

PIETRO SAMPAIO BARUSELLI

DEDALUS - Acervo - FMVZ



11300022759

**SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO COM GnRH E
PROSTAGLANDINA F_{2α} PARA INSEMINAÇÃO
ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO EM BUBALINOS**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Livre Docente.

DEPARTAMENTO:
Reprodução Animal

DISCIPLINA:
Patologia e Clínica da Reprodução

Acervo - FMVZ 021783



**SÃO PAULO
2001**

1D1832
N.º CLASSIFICAÇÃO

T. 1155
FMVZ

N.º TOMBO

021783

881510N54

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

Baruselli, Pietro Sampaio

Sincronização da ovulação com GnRH e prostaglandina F₂α para inseminação artificial em tempo fixo em bubalinos / Pietro Sampaio Baruselli.

99 f. : il.

Tese (livre-docência em Reprodução Animal) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2001.

Unitermos: 1.Búfalos. 2.Inseminação artificial animal.
3.GnRH. 4.Prostaglandinas.

AGRADECIMENTOS

*À Lúcia, pelo amor, carinho, companheirismo,
paciência e compreensão. Aos nossos
maravilhosos filhos Bruna e Guilherme,
nossa alegria sem limites*

*Ao Prof. Dr. JOSÉ ANTÔNIO V. SINTINI, pelo constante estímulo e
orientação durante o curso de graduação.*

*Aos professores e alunos do Departamento de Reprodução Animal, pelo
comprometimento e agradável convivência.*

*Aos professores e amigos NETO ANTONIO TONIZZA DE CARVALHO,
JAPETE OLIVEIRA MARQUES, RODOLFO CASSIMIRO DE ARAÚJO,
ROBERTO FERREIRAS MARIANO CARVALHO FILHO e EVERTON LUIZ REIS, pela
imensa ajuda, colaboração na realização deste trabalho.*

*Aos amigos FRANCISCO DE CASTRO e THIAYS SOTÓ X.P. COSTA, pela
colaboração e ajuda durante todo o curso.*

*Aos colegas de Búfalos do Vale do Ribeira, pelo apoio nunca negado, em
especial ao amigo ROBE CARVALHO FERNANDES que sempre nos orientou
com valiosos ensinamentos.*

*A FUNDACÃO DE AMPARO À PESQUISA, pelo apoio financeiro, pelo
auxílio na aquisição de materiais e pelo apoio técnico e administrativo.
Aos meus pais, Franco e Neide,
pelo exemplo de formação moral e intelectual
e pelo apoio constante à minha carreira
de professor e de pesquisador*

AGRADECIMENTOS:

Ao Prof. Dr. *RENATO CAMPANARUT BARNABE*, pela oportunidade oferecida, e pelo apoio, atenção e amizade com que nos distinguiu

Ao Prof. Dr. *JOSÉ ANTÔNIO VISINTIN*, pelo constante estímulo e, sobretudo, pela amizade

Aos professores e amigos do Departamento de Reprodução Animal, pelo companheirismo e agradável convivência

Aos meus alunos e amigos *NELCIO ANTÔNIO TONIZZA DE CARVALHO*, *MÁRCIO DE OLIVEIRA MARQUES*, *RODOLFO CASSIMIRO DE ARAÚJO BERBER*, *ADEMÁRIO CARVALHO FILHO* e *EVERTON LUIZ REIS* pela imensa colaboração na realização desse trabalho

À *MARIETA TRANCOSO DE CASTRO* e a *THAIS SOTO X.B. COSTA*, pela colaboração na revisão desta tese

Aos criadores de Búfalos do Vale do Ribeira pelo apoio nunca negado, em especial ao amigo *JOSÉ CARLOS FERNANDES* que sempre nos orientou com valiosos ensinamentos

À *FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO*, pelo suporte financeiro, sem o qual não poderíamos realizar nossas pesquisas

