pm 2,2$	$9,4 \pm 1,5$	$12,3 \pm 1,7$
G2 (400UI eCG)	11	$8,0 \pm 1,2$	$9,4 \pm 1,6$	$12,2 \pm 2,6$

Os diâmetros máximos dos folículos dominantes foram de $13,2 \pm 1,4$ e de $13,8 \pm 1,8$ mm ($P>0,05$) para o G1 e o G2, respectivamente. Os diâmetros dos folículos ovulatórios foram de $13,7 \pm 1,1$ mm para os animais do G1, e de $14,2 \pm 1,5$ mm para os animais do G2, como pode ser observado na Tabela 13.

Tabela 13 - Efeito do tratamento com eCG no diâmetro ($\emptyset$) máximo do folículo dominante (FD) e no diâmetro do folículo ovulatório (FO), em búfalas sincronizadas com dispositivos intravaginais de P4 para IATF na época reprodutiva desfavorável - Pariquera-Açu, 2003

Grupos	N	$\emptyset$ FD (mm)	$\emptyset$ FO (mm)
G1 (500UI eCG)	10	$13,2 \pm 1,4$	$13,7 \pm 1,1$
G2 (400U eCG)I	11	$13,8 \pm 1,8$	$14,2 \pm 1,5$

Os intervalos entre a retirada do dispositivo intravaginal de progesterona e a ovulação, bem como as taxas de ovulação, não foram influenciados pelos tratamentos ($P>0,05$). Os intervalos entre a retirada do dispositivo intravaginal e a ovulação foram de $71,1 \pm 11,7$ e $75,0 \pm 5,5$ horas para o G1 e o G2, respectivamente. As taxas de ovulação foram de 70,0% para o G1 (7/10), e de 72,72% para o G2 (8/11), como ilustra a Tabela 14.

Tabela 14 - Efeito do tratamento com eCG no intervalo entre a retirada do dispositivo intravaginal e a ovulação (Ret-Ov), e na taxa de ovulação, em búfalas sincronizadas com dispositivos intravaginais de P4 para IATF na época reprodutiva desfavorável - Pariquera-Açu, 2003

Grupos	N	Ret-Ov (h)	Taxa de Ovulação (%)
G1 (500UI eCG)	10	$71,1 \pm 11,7$	70,0 (7/10)
G2 (400UI eCG)	11	$75,0 \pm 5,5$	72,7 (8/11)

Os valores referentes a área do CL e às concentrações de progesterona não sofreram influência significativa das concentrações de eCG ($P>0,05$; Tabela 15). A área do CL formado foi de $28,4 \pm 8,6\text{mm}^2$ para os animais do G1, e de $31,6 \pm 10,3\text{mm}^2$ para os animais do G2. As concentrações plasmática de progesterona, 12 dias após a aplicação do hCG, foram de $2,7 \pm 1,2$ para as fêmeas do G1, e de $3,3 \pm 2,9\text{ng/ml}$ ($P>0,05$) para aquelas do G2. Nas fêmeas que ovularam, as

concentrações plasmáticas de progesterona foram de $3,1 \pm 1,0$ ng/ml para os animais do G1, e de $4,0 \pm 3,2$ ng/ml para aqueles do G2.

Tabela 15 - Efeito do tratamento com eCG na área do corpo lúteo, nas concentrações plasmáticas de progesterona (P4) e nas concentração plasmáticas de progesterona das fêmeas que ovularam (P4-OV), 12 dias após a aplicação de hCG, em búfalas sincronizadas com dispositivos intravaginais de P4 para IATF na época reprodutiva desfavorável - Pariquera-Açu, 2003

Grupos	N	Área do CL (mm ²)	P4 (ng/ml)	P4-OV (ng/ml)
G1 (500UI eCG)	10	$28,4 \pm 8,6$	$2,7 \pm 1,2$	$3,1 \pm 1,0$
G2 (400UI eCG)	11	$31,6 \pm 10,3$	$3,3 \pm 2,9$	$4,0 \pm 3,2$

4.5 EXPERIMENTO 5: TAXAS DE CONCEPÇÃO DE FÊMEAS BUBALINAS SUBMETIDAS À SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO PARA IATF COM DISPOSITIVO INTRAVAGINAL DE PROGESTERONA ASSOCIADO A DIFERENTES DOSES DE eCG (400 VERSUS 500UI) E AO hCG (1000UI), NA ESTAÇÃO REPRODUTIVA DESFAVORÁVEL

As taxas de prenhez após a IATF - conforme a dose de eCG utilizada - podem ser verificadas na Tabela 16. As diferentes doses de eCG utilizadas não influenciaram os índices de prenhez entre os grupos ($P>0,05$). As fêmeas do G1 (500UI de eCG) apresentaram 42,6% (23/54) de taxa de prenhez, e as do G2 (400UI de eCG) apresentaram taxa de prenhez de 43,1% (22/51). A taxa de prenhez total foi de 42,9% (45/105).

Tabela 16 - Efeito de diferentes doses de eCG (400 versus 500UI) na taxa de prenhez, em búfalas sincronizadas com dispositivos intravaginais de P4 para IATF na época reprodutiva desfavorável - Vale do Ribeira, 2003

Grupos	N	Taxa de Prenhez (%)
G1 (500UI eCG)	54	42,6 (23/54)
G2 (400UI eCG)	51	43,1 (22/51)
TOTAL	105	42,9 (45/105)

5 DISCUSSÃO

O período do ano – novembro a fevereiro - no qual foram realizados os experimentos constantes deste trabalho é considerado desfavorável para a reprodução da espécie bubalina, que é negativamente influenciada pelo aumento da quantidade de luz diária, característico dessa época no Brasil (BARUSELLI, 1994a, DANEV, 1997; RAZDAN; KAKER, 1980; SHAH, 1988; ZICARELLI, 1994).

A base do protocolo de sincronização da ovulação - P4 + BE - utilizada nos experimentos realizados na presente investigação é bastante discutida na literatura. Os efeitos atribuídos a tais hormônios quanto à simulação da fase luteínica, à atresia folicular, à emergência da nova onda de crescimento folicular e à sincronização da ovulação são relatados por vários pesquisadores (BÓ et al., 1994a; BÓ et al. 1995; DRIANCOURT, 2000; GORDON, 1976; LANE et al., 2001; ODDE, 1990; ROCHA, 2000; WISHART, 1972).

Os diâmetros máximos dos folículos dominantes observados nos experimentos 1, 2 e 4 foram superiores aos achados de Bartolomeu (2003) que, comparando a utilização de protocolos CIDR[®] e CRESTAR[®] na dinâmica folicular de búfalas em período reprodutivo desfavorável obteve, respectivamente, $0,99 \pm 0,29\text{cm}$ e $0,92 \pm 0,28\text{cm}$. Os resultados dos experimentos citados também foram superiores àqueles constantes do trabalho de Moura (2003), que utilizou três diferentes concentrações de BE (1,0mg, 2,5mg e 5,0mg) associadas ao CIDR[®] no D0, e constatou diâmetros máximos dos folículos dominantes de $1,03 \pm 0,05\text{cm}$, $1,16 \pm 0,31\text{cm}$ e $0,92 \pm 0,16\text{cm}$, respectivamente. Mas, embora Bartolomeu (2003) e Moura (2003) não tenham associado aos protocolos utilizados o tratamento com eCG, é possível que a diferença de diâmetros dos folículos não se deva ao uso dessa gonadotrofina nos experimentos objeto desta pesquisa pois, no experimento 1, os animais tratados com ou sem eCG apresentaram diâmetros similares ($13,4 \pm$

1,7 versus $12,6 \pm 3,0\text{mm}$; $P>0,05$). Além disso, Baruselli et al. (2004a) e Marques et al. (2003) também constataram que, em bovinos, o tratamento com eCG não influencia o diâmetro do folículo dominante.