RESUMO

BARUSELLI, P.S. **Sincronização da ovulação com GnRH e prostaglandina F_{2α} para inseminação artificial em tempo fixo em bubalinos.** [Synchronisation of ovulation using GnRH and prostaglandin F_{2α} for timed insemination in buffalo]. São Paulo, 2001. 99p. Tese (Livre Docência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

Foram realizados 6 experimentos (Exp) para avaliar a eficiência da sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em bubalinos. No Exp.1 foi acompanhada a dinâmica folicular de 33 búfalas leiteiras durante o tratamento com GnRH/PGF_{2α}/GnRH. Os animais receberam 10µg (G1; n=16) e 20µg (G2; n=17) de GnRH (Acetato de Buserelina=BUS) durante o período pós-parto (62,6±6,2 dias) e, 7 dias mais tarde, PGF_{2α}. Dois dias após a aplicação de PGF_{2α}, todos os animais receberam 10µg de GnRH, e a IATF ocorreu 16 horas após. Amostras de sangue foram colhidas para dosagem de progesterona. Observou-se que 60,6% dos animais ovularam após o 1º GnRH (G1=70,5% vs G2=50,0%; P>0,05). Os animais que ovularam (60,6%) apresentaram diâmetro folicular superior aos que não ovularam (9,5±1,7 vs 6,7±2,4mm; P<0,01). O intervalo entre a 1ª aplicação de GnRH e a ovulação foi de 33,0±8,3h (n=20) e não foi influenciado pela dose de GnRH. As búfalas que ovularam ao 1º GnRH (n=20) apresentaram níveis superiores de progesterona no dia da PGF_{2α} (2,56±1,02 vs 1,26±0,82ng/ml; P<0,05). O intervalo entre o 2º GnRH e a ovulação foi de 32,0±5,7h, e os animais que não ovularam após o 1º GnRH apresentaram intervalo mais curto (22,2±10,4 vs 33,9±4,9h). Dos 33 animais, 25 (75,8%) apresentaram ovulações sincronizadas (G2=82,3; G1=62,7%), 6 (18,2%) ovularam entre a PGF_{2α} e a 2ª dose de GnRH, e 2 (6,0%) não ovularam. Os resultados demonstraram que os bubalinos respondem ao tratamento com GnRH/PGF_{2α}/GnRH. No Exp.2, 1053 búfalas leiteiras foram tratadas para IATF conforme o Exp.1. Estudaram-se os efeitos da condição corporal (CC; 1 a 5), ordem de partos (OP), período pós parto (PPP), ordem da IA (OIA) e período da IA (estação favorável, n=967; estação desfavorável, n=86) sobre a taxa de concepção (TC). A TC da estação reprodutiva favorável foi superior (48,8%; n=967) à desfavorável (6,9%; n=86). Observou-se influência (P<0,05) da CC (≤ 3,0 = 31,4%^a, n=223; 3,5 = 52,9%^b, n=546; ≥ 4,0 = 57,1%^b, n=198) e da OP (primíparas; 35,5%; n=138 vs pluríparas; 51,0%; n=829) na TC. O PPP (<60d, 50,9%, n=334; 61 à 100d, 48,2%, n=328; >101d, 47,2%, n=305) e a OIA não interferiram na TC. Os dados demonstraram que é viável a utilização da IATF em bubalinos. O Exp.3 objetivou avaliar a eficiência de dois diferentes análogos de GnRH (BUS vs Lecirelina=LEC). As búfalas do G1 (n=132) receberam 20µg de BUS IM e, 7 dias mais tarde, PGF_{2α}. Dois dias após a PGF_{2α}, os animais receberam 10µg de BUS, IM. No G2 (n=138) foi empregado o mesmo protocolo, diferindo na 1ª (50µg LEC) e na 3ª (25µg LEC) doses hormonais. Procedeu-se à IATF 16 horas após o 2º GnRH em ambos os grupos. Os animais apresentaram TC semelhantes, de 47,0% (62/132) e de 50,0% (69/138), respectivamente, para os G1 e G2 (P>0,05). Não foi observado efeito da propriedade (P>0,05) na TC. Os resultados demonstraram que é possível utilizar LEC para IATF, com resultados semelhantes aos obtidos com BUS. O Exp.4 objetivou avaliar a eficiência de diferentes doses de GnRH (BUS e LEC) na IATF. Foram utilizadas 482 búfalas que receberam 20 µg (G1; n=84) e 10µg (G2; n=86)

de BUS IM e, 7 dias mais tarde, $PGF_{2\alpha}$. Dois dias após a $PGF_{2\alpha}$ os animais receberam 10 μ g de BUS, IM. Os G3 e G4 foram tratadas seguindo o mesmo protocolo, diferindo apenas no análogo de GnRH, (G3=50 μ g e G4=25 μ g de LEC IM). Procedeu-se à IATF 16h após o 2º GnRH. Os animais apresentaram TC semelhantes, de 55,9(47/84), 52,3(45/86), 49,0(76/155) e de 48,4%(76/157), respectivamente, para os Grupos 1, 2, 3 e 4 ($P>0,05$). Os resultados demonstraram que é possível utilizar reduzidas doses de BUS e de LEC no protocolo de IATF em bubalinos. No Exp.5 procurou-se avaliar o efeito de reduzidas doses de $PGF_{2\alpha}$ na IATF. Empregou-se o protocolo descrito no G4 (Exp.4; 1º e 2º GnRH=25 μ g LEC). No entanto, utilizaram-se reduzidas doses de $PGF_{2\alpha}$ (D-cloprostenol sódico; G1, 75 μ g, n= 125 vs G2, 150 μ g, n= 137). Não se verificou efeito da dose de $PGF_{2\alpha}$ na TC (G1, n=125, 48,0% vs G2, n=137, 40,9%). É possível utilizar meia dose de $PGF_{2\alpha}$ para IATF em bubalinos. O Exp.6 teve como objetivo analisar o efeito da administração de GnRH 7 dias antes do início do protocolo tradicional de IATF. Empregaram-se 223 búfalas: G1 (n=109) recebeu 25 μ g de LEC, e o G2 (n=114) foi tratado com solução salina no dia -7. No dia 0 iniciou-se o tratamento para sincronização da ovulação (D0=25 μ g LEC, D7= $PGF_{2\alpha}$, D9=25 μ g LEC). Verificou-se maiores TC em animais tratados com LEC 7 dias antes do início do protocolo de sincronização para IATF (G1=56,0% vs G2=39,5%).

Unitermos: 1. Búfalos, 2. Inseminação artificial, 3. Sincronização da ovulação, 4. GnRH, 5. Prostaglandinas

SUMMARY

BARUSELLI, P.S. **Synchronisation of ovulation using GnRH and prostaglandin F_{2α} for timed insemination in buffalo.** [Sincronização da ovulação com GnRH e prostaglandina F_{2α} para inseminação artificial em tempo fixo em bubalinos]. São Paulo, 2001. 99p. Tese (Livre Docência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