No experimento 1, o intervalo entre a retirada do dispositivo intravaginal de liberação de P4 e a ovulação não apresentou diferença significativa entre os grupos que receberam ou não o tratamento com eCG - $68,0 \pm 9,0\text{h}$ e $78,0 \pm 12,0\text{h}$, respectivamente - ($P>0,05$). Entretanto, tais achados são superiores àqueles relatados por Bartolomeu (2003) que, como anteriormente mencionado, comparou os protocolos CIDR[®] e CRESTAR[®] ($62 \pm 5,6\text{h}$ versus 64h). Para o grupo que recebeu 2,5mg de BE, Moura (2003) encontrou intervalo semelhante àquele do experimento 1 desta tese (72h). Esses autores não utilizaram eCG na realização dos experimentos, e no presente estudo a administração desse hormônio não teve influência significativa no intervalo entre a retirada do dispositivo intravaginal de P4 e a ovulação. Da mesma forma – e como observado no experimento 1 -, o intervalo entre a retirada do dispositivo intravaginal de P4 e a ovulação não apresentou diferença estatística no experimento 4, que testou diferentes doses de eCG no momento da retirada do dispositivo intravaginal de P4 (G1=500UI eCG - $71,1 \pm 11,7$ versus G2=400UI eCG - $75,0 \pm 5,5\text{h}$). Portanto, a estimulação de crescimento folicular atribuída ao eCG pode não ser fator preponderante para a antecipação ou o atraso das ovulações em tratamentos de sincronização da ovulação para a IATF em búfalas na estação reprodutiva desfavorável. Também na espécie bovina, Baruselli et al. (2004a) e Marques et al. (2003) verificaram que o uso do eCG não tem influência sobre o intervalo entre a retirada do CIDR[®] e a ovulação.

Já com relação à taxa de ovulação do experimento 1, esta foi numericamente maior no grupo que recebeu eCG (G2; 70%) do que naquele que

não o recebeu (G1; 44,4%). A baixa taxa de ovulação observada no G1 está em concordância com os resultados obtidos por Bartolomeu (2003) - 20 e 40% -, Moura (2003) - 20% - e Singh et al. (1984) - 14% -, que trabalharam com búfalas no período reprodutivo desfavorável. Como já mencionado, tais autores não utilizaram o eCG associado ao protocolo de sincronização da ovulação para a IATF. Dessa forma, e embora se constitua em um aumento simplesmente numérico, a utilização do eCG pode ter promovido melhores taxas de ovulação. As taxas de ovulação obtidas por Singh et al. (1983) com a utilização (58,3%) ou não (33,3%) de eCG associado a dispositivos de liberação de P4 em fêmeas bubalinas corroboram essa hipótese. Além disso, Singh et al. (1988b) e Singh et al. (1988a) relatam taxas de ovulação de 65% e 100% em búfalas que receberam eCG. Nesses dois experimentos, os autores verificaram que, nos grupos controle (sem tratamento), nenhuma búfala apresentou ovulação.

Em bovinos, o tratamento com eCG também aumentou a taxa de ovulação em novilhas e vacas no período pós-parto. Baruselli et al. (2004a) verificaram taxa de ovulação de 76% para novilhas que receberam eCG, e de 50% para aquelas não submetidas a essa gonadotrofina. Marques et al. (2003) observaram taxas de ovulação de 60% sem eCG e de 76% com eCG, em vacas de corte no período pós-parto. De acordo com tais autores, o grupo de fêmeas que recebeu um indutor de ovulação - BE (D9) + eCG (D8) associado ao CIDR[®] apresentou taxa de ovulação maior (80,8%) do que aquele no qual o BE não foi administrado (54,2%).

As taxas de ovulação do experimento 4 - cujo objetivo era avaliar o efeito da redução das doses de eCG no momento da retirada do dispositivo de P4 - foram semelhantes: 500UI=70,0% versus 400UI=72,7%. Assim, e no experimento ora descrito, a redução das doses de eCG não influenciou negativamente a taxa de

ovulação. Reis et al. (2004) também não verificaram efeito negativo da redução da dose de eCG em receptoras de embrião bovino tratadas com 400, 500 e 600UI de eCG.

No experimento 2, a taxa de ovulação também não foi influenciada pela redução das doses de hCG (1500UI=66,7% versus 1000UI=66,7%). Resultados semelhantes foram observados em fêmeas bovinas submetidas à IATF com a associação de 500, 1000 e 1500UI de hCG ao CIDR[®] (MARQUES et al., 2004).

El-Belely et al. (1987) e Markandeya e Bharkad (2002) citam que, durante o período reprodutivo desfavorável da espécie bubalina, é possível obter de 80 a 100% de taxa de indução ao estro com a utilização de dispositivos de liberação de P4 -sozinhos ou associados ao estradiol –, mas Luthra, Khar e Singh (1994) e Singh et al. (1984) registram que as taxas de concepção decorrentes desse tipo de tratamento variam de 14 a 43%.

No experimento 1, a taxa de prenhez foi numericamente menor para os animais que não receberam eCG (22,2%, 2/9) do que para aqueles que o receberam (60%, 6/10). O mesmo foi observado quando foram computadas apenas as taxas de prenhez dos animais que ovularam: as búfalas do G1 apresentaram taxa de prenhez de 50% (2/4), e aquelas do G2 apresentaram taxa de prenhez de 85,7% (6/7). Embora os tratamentos não tenham influenciado significativamente a taxa de prenhez observada, houve tendência de melhora desse parâmetro nas fêmeas que receberam eCG.

Os benefícios atribuídos à utilização do eCG em animais em anestro ou com baixa condição nutricional são relatados na literatura (BÓ et al., 2001; CUTAIA et al., 2003). Na espécie bubalina, Singh et al. (1983) observaram taxas de concepção de búfalas em anestro estacional que receberam eCG de 41,6% (5/12), e de 8,3%

(1/12) naquelas que não receberam o hormônio. Saini et al. (1986) observaram resultado semelhante nas taxas de concepção de búfalas que receberam (42,8%) ou não (0%) o eCG. Shah, Willemse e Van de Wiel (1987) relatam taxas de prenhez de 53,3% (eCG) e 0% (controle), e Virakal et al. (1988) detectaram diferenças quando comparadas as porcentagens de novilhas e de búfalas prenhes após a utilização de eCG (70 versus 39,13%).

Em bovinos, resultados semelhantes quanto à associação ou não de eCG a dispositivos intravaginais ou implantes subcutâneos de liberação de P4 também são relatados. BÓ et al. (2001) obtiveram taxas de prenhez de 71,4% em vacas que receberam o eCG, e de 46,6% naquelas que não o receberam. Singh, Khurana e Inderjeet (1998) observaram taxas de prenhez de 71,8% para novilhas, e de 48,6% para vacas; no grupo controle - sem tratamento -, nenhum animal ficou prenhe. Cutaia et al. (2003) verificaram diferença significativa com a utilização do eCG na taxa prenhez de vacas que apresentavam somente folículos no início do tratamento (31,3% versus 50,9%), e de vacas que se encontravam em anestro (30,6% versus 54,2%). Baruselli et al (2004b) verificaram diferença significativa nas taxas de concepção, ao compararem o uso (51,9%) ou não (38,8%) de eCG em vacas de corte. Assim, os resultados do presente experimento, em concordância com os observados na literatura, sugerem que o tratamento com eCG no momento da retirada dos dispositivos de P4 aumenta as taxas de ovulação e de prenhez em fêmeas bubalinas na estação reprodutiva desfavorável.

A área do CL e as concentrações de P4 não foram influenciadas significativamente pelas diferentes doses de eCG utilizadas nos experimentos 1 e 4 ($P>0,05$). Mesmo em doses diferentes ou sem a sua utilização, os efeitos benéficos na área do CL e, conseqüentemente, no aumento nas concentrações de P4

atribuídos ao eCG (BINELLI et al., 2001) não foram observados no presente trabalho. Porém, Baruselli et al. (2004a) e Marques et al. (2003) citam diferença significativa na concentração plasmática de P4 ($P < 0,05$) de vacas e novilhas de corte que receberam ($8,06 \pm 0,9$ e $3,4 \pm 0,6$ ng/ml) ou não ($4,5 \pm 0,7$ ng/ml e $1,3 \pm 0,2$ ng/ml) eCG associado a dispositivos intravaginais de P4 para a IATF.

No experimento 2, as doses de hCG (1000 e 1500UI) utilizadas não influenciaram a área do CL ($24,8 \pm 9,2$ versus $28,3 \pm 17,2$ mm²) e a concentração plasmática de P4 ($2,3 \pm 1,4$ versus $2,4 \pm 1,3$ ng/ml). A capacidade do hCG de induzir a formação de CL acessório quando administrado em fase luteínica inicial, aumentando a concentração plasmática de P4 e melhorando as taxas de concepção pós IA, é citada por vários autores (DE RENSIS; PETERS, 1999; LÓPEZ-GATIUS, 2000; MARQUES et al., 2002; SANTOS et al., 2000, SCHIMITT et al., 1996a; SCHIMITT et al., 1996b). O hCG permanece por um período maior na corrente sangüínea e dissocia-se mais lentamente dos receptores de LH, promovendo maior produção de P4 através da diferenciação das células da granulosa em células luteínicas grandes (SCHIMITT et al., 1996a). Porém, o aumento na concentração plasmática de P4 não foi observado no presente experimento.

Provavelmente, nos experimentos 1, 2 e 4 não houve aumento na área do CL e nas concentrações plasmáticas de P4 porque todos os grupos receberam hCG e, na maioria dos tratamentos, eCG. Desta forma, como tanto o hCG quanto o eCG têm a propriedade de aumentar a área do CL e as concentrações plasmáticas de P4, o uso simultâneo de ambos não promoveu diferenças entre os grupos.

Nos experimentos 3 e 5, a taxa de prenhez encontrada não sofreu qualquer influência significativa das doses de hCG (G1=1000UI - 53,0%; G2=1500UI - 53,8%) e de eCG (42,6%; G1=500UI versus 43,1%; G2=400UI). Os resultados obtidos foram

superiores aos achados de Moura (2003) – 10% -, Singh et al. (1983) – 8,3% - e Singh et al. (1984) - 14% -, que trabalharam com búfalas em anestro sem a utilização de eCG ou hCG. Porém, são semelhantes aos relatados por Saini et al. (1986) - 42,8% -, Shah, Willemse e Van de Wiel (1987) - 53,3% - e Singh et al. (1983) -41,6%. Estes autores associaram o eCG aos dispositivos de liberação de P4, o que pode ter favorecido a semelhança nos resultados.

A literatura registra vários resultados positivos quanto à utilização do protocolo *Ovsynch* em búfalas durante a estação reprodutiva favorável (BARTOLOMEU et al., 2001; BARUSELLI et al., 2001; BARUSELLI; MADUREIRA; MARQUES, 2001; BARUSELLI; CARVALHO, 2003a), desde que os animais se encontrem em boa condição corporal (BARUSELLI; CARVALHO, 2003a; RIBEIRO FILHO et al., 2003). Além do mais, Baruselli, Madureira e Marques (2001), Baruselli e Carvalho (2003a) e Moura (2003) verificaram que a utilização do protocolo *Ovsynch* em búfalas, durante a estação reprodutiva desfavorável, resulta em baixas taxa de prenhez (6,9, 28,2 e 10,3%, respectivamente). Desta forma, os resultados satisfatórios obtidos no presente estudo com a utilização de dispositivos de liberação de P4 associados a promotores de crescimento folicular (eCG) e a indutores de ovulação (hCG) na estação reprodutiva desfavorável possibilitam a implantação da IA na espécie bubalina durante o ano todo, favorecendo a introdução de material genético superior e distribuindo os partos e a produção de leite homogeneamente.

A utilização de 400UI de eCG e 1000UI de hCG não influenciou negativamente as taxas de ovulação e de prenhez nos experimentos 2, 3, 4 e 5. Em bovinos, Marques et al. (2004) verificaram as seguintes taxas de prenhez após a administração de 1000UI (28,5%; 49/172) e 1500UI (31,4%; 54/172) de hCG. De acordo com tais autores, a administração de 500UI de hCG é suficiente para

proporcionar taxas de prenhez satisfatórias em vacas de corte, sem influenciar negativamente os resultados (28,8%; 51/177). No mesmo sentido, Reis et al. (2004) verificaram que a dose de 400UI de eCG, associada ao DIB[®] para sincronização da ovulação em receptoras de embrião, proporciona taxa de prenhez semelhante (42,3%; $P>0,05$) àquelas obtidas com dosagens de 500UI (36%) e 600UI (42,9%). Tais resultados, e aqueles obtidos nos experimentos realizados na presente investigação, sugerem que doses de 400UI de eCG e de 1000UI de hCG, associadas a dispositivos intravaginais de liberação de P4, podem ser indicadas para a sincronização da ovulação visando a IATF em búfalas no período reprodutivo desfavorável, minimizando os custos de implantação do protocolo.

6 CONCLUSÕES

Nas condições de realização do presente trabalho, e dentro das finalidades propostas, é possível concluir que:

- Os tratamentos utilizados induziram crescimento folicular e ovulação em búfalas durante a estação reprodutiva desfavorável;
- As dosagens de hCG (1000UI e 1500UI) e de eCG (400UI e 500UI) utilizadas não interferiram no crescimento folicular, nas taxas de ovulação, na área do corpo lúteo, nas concentrações plasmáticas de progesterona e nas taxas de prenhez;
- As dosagens de 400UI de eCG e de 1000UI de hCG podem ser utilizadas nos protocolos de sincronização da ovulação para IATF em búfalas durante a estação reprodutiva desfavorável.

REFERÊNCIAS¹

¹ Conforme as diretrizes para apresentação de dissertações e teses na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. 4. ed. São Paulo: FMVZ/USP, 2003. 84 p.