Six experiments were realized to evaluate the efficacy of synchronization of ovulation for timed artificial insemination (TAI) in buffalo. On Experiment 1 (Exp.1) 33 Murrah- buffalo cows had the follicular dynamics monitored by ultrasonography during the GnRH/PGF_{2α}/GnRH treatment. During the post-partum period (62.6 ± 6.2 days), cows received 10 μ g (G1; n=16) or 20 μ g (G2; n=17) of GnRH (Buserelin=BUS). A PGF_{2α} was injected seven days later in all females and, 2 days after this injection, 10 μ g of GnRH was administered. TAI was performed 16 hours after the second GnRH administration. Blood samples were obtained for progesterone dosage. The ovulation rate was 60.6% after the first GnRH. There were no differences between groups (G1=70.5 vs G2=50.0%). Females that ovulated (60.6%) presented larger follicular diameter than those that did not ovulate (9.5 ± 1.7 vs 6.7 ± 2.4 mm; $P < 0.01$). The interval between first GnRH and ovulation was 33.0 ± 8.3 h (n=20) and was not influenced by GnRH dosage. The cows that ovulated after the first GnRH (n=20) had higher plasmatic progesterone levels on the day of PGF_{2α} injection than those that did not ovulate (2.56 ± 1.02 vs 1.26 ± 0.82 ng/ml; $P < 0.05$). The interval between 2nd GnRH and ovulation was 32.0 ± 5.7 hours, and the ovulation of animals that did not ovulate after the 1st GnRH occurred earlier (22.2 ± 10.4 h vs 33.9 ± 4.9 h). Synchronized ovulations were detected in 75.8% (25/33) of all buffaloes (Group 2 = 82.3%; Group 1 = 62.7%). Six females (18.2%) ovulated between PGF_{2α} and the 2nd GnRH and two animals (6.0%) did not ovulate. The results suggested that buffaloes respond to the GnRH/PGF_{2α}/GnRH treatment. In Experiment 2, 1053 milk buffaloes of 6 farms received the same treatment of Exp. 1 for TAI. The effect of body condition score (BCS; 1 to 5 scale), partum order (PO), post partum period (PPP), insemination order (IO) and insemination season (reproductive season, n=967; out-season, n=86) on the conception rate (CR) was evaluated. The CR during the reproductive season was higher (48.8%; n=967) than out-season (6.9%; n=86). The BCS ($\leq 3.0 = 31.4\%$ a, n=223; $3.5 = 52.9\%$ b, n=546; $\geq 4.0 = 57.1\%$ b, n=198) and PO (primiparous; 35.5%; n=138 vs pluriparous; 51.0%; n=829) influenced ($P < 0.05$) the CR. The PPP (< 60 d, 50.9%, n=334; 61 to 100d, 48.2%, n=328; > 101 d, 47.2%, n=305) and IO did not interfere on CR. These data demonstrated that the TAI is applicable in buffalo. The objective of Experiment 3 was evaluate the efficacy of two different GnRH analogs (BUS vs Lecirelin=LEC). Buffalo cows (G1; n=132) received 20 μ g of BUS IM and a PGF_{2α} 7 days later. All females were treated with 10 μ g of BUS, IM two days after the PGF_{2α} injection. In G2 (n=138) the same protocol was applied using 50 μ g and 25 μ g of LEC instead of BUS. TAI was performed 16 hours after the 2nd GnRH administration in both groups. The CR was similar ($P > 0.05$) in G1 and G2 [47.0% (62/132) and 50.0% (69/138), respectively]. There were no effect of farm on the CR ($P > 0.05$). The results suggested that LEC has equal efficiency as BUS in TAI in buffalo. The Experiment 4 compared the efficiency of different dosage of GnRH (BUS and LEC) for TAI. Buffaloes received 20 (G1; n=84) or 10 μ g (G2; n=86) of

BUS IM and 7 days later were injected with PGF_{2α}. After 2 days all females received 10μg of BUS, IM. G3 and G4 were treated with the same protocol differing only in the GnRH analog used (G3=50μg and G4=25μg of LEC IM). TAI was proceeded 16h after the 2nd GnRH. The females presented similar CR: 55.9(47/84), 52.3(45/86), 49.0(76/155) and 48.4%(76/157), respectively for Groups 1, 2, 3 e 4 (P>0.05). The results showed that reduced dosage of BUS and LEC are viable for TAI in buffalo. In Experiment 5, the effect of reduced doses of PGF_{2α} analog for TAI in buffalo was evaluated. The protocol described for G4 (Exp. 4; 1st and 2nd GnRH=25μg LEC) was used with reduced dosage of PGF_{2α} analog (D-cloprostenol; G1, 75 μg, n= 125 vs G2, 150 μg, n= 137). The CR did not differ between groups (G1, n=125, 48.0% vs G2, n=137, 40.9%). The use of half dose of PGF_{2α} is effective for TAI in buffalo. The effect of administration of GnRH 7 days before the GnRH/PGF_{2α}/GnRH protocol for TAI was tested in Experiment 6. Buffaloes of G1 (n=109) received 25μg of LEC and of G2 (n=114) were treated with salin on Day -7. On Day 0, the protocolo for synchronization of ovulation was initiated (D0=25μg LEC, D7=PGF_{2α}, D9=25μg LEC). The CR of animals treated with LEC 7 days before the TAI protocol was higher than of the control group (G1=56.0% vs G2=39.5%).