- ANDURKAR, S. B.; KADU, M. S.; CHINCHKAR, S. R.; SADEKAR, R. D. Serum progesterone profile in buffaloes treated with CIDR-device and combinations. **Indian Journal of Animal Reproduction**, v. 18, n. 2, p. 104-107, 1997.
- BARROS, C.M. Controle farmacológico do ciclo estral e superovulação em zebuínos de corte. In: SIMPÓSIO SOBRE O CONTROLE FARMACOLÓGICO DO CICLO ESTRAL EM RUMINANTES, 1., 2000, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2000. p. 158-189.
- BARROS, C. M.; GAMBINI, A. L. G.; MOREIRA, M. B. P.; CASTILHO, C. Synchronization of ovulation in Gir cows with GnRH-PGF-GnRH treatment. **Reproduction in Domestic Ruminants**, v. 4, p. 516, 1998.
- BARROS, C. M.; MOREIRA, M. B. P.; FIGUEIREDO, R. A.; TEIXEIRA, A. B.; TRINCA, L. A. Synchronization of ovulation in beef cows (*Bos indicus*) using GnRH, PGF₂ α and estradiol benzoate. **Theriogenology**, v. 53, n. 5, p.1121-1134, 2000.
- 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. 149 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.
- BARTOLOMEU, C. C.; DEL REI, A. J. M.; MADUREIRA, E. H.; SOUZA, A. J.; SILVA, A. O.; BARUSELLI, P. S. Inseminação artificial em tempo fixo com sincronização da ovulação em bubalinos utilizando-se CIDR-B, Crestar e Ovsynch. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 25, n. 3, p. 334-336, 2001.
- BARUSELLI, P. S.; MADUREIRA, E. H.; BARNABE, V. H.; BARNABE, R. C.; VISINTIN, J. A.; OLIVEIRA, C. A.; AMARAL, R. Dinâmica folicular em búfalas submetidas à sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v. 27, p. 210, 1999. Suplemento.
- BARUSELLI, P. S. **Atividade ovariana e comportamento reprodutivo no período pós-parto em búfalos (*Bubalus bubalis*)**. 1992. 99 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1992.
- BARUSELLI, P. S. Basic requeriments for artificial insemination and embryo transfer in buffaloes. **Buffalo Journal**, p. 53-60, 1994a. Supplement 2.
- BARUSELLI, P. S. Estudo da dinâmica folicular para o emprego de biotecnologias da reprodução em bubalinos. In: CONGRESSO NORDESTINO DE PRODUÇÃO ANIMAL, 1., 1998, Fortaleza. **Anais...** 1998. p.79-96.

BARUSELLI, P.S. Sexual behaviour in buffaloes. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 4., 1994b, São Paulo. **Proceedings...** São Paulo, 1994b. p. 158-173.

BARUSELLI, P. S.; AMARAL, R.; BARUFI, F. B.; VALENTIM, R.; MARQUES, M. O. Lecirelin and buserelin (gonadotrophin releasing hormone agonists) are equally effective for fixed time insemination in buffalo. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v. 38, n. 3, p. 142-145, 2001.

BARUSELLI, P. S.; BARNABE, V. H.; BARNABE, R. C.; VISINTIN, J. A.; SOUZA, A. C.; IKEDA, J. A. Climate fails to affect conception rate of buffalo cows artificially inseminated. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 5., 1997, Caserta. **Proceedings...** 1997. p. 745.

BARUSELLI, P. S.; CARVALHO, N. A. T. Artificial insemination in developing countries. In: CONGRESSO NAZIONALE SULL'ALLEVAMENTO DEL BUFALO, 2., 2003a, Monterotondo. **Proceedings...** 2003a. p. 177-192.

BARUSELLI, P. S.; CARVALHO, N. A. T. Controle do desenvolvimento folicular para emprego de biotecnologias da reprodução em bubalinos (*Bubalus bubalis*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, n. 2, p. 94-102, 2003b.

BARUSELLI, P. S.; CARVALHO, N. A. T.; HENRIQUEZ, C. E. P.; AMARAL, R., NICHÍ, M.; REICHERT, R. H. Use of progesterone associated to Ovsynch protocol for timed artificial insemination in buffalo. In: CONGRESSO NAZIONALE SULL'ALLEVAMENTO DEL BUFALO, 2., 2003a, Monterotondo. **Proceedings...** 2003a. p.265-268.

BARUSELLI, P. S.; CARVALHO, N. A. T.; HENRIQUEZ, C. H. P.; NICHÍ, M. Pre-synchronization with GnRH 7 days before ovsynch protocol for timed insemination in buffalo. In: SYMPOSIUM OF AMERICAS, 1., 2003b, Belém. **Proceedings...** Belém: Associação Paraense de Criadores de Búfalos, 2003b . p. 414-417.

BARUSELLI, P. S.; MADUREIRA, E. H.; MARQUES, M. O. Programas de I.A. a tiempo fijo em bos indicus In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUCCIÓN ANIMAL, 4., 2001, Córdoba. **Proceedings...** 2001. p.95-116.

BARUSELLI, P. S.; REIS, E. L.; CARVALHO, N. A. T.; CARVALHO, J. B. P. eCG increase ovulation rate and plasmatic progesterone concentration in nelore (*Bos indicus*) heifers treated with progesterone releasing device. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ANIMAL REPRODUCTION-ICAR, 1., 2004a, Porto Seguro. **Proceedings...** 2004a.

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

BERBER, R. C. A.; BARUSELLI, P. S.; MADUREIRA, E. H. Avaliação do aproveitamento do estro subsequente à sincronização da ovulação com protocolos "OVSYNCH" (GnRH vs LH) em bubalinos (*Bubalus bubalis*). **Revista Brasileira da Reprodução Animal**, v. 25, p. 379-381, 2001.

- BERBER, R. C. A.; MADUREIRA, E. H.; BARUSELLI, P. C. Comparison of two ovsynch protocols (GnRH versus LH) for fixed timed insemination in buffalo (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, v. 57, n. 5, p. 1421-1430, 2002.
- BERBER, R. C. A.; SILVA, M. A.; CARDOSO, M. J. L. Sincronização da ovulação utilizando protocolos ovsynch em bovinos e bubalinos: revisão. **Bioscience Journal**, v. 18, n. 1, p. 103-120, 2002.
- BINELLI, M.; THATCHER, W. W.; MATTOS, R.; BARUSELLI, P. S. Anti-luteolytic strategies to improve fertility in cattle. **Theriogenology**, v. 56, n. 9, p. 1451-1463, 2001.
- BÓ, G. A.; ADAMS, G. P.; CACCIA, M.; MARTINEZ, M.; PIERSON, R. A.; MAPLETOFT, R. J. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 39, n. 3, p. 193-204, 1995.
- BÓ, G. A.; ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A.; MAPLETOFT, R. J. Effects of progestogen plus estradiol – 17 β treatment on superovulatory response in beef cattle. **Theriogenology**, v. 45, n. 5, p. 897-910, 1996.
- BÓ, G. A.; ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A.; TRIBULO, H. E.; CACCIA, M.; MAPLETOFT, R. J. Follicular wave dynamics after estradiol – 17 B treatment of heifers with or without a progestogen implant. **Theriogenology**, v. 41, n. 1, p. 1555-1569, 1994a.
- BÓ, G. A.; CACCIA, M.; MARTINEZ, M.; ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A.; MAPLETOFT, R. J. The use of estradiol and progestogen treatment for the control of follicular wave dynamics in beef cattle. **Theriogenology**, v. 41, n. 1, p. 165, 1994b.
- BÓ, G. A.; CUTAIA, L.; BROGLIATTI, G. M.; MEDINA, M.; TRIBULO, R.; TRIBULO, H. Programas de inseminación artificial a tiempo fijo en Ganado bovino utilizando progestagenos y estradiol. In: SIMPOSIO INTERNACIONAL DE REPRODUCCIÓN ANIMAL, 4., 2001, Córdoba. **Proceedings...** 2001. p.117-136.
- BODHIPAKSHA, P.; CHANTARAPRATEEP, P.; USANAKORNKL, S. In: CONGRESS INTERNATIONAL ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 1994, Illinois. **Proceedings...** 1994. v. 3, p. 347.
- BROADBENT, P. J.; TREGASKES, L. D.; DOLMAL, D. F.; FRANKLIN, M. F.; JONES, R. L. Synchronization of estrus in embryo transfer recipients after using a combination of PRID or CIDR-B plus PGF $_{2\alpha}$. **Theriogenology**, v. 39, n. 5, p. 1055-1065, 1993.
- CASTILHO, C.; GAMBINI, A. L. G.; FERNANDES, P.; TRINCA, L. A.; TEIXEIRA, A. B.; BARROS, C. M. Synchronization of ovulation in crossbred dairy heifers using gonadotrophin-releasing hormone agonist, prostaglandin F $_{2\alpha}$ and human chorionic gonadotrophin or estradiol benzoate. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 1, p. 91-101, 2000.

CATILLO, G.; MACCIOTTA, N. P.; CARRETA, A.; CAPPIO-BORLINO, A. Effects of age and calving season on lactation curves of milk production traits in Italian water buffaloes. **Journal Dairy Science**, v. 85, n. 5, p. 1298-306, 2002.

CAVALIERI, J.; RUBIO, I.; KINDER, J. E.; ENTWISTLE, K. W.; FITZPATRICK, L. A. Synchronization of estrus and ovulation and associated endocrine changes in *Bos indicus* cows. **Theriogenology**, v. 47, n. 4, p. 801-814, 1997.

CHAUHAN, S.; SHARMA, R. D.; SINGH, G. B. Compatibility between serum progesterone profile and rectal clinical findings in normal cycling, suboestrus, and after treatment with prostaglandin in suboestrus buffaloes. **Animal Reproduction Science**, v. 8, n. 1-2, p. 137-142, 1985.

CHENAULT, J. R.; KRATZER, D. D.; RZEPKOWSKI, R. A.; GOODWIN, M. C. LH and FSH response of holstein heifers to fertirelin acetate, gonadorelin and buserelin. **Theriogenology**, v. 34, n. 1, p. 81-98, 1990.

CUTAIA, L.; VENERANDA, G.; TRIBULO, R.; BARUSELLI, P. S.; BÓ, G. A. Programas de inseminación artificial a tiempo fijo en rodeos de cría: factores que lo afectan y resultados productivos. In: SIMPOSIO INTERNACIONAL DE REPRODUCCIÓN ANIMAL, 5., 2003, Cordoba. **Proceedings...** 2003. p.119-132.

DANEV, A. D. Oestrous behaviour in buffaloes during winter. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 5., 1997, Caserta. **Proceedings...** 1997. p. 725.

DE RENSIS, F.; PETERS, A. R. The control of follicular dynamics by PGF_{2α}, GnRH, hCG and oestrus synchronization in cattle. **Reproduction Domestic Animal**, v. 34, p. 49-59, 1999.

DIAZ, S.; MIES FILHO, A. Indução do estro com prostaglandina F_{2α} em búfalas em lactação. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.7, n. 2, p. 11-22, 1983.

DRIANCOURT, M. A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. **Theriogenology**, v. 54, n. 6, p. 1211-1239, 2000.

DUARTE, M. V.; CAVALHEIRO, E. P.; VALENTIM, R. Indução de cios de vacas nelore com o uso do sistema progestágeno-estrógeno-prostaglandina e progestágeno-estrógeno-prostaglandina-PMSG. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v. 27, n. 1, p. 230, 1999. Suplemento.

DUNN, T. G.; KALTERBACH, G. C. Nutrition and the postpartum interval of de ewe, sow and cow. **Journal of Animal Science**, v. 51, p. 29, 1980.

EL-BELELY, M. S.; EISSA, H. M.; EZZO OMAIMA, H.; GHONEIM, I. M. Assessment of fertility by monitoring changes in plasma concentrations of progesterone, oestradiol – 17β androgens and oestrone sulphate in suboestrous buffalo cows treated with prostaglandin F_{2α}. **Animal Reproduction Science**, v. 40, n. 1-2, p. 7-15, 1995.

EL-BELELY, M. S.; ZAKI, K.; ABOU-AHMED, M. M.; GRUNERT, E. Influence of progesterone coils (PRID) on some plasma constituents in buffaloes. **British Veterinary Journal**, v. 143, n. 4, p. 344-347, 1987.

EL-FOULY, M. A.; KORBY, E.; EL-SOBHY, H. E. Pos-partum ovarian activity in suckled and milked buffaloes. **Theriogenology**, v. 5, n. 2, p. 69-81, 1976.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO), FAOSTAT – Agriculture data. Disponível em
<<http://faostat.fao.org/faostat/collections?version=ext&hasbulk=0&subset=agriculture>>. Acesso em: 22 mar. 2004.

GAMBINI, A. L. G.; MOREIRA, M. B. P.; CASTILHO, C.; BARROS, C. M. Desenvolvimento folicular e sincronização da ovulação em vacas da raça Gir. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 22, n. 4, p. 201-210, 1998.

GORDON, I. Controlled breeding in cattle. I -Hormones in the regulation, oestral control, and set-time artificial insemination. **Animal Breed Abstract**, v. 44, p. 265-275, 1976.

HANLON, D. W.; WILLIAMSON, J. J.; WICHTEL, J. J.; STEFFERT, I. J.; CRAIGIE, A. L.; PFEIFFER, D. U. The effect of estradiol benzoate administration on estrous response and synchronized pregnancy rate in dairy heifers after treatment with exogenous progesterone. **Theriogenology**, v. 45, n. 4, p. 775-785, 1996.

HONLES, C. Role of LH and FSH in ovarian function. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 161, p. 25-30, 2000.

JACKSON, P. S.; JOHNSON, C. T.; FURR, B. J.; BEATTIE, J. F. Influence of stage of oestrous cycle on time of oestrus following cloprostenol treatment in the bovine. **Theriogenology**, v. 12, n. 3, p. 153-67, 1979.

KASTELIC, J. P.; McCARTNEY, D. H.; OLSON, W. O.; BARTH, A. D.; GARCIA, A.; MAPLETOFT, R. J. Estrus synchronization in cattle using estradiol, melengestrol acetate and PGF. **Theriogenology**, v. 46, n. 7, p. 1295-1304, 1996.

KASTELIC, J. P.; KNOPF, L.; GINTHER, O. J. Effect of day of prostaglandin F_{2α} treatment on selection and development of the ovulatory follicle in heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 23, n. 3, p. 169-80, 1990.

KESLER, D. J.; FAVERO, R. J. Estrus synchronization in beef females with norgestomet and estradiol valerate. **Agricultural Practice**, v. 17, p. 12-17, 1996.

LANE, E. A.; AUSTIN, E. J.; ROCHE, J. F.; CROWE, M. A. The effect of estradiol benzoate on synchrony of estrus and fertility in cattle after removal progesterone-releasing intravaginal device. **Theriogenology**, v. 55, n. 9, p. 1807-1818, 2001.

LARSON, L. L.; BALL, P. J. H. Regulation of estrous cycles in dairy cattle: A review. **Theriogenology**, v. 38, n. 2, p. 255-267, 1992.

LOPEZ-GATIUS, F. Reproductive performance of lactating dairy cows treated with cloprostenol, hcg and estradiol benzoate for synchronization of estrus followed by timed AI. **Theriogenology**, v. 54, n. 4, p. 551-558, 2000.