Key words: 1. Buffalo, 2. Timed Artificial Insemination, 3. Synchronization of ovulation, 4. GnRH, 5. Prostaglandins

1.1	Objetivo da sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo em búfalos	34
1.1.1	Análise e local do experimento	34
1.1.2	Materiais e procedimentos	36
1.1.3	Protocolo para sincronização da ovulação artificial em tempo fixo	38
1.1.4	Exames ultrassonográficos	38
1.1.5	Efeitos de sangue pituído sobre o sistema hormonal	37
1.2	Experimento 2 - Avaliação da eficácia do protocolo de sincronização da ovulação para inseminação artificial em búfalos	38
1.2.1	Análise e local do experimento	38
1.2.2	Protocolo de sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo	38
1.3	Experimento 3 - Avaliação do efeito da lactação para a sincronização da ovulação e inseminação artificial em búfalos	40
1.3.1	Análise e local do experimento	40
1.3.2	Protocolo de sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo	41
1.4	Experimento 4 - Avaliação das doses de agonistas de GnRH (Anastrolo e Lactrelina) durante o protocolo de sincronização da ovulação para inseminação artificial em búfalos	42
1.4.1	Análise e local do experimento	42
1.4.2	Protocolo de sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo	43

SUMÁRIO

RESUMO

SUMMARY

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1	Estudo da foliculogênese	13
2.2	Estudo da dinâmica folicular em bubalinos	17
2.3	Sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo	22
2.4	Sincronização da ovulação com GnRH/LH e prostaglandina F2α visando a inseminação artificial em tempo fixo	24
3	MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1	Experimento 1 – Estudo da dinâmica folicular durante o tratamento de sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo em bubalinos	34
3.1.1	Animais e local do experimento	34
3.1.2	Manejo reprodutivo	35
3.1.3	Protocolo para sincronização da ovulação	35
3.1.4	Exames ultra-sonográficos	36
3.1.5	Colheita de sangue para dosagem hormonal	37
3.2	Experimento 2 – Avaliação da eficiência a campo do protocolo de sincronização da ovulação para inseminação em tempo fixo em bubalinos.....	38
3.2.1	Animais e local do experimento	38
3.2.2	Protocolo de sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo	38
3.3	Experimento 3 – Avaliação da eficácia da lecirelina para a sincronização da ovulação e inseminação artificial em tempo fixo em bubalinos	40
3.3.1	Animais e local do experimento	40
3.3.2	Protocolo de sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo	41
3.4	Experimento 4 - Adequação das doses de agonistas de GnRH (Acetato de Buserelina e Lecirelina) durante o protocolo de sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo em bubalinos	42
3.4.1	Animais e local do experimento	42
3.4.2	Protocolo de sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo	43

3.5	Experimento 5 – Redução da dose de prostaglandina $F_{2\alpha}$ no tratamento de sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo em bubalinos	45
3.5.1	Animais e local do experimento	45
3.5.2	Protocolo de sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo	46
3.5.3	Colheita de sangue para dosagem hormonal	47
3.6	Experimento 6 - Eficácia da administração de GnRH 7 dias antes do tratamento de sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo em bubalinos	48
3.6.1	Animais e local do experimento	48
3.6.2	Protocolo de sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo	49
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	50
4	RESULTADOS	52
4.1	Experimento 1 – Estudo da dinâmica folicular durante o tratamento de sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo em bubalinos	52
4.2	Experimento 2 – Avaliação da eficiência a campo do protocolo de sincronização da ovulação para inseminação em tempo fixo em bubalinos.....	58
4.3	Experimento 3 – Avaliação da eficácia da lecirelina para a sincronização da ovulação e inseminação artificial em tempo fixo em bubalinos	61
4.4	Experimento 4 - Adequação das doses de agonistas de GnRH (Acetato de buserelina e Lecirelina) durante o protocolo de sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo em bubalinos	63
4.5	Experimento 5 – Redução da dose de prostaglandina $F_{2\alpha}$ no tratamento de sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo em bubalinos	66
4.6	Experimento 6 - Eficácia da administração de GnRH 7 dias antes do tratamento de sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo em bubalinos	70
5	DISCUSSÃO	72
6	CONCLUSÕES	86
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