LOPEZ-GATIUS, F.; LOPEZ-BEJAR, M. Reproductive performance of dairy cows with ovarian cysts after different GnRH and cloprostenol treatments. **Theriogenology**, v. 58, n. 7, p. 1337-1348, 2002.

LUTHRA, R. A.; KHAR, S. K.; SINGH, K. P. Oestrus induction and synchronization in cows and buffaloes with synthetic progestagens. **Indian Journal of Animal Science**, v. 10, p. 1060-1061, 1994.

MACMILLAN, K. L. Pharmacological control of the oestrous cycle to improve the reproductive performance of cattle. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 23, n. 2, p. 61-64, 1999.

MACMILLAN, K. L.; PETERSON, A. J. A new intravaginal progesterone releasing device for cattle (CIDR-B) for estrous synchronization, increasing pregnancy rates and the treatment of post-partum anestrous. **Animal Reproduction Science**, v. 33, n. 1-4, p. 1-25, 1993.

MACMILLAN, K. L.; THATCHER, W. W. Effects of an agonist of gonadotropin-releasing hormone on ovarian follicles in cattle. **Biology Reproduction**, v. 45, p. 883-889, 1991.

MACMILLAN, K. L.; HENDERSON, H. V. Analyses of the variation in the interval from an injection of prostaglandin $F_{2\alpha}$ to oestrus as a method of studying patterns of follicle development during dioestrus in dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 6, n. 4, p. 245-54, 1984.

MACMILLAN, K. L.; SEGWAGWE, B. V. E.; PINO, C. S. Associations between the manipulation of patterns of follicular development and fertility in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 78, n. 3-4, p. 327-344, 2003.

MADAN, M. L. Status of reproduction in female buffalo. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 2., 1988, New Delhi. **Proceedings...** Nova Delhi. p. 89-100, 1988.

MADAN, M. L.; DAS, S. K.; PALTA, P. Application of reproductive technology to buffaloes. **Animal Reproduction Science**, v. 42, n. 1-4, p. 299-306, 1996.

MARKANDEYA, N. M.; BHARKAD, G. P. Induction and synchronization of oestrus in buffaloes with norgestomet ear implants. **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 72, n. 2, p. 143-144, 2002.

MARQUES, M. O.; CAMPOS FILHO, E. P.; MANTOVANI, A. P.; REIS, E. L.; NICHI, M.; BARUSELLI, P. S. Adequação da dose de hCG (Vetecor[®]) para indução da ovulação em protocolos de inseminação artificial em tempo fixo. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES, 18., 2004, Barra Bonita. **Anais...** 2004.

- MARQUES, M. O.; MADUREIRA, E. H.; BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S. Ovarian ultrasonography and plasma progesterone concentration in *bos taurus* x *bos indicus* heifers administered different treatments on day 7 of estrous cycle. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, 2002. p. 548.
- 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 *Bos taurus* X *Bos indicus* no período pós-parto. In: SIMPOSIO INTERNACIONAL DE REPRODUCCION ANIMAL, 5., 2003, Cordoba. **Proceedings...** 2003. p. 392.
- MOIOLI, B. M.; NAPOLITANO, F.; PUPPO, S.; BARILE, V. L.; TERZANO, G. M.; BORGHESE, A.; MALFATTI, A.; CATALANO, A.; PILLA, A. M. Patterns of oestrus, time of LH release and ovulation and effects of time of artificial insemination in mediterranean buffalo cows. **Animal Science**, v. 66, n. 1, p. 87-91, 1998.
- MOURA, A. J. D. R. **Sincronização da ovulação com dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR®) associado a estrógeno e prostaglandina F_{2α} em búfalas (*Bubalus bubalis*) tratadas em estações reprodutivas distintas.** 2003. 127 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.
- MOURA, M. T.; MARQUES, M. O.; BARUSELLI, P. S. Efeito do benzoato de estradiol na sincronização com Crestar e eCG para inseminação artificial em tempo fixo em vacas de corte lactantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, n. 3, p. 432-434, 2003.
- MURPHY, B. D.; MARTINUK, S. D. Equine chorionic gonadotrophin, **Endocrine Reviews**, v. 12, p. 27-44, 1991.
- NEBEL, R. L.; JOBST, S. M. Evaluation of a systematic breeding programs for lactanting dairy cows: a review. **Journal Dairy Science**, v. 81, n. 4, p. 1169-1174, 1998.
- NETT, T. M.; TURZILLO, A. M.; BARATTA, M.; RISPOLI, L. A. Pituitary effects of steroid hormones on secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, n. 1-2, p. 33-42, 2002.
- OBI-REDDY, A.; TRIPATHI, V. N.; RAINA, V. S. Effect of climate on the incidence of oestrus and conception rate in murrah buffaloes. **Indian Journal Animal Science**, v. 57, p. 204-207, 1987.
- ODDE, K. G. A review of synchronization of estrus in postpartum cattle. **Journal of Animal Science**, v. 68, n. 3, p. 817-830, 1990.
- OHASHI, O. M. Estrus detection. In: INTERNATIONAL TRAINING COURSE ON BIOTECHNOLOGY OF REPRODUCTION IN BUFFALOES, 2., 1994, São Paulo, **Proceedings...** 1994. p. 7-13.

PARGAONKAR, D. R.; BAKSHI, S. A.; JOSHI, S. A. Induction/synchronization of oestrus in buffaloes. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 3., 1990, New Delhi. **Proceedings...** 1990. v. 3, p. 119-120.

PARGAONKAR, D. R.; BAKSHI, S.; JOSHI, S. A. Induction/synchronization of oestrus in buffaloes. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 2., 1988, New Delhi. **Proceedings...** 1988. v. 1, p. 68.

PORRAS, A. I.; GALINA, C. S. Utilización de progestagenos para la manipulación del ciclo estral bovino. **Veterinaria Mexico**, v. 23, p. 31-36, 1992.

PORTO-FILHO, R. M. **Emprego da radiotelimetria na detecção do estro em fêmeas bubalinas**: luteólise durante duas fases do ciclo estral, ultra-sonografia da ovulação e perfis hormonais. 2000.112 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

PRATT, S. L.; SPITZER J. C.; BURNS, G. L.; PLYLER, B. B. Luteal function, estrus response, and pregnancy rate after treatment with norgestomet and various dosages of estradiol valerte in suckled cows. **Journal of Animal Science**, v. 69, n. 7, p. 2721-2726, 1991.

PRICE, C. A.; WEBB, R. Ovarian response to hCG treatment during the oestrus cycle in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 86, p. 303-308, 1989.

PURSLEY, J. R.; KOSOROK, M. R.; WILTBANK, M. C. Reproductive management of lactating dairy cows using synchronization of ovulation. **Journal Dairy Science**, v. 80, n. 2, p. 301-306, 1997.

PURSLEY, J. R.; MEE, M. O.; WILTBANK, M. C. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF_{2α} and GnRH. **Theriogenology**, v. 44, n. 7, p. 915-923, 1995.

PURSLEY, J. R.; WILTBANK, M. C.; STEVENSON, J. S.; OTTOBRE, J. S.; GARVERICK, H. A. Pregnancy rates per artificial insemination for cow and heifers inseminated at synchronization of ovulation. **Journal Dairy Science**, v. 80, n. 2, p. 295-300, 1997.