nos últimos 50 anos a pecuária progrediu significativamente graças ao emprego das biotecnologias da reprodução pelos produtores em todo o mundo. O momento da utilização dessa ferramenta deve-se às pesquisas voltadas a o melhoramento genético que envolvem os zebuínas, com especial ênfase ao crescimento fetal, à qualidade do colostro e ao desenvolvimento dos corpos lúteos. O cultivo in vitro de folicúlos permitiu controlar precisamente o ciclo estral, garantindo maior eficiência à utilização da inseminação artificial e da transferência de embriões.

No entanto, apesar dos esforços de alguns grupos de pesquisadores, os conhecimentos sobre o emprego de biotecnologias da reprodução na pecuária zebuína ainda são poucos, dificultando o acesso dos produtores a técnicas e produtos que possam melhorar o desempenho genético de seus rebanhos.

Diferentes investigações têm demonstrado que os búfalos são nutricionalmente mais eficientes que as vacas, principalmente por sua capacidade de aproveitar melhor os alimentos disponíveis. Essa qualidade nutricional, aliada à alta capacidade de adaptação a condições tropicais, torna o búfalo uma espécie bastante interessante para a produção de leite em regiões tropicais (VILLARES *et al.*, 1979; NOGUEIRA *et al.*, 1989a; NOGUEIRA *et al.*, 1989b; CARUSELLI *et al.*, 1993; VILLARES, 1994; VILLARDO *et al.*, 1994; VALLI, 2000). Tais qualidades fizeram com que o rebanho búfalo seja

INTRODUÇÃO

o segundo maior produtor de leite no mundo, com 26 bilhões de litros. Esse crescimento foi seguido por um aumento de 200% na produção de leite, que atingiu na década de 1970 57 bilhões de litros/ano - 10% do leite produzido no mundo - (FAO, 1984). No Brasil, levantamento realizado recentemente pelo mesmo

Nos últimos 50 anos a pecuária progrediu significativamente, graças ao emprego de biotecnologias da reprodução pelos pecuaristas em todo o mundo. O incremento da utilização dessa ferramenta deve-se às pesquisas voltadas aos mecanismos fisiológicos que controlam os ovários, com especial ênfase ao crescimento folicular, à qualidade dos oócitos e ao desenvolvimento dos corpos lúteos. O conhecimento de tais aspectos permitiu controlar precisamente o ciclo estral, garantindo maior eficiência à utilização da inseminação artificial e da transferência de embriões.

No entanto, apesar dos esforços de alguns grupos de estudiosos, os conhecimentos sobre o emprego de biotecnologias da reprodução na espécie bubalina ainda são poucos, dificultando o acesso dos produtores a técnicas reprodutivas que acelerem o melhoramento genético de seus rebanhos.

Diferentes investigações têm demonstrado que os bubalinos produzem eficientemente carne e leite, principalmente por sua capacidade de converter forragens fibrosas e de baixa qualidade nutricional, freqüentemente encontradas em países de clima tropical (VILLARES *et al.*, 1979; NOGUEIRA *et al.*, 1989a; NOGUEIRA *et al.*, 1989b; BARUSELLI *et al.*, 1993; VILLARES, 1994; VELLOSO *et al.*, 1994; VALE, 2000). Tais qualidades fizeram com que o rebanho bubalino mundial apresentasse crescimento numérico de 50% nos últimos 28 anos. Esse crescimento foi seguido de aumento de 200% na produção de leite, que atinge na atualidade 57 bilhões de litros/ano - 10% do leite produzido no mundo - (FAO, 1999). No Brasil, levantamento realizado recentemente pelo mesmo