RAJAMAHENDRAN, R.; TAYLOR, C. Follicular dynamics and temporal relationships among body temperature oestrus the surge of luteinizing hormone and ovulation in holstein heifers treated with norgestomet. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 92, p. 461-467, 1991.

RAJAMAHENDRAN, R.; THAMOTHARAM, M. Effect of progesterone releasing intravaginal device (PRID) on fertility in the post-partum buffalo cow. **Animal Reproduction Science**, v. 6, n. 2, p. 111-118, 1983.

RAO, A. V. N.; SREEMANNARAYANA, O.; RAO, K. P. Oestrus response and fertility in postpartum anoestrous buffaloes treated with a progestagen, pregnant mare's serum gonadotropin and prostaglandin during the low breeding season. **Animal Reproduction Science**, v. 8, n. 1-2, p. 129-135, 1985.

RAO, A.R; RAO, S.V. Synchronisation of oestrus in buffaloes with norgestomet. **The Veterinary Record**, v. 105, p. 256, 1979.

RAO, A. V. N.; RAO, H. R. M.; VENKATARAMAIAH, P. Heat detection index in murrah buffaloes. **Indian Veterinary Journal**, v. 72, n. 6, p. 658-9, 1995.

RAO, N. M.; KODAGALI, S. B. Onset of oestrus, oestrus sings and optimum time of artificial insemination in surti buffaloes. **Indian Journal Animal Science**, v. 53, p. 553-555, 1983.

RAZDAN, M. N.; KAKER, M. L. Summer subfertility and endocrine profiles of buffalo. **Indian Dairyman**, v. 32, p. 459-463, 1980.

REIS, E. L.; NASSER, J. A.; MENEGATTI, L. F.; REZENDE, A. P.; BARUSELLI, P. S. Effect of time and dose of eCG treatment in Bos taurus X Bos indicus recipients treated with progesterone for timed embryo transfer. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ANIMAL REPRODUCTION-ICAR, 1., 2004, Porto Seguro. **Proceedings...** 2004.

RIBEIRO FILHO, A. L.; SILVA, R. D. G.; CHALHOUB, M.; GUSMÃO, A. L.; BITTENCOURT, R. F.; PORTELA, A. P. M.; ALMEIDA, A. K.; CAMPOS, A. M.; ADAMI, A.; MASCARENHAS, S. S. Influência do escore corporal sobre a taxa de prenhez em búfalas (*Bubalus bubalis*) submetidas a protocolo de sincronização de ovulação de ovulação para inseminação artificial em tempo fixo. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, n. 3, p. 471-472, 2003.

RIVERA, G. M.; GOÑI, C. G.; CHAVES, M. A.; FERRERO, S. B.; BÓ, G. A. Ovarian follicular wave synchronization and induction os ovulation in postpartum beef cows. **Theriogenology**, v. 49, n. 7, p. 1365-1375, 1998.

ROCHA, J. L. **Sincronização hormonal da onda folicular e do estro em novilhas de corte mestiças monitoradas por radiotelemetria**. 2000. 125 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

RYAN, M.; MIHM, M.; ROCHE, J. F. Effect of GnRH given before and after dominance on gonadotrophin response and fate of that follicle wave on postpartum cows. **Jounal of Reproduction and Fertility**, p. 21-61, 1998.

SÁ FILHO, O. G.; VASCONCELOS, J. L. M.; SANTOS, R. M.; ROSSINI, L. C. C. Efeito do momento da aplicação de PGF2 α em protocolo de inseminação artificial com tempo fixo na taxa de concepção em novilhas de corte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, n. 3, p. 430-432, 2003.

SAINI, M. S.; GALHOTRA, M. M.; KAKER, M. L.; RAZDAN, M.N. Induction of estrus and ovulation in non-cyclic buffalo (*Bubalus bubalis*) heifers with progesterone releasing intravaginal device and pregnant mare serum gonadotrophin and their gonadotrophin profile. **Theriogenology**, v. 26, n. 6, p. 749-755. 1986.

SANTOS, J. E. P.; THATCHER, W. W.; POLL, L.; OVERTON, M. W.; REYNOLDS, J. P. Human chorionic gonadotrophin influences numbers of corporea lutea, plasma

progesterone and conception rates of dayri cows. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 2000, Stockholm. **Proceedings...** 2000. v.1, p.144.

SAS. **SAS User's Guide Statistics**. Statistical Analysis System Institute. Cary, NC, v. 8, 2000.

SCHMITT, E. J. P.; DIAZ, T.; BARROS, C. M.; DE LA SOTA, R. L.; DROST, M.; FREDRIKSSON, E. W.; STAPLES, C. R.; THORNER, R.; THATCHER, W. W. Differential response of the luteal phase and fertility in cattle following ovulation of the first-wave follicle with human chorionic gonadotropin or an agonist of gonadotropin-releasing hormone. **Journal of Animal Science**, v. 74, n. 5, p. 1074-1083, 1996a.

SCHMITT, E. J. P.; DIAZ, T.; DROST, M.; THATCHER, W. W. Use of a gonadotropin-releasing hormone or human chorionic gonadotropin for timed insemination in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 74, n. 5, p. 1084-1091, 1996b.

SEGUIN, B. Ovsynch: a method for breeding dairy cows without doing heat detection. **The Bovine Practitioner**, v. 31, p. 11-14. 1997.

SHAH, S. N. H. Comparative studies of sazonal influence on breeding behaviour and conception rate of dairy buffalo and zebu cattle. In: CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 11., 1988, Dublin. **Proccedings...** 1988. v. 3, p. 538.

SHAH, S. N. H.; WILLENSE, A. H.; VAN DE WIEL, D. F. M. Induction of ovulatory oestrus in true anoestrus buffaloes during low breeding season. **Animal Reproduction Science**, v. 14, n. 3, p. 233-238, 1987.

SIANANGAMA, P. C.; RAJAMAHENDRAN, R. Effect of hCG administration on day 7 of the estrus cycle on follicular dynamics and cycle length in cows. **Theriogenology**, v. 45, n. 3, p. 583-592, 1996.

SILVA, J. R.; QUARESMA, M. A.; CLAUDIO, D.; COSTA, L. L. da; ROBALO-SILVA, J.; LOPES da COSTA, L. Synchronization of oestrus in Mertolenga cows. Error in the interpretation of their response to PRID treatment due to residual plasma progesterone on the day of insemination. In: CONGRESSO IBERICO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 2., 1997, Estoril. **Anais...** Estoril: Sociedade Portuguesa de Reprodução Animal, 1997. p. 436-441.

SILVA, R. D. G.; RIBEIRO FILHO, A. L.; CHALHOUB, M.; GUSMÃO, A. L.; BITTENCOURT, R. F.; PORTELA, A. P. M.; QUINTELA, A. T.; ALMEIDA, A. K.; CAMPOS, A. M. Comparação entre dois protocolos de sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo em búfalas (*Bubalus bubalis*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, n. 3, p. 467-468, 2003.

SINGH, G.; DHALIWAL, G. S.; SHARMA, R. D.; BISWAS, R. K. Treatment of summer anestrous buffaloes (*Bubalus bubalis*) with progesterone releasing intravaginal device plus pregnant mare serum gonadotropin. **Theriogenology**, v. 29, n. 5, p. 1201-1206, 1988a.

- SINGH, G.; SINGH, G. B.; DHALIWAL, G. S. Studies on reproductive status of rural buffaloes in summer. **Indian Journal of Animal Reproduction**, v. 10, p. 151-153, 1989.
- SINGH, G.; SINGH, G. B.; SHARMA, R. D.; NANDA, A. S. Ovarian and uterine responses in relation to norgestomet - PMSG treatment in the true anoestrus buffalo. **Animal Reproduction Science**, v. 16, n. 2, p. 71-74, 1988b.
- SINGH, G.; SINGH, G. B.; SHARMA, R. D.; NANDA, A.S. Experimental treatment of summer anoestrus buffaloes with norgestomet and PRID. **Theriogenology**, v. 19, n. 3, p. 323-329, 1983.
- SINGH, G.; SINGH, G. B.; SHARMA, R. D.; NANDA, A. S. Ovulation and fertility after PRID, PRID + GnRH and GnRH in anestrous buffaloes. **Theriogenology**, v. 21, n. 6, p. 859-867, 1984.
- SINGH, J.; NANDA, A. S.; ADAMS, G. P. The reproductive pattern and efficiency of female buffaloes. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 593-604, 2000.
- SINGH, U.; KHURANA, N. K.; INDERJEET. Plasma progesterone profiles and fertility status of anestrus zebu cattle treated with norgestomet-estradiol-ecg regimen. **Theriogenology**, v. 50, n. 8, p. 1191-1199, 1998.
- SIROIS, J.; FORTUNE, J. E. Lengthening the bovine estrous cycle with low levels of exogenous progesterone: A model for studying ovarian follicular dominance. **Endocrinology**, v. 127, n. 2, p. 916-925, 1990.
- TANABE, T. Y.; HANN, R. C. Synchronized estrus and subsequent conception in dairy heifers treated with prostaglandin $F_{2\alpha}$. I. Influence of stage of cycle at treatment. **Journal Dairy Science**, v. 58, p. 805-811, 1984.
- THATCHER, W. W.; DROST, M.; SAVIO, J. D.; MACMILLAN, K. L. New clinical uses of GnRH and its analogues in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 33, n. 1-4, p. 27-49, 1993.
- THATCHER, W. W.; MOREIRA, F.; PANCARCI, S. M.; BARTOLOME, J. A.; SANTOS, J. E. P. Strategies to optimize reproductive efficiency by regulation of ovarian function. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, n. 1-2, p. 243-254, 2002.
- TRIBULO, H. E.; BÓ, G. A.; KASTELIC, J. P.; PAWLYSHYN, V.; BARTH, A. D.; MAPLETOFT, R. J. Estrus synchronization in cattle with estradiol-17 β and CIDR-B vaginal devices. **Theriogenology**, v. 43, n. 1, p. 340, 1995.
- TWAGIRAMUNGU, H.; GUILBAULT, L. A.; DUFOUR, J. J. Synchronization of ovarian follicular waves with a gonadotropin – releasing hormone agonist to increase the prevision of estrus in cattle: a review. **Journal of Animal Science**, v. 73, n. 10, p. 3141-3151, 1995.

UTT, M. D.; JOUSAN, F. D.; BEAL, W. E. The effects of varying the interval from follicular wave emergence to progestin withdrawal on follicular dynamics and the synchrony of estrus in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 81, n. 6, p. 1562-1567, 2003.

VALE, W. G. **Bubalinos**: fisiologia e patologia da reprodução. Campinas ; Fundação Cargil, 1988. 86 p.

VASCONCELOS, J. L. M. **Avaliação do protocolo de sincronização de ovulação "ovsynch" e de fatores relacionados à associação entre produção de leite e taxa de concepção**. 1998.128 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

VASCONCELOS, J. L. M. Controle do estro e da ovulação visando a inseminação artificial em tempo fixo em bovinos de leite. In: **Simpósio sobre o controle farmacológico do ciclo estral em ruminantes**. 1., 2000, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2000. p. 115-157.

VIANA, J. H. M.; FERREIRA, A. M.; SÁ, W. F.; CAMARGO, L. S. A. Regressão luteal e dinâmica folicular após luteólise natural ou induzida por cloprostenol em vacas da raça Gir. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária**, v. 51, n. 3, p. 257-62, 1999.

VILLARES, J. B. Social aspects of buffaloes breeding for the social economics conditions progress of the mankind. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 4., 1994, São Paulo. **Proceedings...** São Paulo, 1994. p. 190-195.

VIRAKAL, P.; CHANTARAPRATEEP, P.; LOHACHIT, C.; PRATEEP, P.; DEMAKAN, T. Synchronization of oestrus in swamp buffalo by using Norgestomet and Norgestomet plus PMSG. **Buffalo Journal**, v. 4, n. 1, p. 95-98, 1988.

WILTBANK, J. N.; GONZALEZ-PADILLA, E. Synchronization and induction of estrus in heifers with a progestagen and estrogen. **Ann. Biological. Animal Biochemistry Biophysyc**, v. 15, p. 255, 1975.

WILTBANK, J. N.; ZIMMERMAN, D. R.; INGALLS, J. E. Use of progestational compounds alone or in combinations with estrogen for synchronization of estrus **Journal of Animal Science**, v. 20, p. 990-994, 1965.

WILTBANK, M. C. How information on hormonal regulation of the ovary has improved understanding of timed breeding programs. In: ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY FOR THERIOGENOLOGY, 1997, Oregon. **Proceedings...** 1997. p. 83-97.

WILTBANK, M. C.; PURSLEY, J. R.; FRICKE, P. M.; VASCONCELOS, J. Development of AI and ET programs that do not require detection of estrus using recent information on follicular growth. In: ANNUAL CONVENTION PORTLAND, 15., 1996, Oregon. **Proceedings...** Oregon: American Embryo Transfer Association, 1996. p. 23-44.

WILTBANK, M. C.; GUMEN, A.; SARTORI, R. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 21-52, 2002.

WILTBANK, M. C.; HAUGHIAN, J. M. GnRH: de la fisiologia a la 'sinc'-logia. In: SIMPOSIO INTERNACIONAL DE REPRODUCCIÓN ANIMAL, 5., 2003, Córdoba. **Proceedings...** 2003. p. 71-84.

WISHART, D. F. Observations on the oestrous cycle of the Friesian heifers. **The Veterinary Record**, v. 90, p. 595-597, 1972.

WISHART, D. F.; YOUNNG, I. M. Artificial insemination of progestin (sc 21009) treated cattle at predetermined times. **The Veterinary Record**, v. 45, p. 503, 1974.

YAMADA, K.; NAKAO, T.; NAKADA, K.; MATSUDA, G. Influence of GnRH analogue (ferterelin acetate) doses on synchronization of ovulation and fixed-time artificial insemination in lactating dairy cows. **Animal Reproduction Science**. v. 74, n. 1-2, p. 27-34, 2002.

ZICARELLI, L. Advances in buffaloes reproduction. In: CONGRESSO NAZIONALE ALLEVAMENTO, 2., 2003, Monterotondo, 2003. **Proceedings...** 2003. p. 233-254.

ZICARELLI, L. Management in different enviromental conditions. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 4., 1994, São Paulo. **Proceedings...** 1994. v. 1, p. 15-39.

ZICARELLI, L.; DE FILIPPO, 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., 1997, Caserta. **Anais...** Napoli: International Buffalo Federation, 1997a. p. 732-737.

ZICARELLI, L.; ESPOSITO, L.; CAMPANILE, G.; DIPALO, R.; ARMSTRONG, D. T. Effects of using vasectomized bulls in artificial insemination practice on the reproductive efficiency of italian buffalo cows. **Animal Reproduction Science**, v. 47, n. 3, p. 171-180, 1997b.