organismo (FAO, 1999) também aponta significativo aumento - da ordem de 1340% entre os anos de 1970 e 1998 - do rebanho bubalino. Esse expressivo crescimento demonstra as possibilidades futuras da bubalinocultura como atividade emergente no Brasil e no mundo. Assim, o búfalo poderá produzir cada vez mais carne e mais leite para suprir as necessidades dos mercados nacional e internacional, contribuindo grandemente para o atendimento da demanda protéica da humanidade.

No entanto, até o presente momento, o número de búfalos selecionados zootecnicamente para produção de leite e de carne em nosso país ainda é pequeno. O Brasil possui búfalas que produzem 5200 litros de leite por lactação, assim como animais comprovadamente ganhadores de peso. Esse potencial genético deve ser multiplicado mais rapidamente com o auxílio de biotecnologias da reprodução, para que o rigor e a velocidade da seleção aumentem, os rebanhos sejam constituídos por animais de alto valor genético-produtivo, e o intervalo entre gerações seja reduzido.

A inseminação artificial (IA) consagrou-se mundialmente, e provou ser viável técnica e economicamente para acelerar o ganho genético e o retorno econômico da pecuária. Mas, para que os índices reprodutivos com a utilização da IA sejam satisfatórios, é necessário compreender as limitações do emprego dessa biotecnologia. Há, em todo o mundo, relatos que indicam baixa taxa de serviço, principalmente em decorrência de comprometimentos na detecção do estro, que é um dos principais obstáculos para a expansão da IA. Esses problemas são ainda maiores em rebanhos bubalinos, espécie que apresenta particularidades no

comportamento reprodutivo. Por essa razão, programas de inseminação em tempo fixo (IATF) – que não exigem a detecção do estro - colaboram sobremaneira para a disseminação do emprego dessa ferramenta. Esses protocolos contemplam a sincronização da onda de crescimento folicular, a fase luteínica e sua regressão e o momento da ovulação, permitindo o emprego da IA em tempo fixo.

O acompanhamento ultra-sonográfico dos ovários demonstrou ser eficaz no estudo do comportamento da dinâmica folicular durante o ciclo estral e nos tratamentos de sincronização do estro e da ovulação, o que contribuiu notavelmente para melhorar a eficiência da inseminação artificial em tempo fixo em bovinos. No entanto, nota-se que existem limitadas informações científicas sobre o emprego dessa biotecnologia em bubalinos. Esses conhecimentos básicos servirão para a maior compreensão da fisiologia reprodutiva da espécie, possibilitando a orientação e a melhoria da eficiência da técnica de inseminação artificial em tempo fixo na espécie.

Assim, o presente trabalho teve como objetivo estudar os protocolos de sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo em bubalinos, considerando os seguintes aspectos:

- a resposta folicular ao tratamento;
- a eficiência do tratamento a campo;
- a eficiência de diferentes protocolos quando utilizados a campo.

2.1 ESTUDO DA FOLICULOGÊNESE

O crescimento folicular é um processo dinâmico que se inicia no ovário do feto (GINTHER *et al.*, 1996). Os folículos primordiais, presentes no estroma ovariano, consistem em um pool de células achatadas, sem zona pelúcida, com pouca irrigação sanguínea. O início do desenvolvimento desses folículos imaturos para folículos primários compreende a modificação da morfologia das células da granulosa de achatadas para cubóides e o aumento do tamanho do ócito. A fase que compreende a ovulação do folículo primário a folículo pré-antral ainda é pouco conhecida, mas parece ser gonadotrofina independente (ROCHE *et al.*, 1998). Na sequência as células da granulosa e da teca em proliferação adquirem receptores para o FSH e para o LH, respectivamente. Assim, os folículos pré-antrais tornam-se responsivos ao FSH e ao LH, embora não dependam exclusivamente destas gonadotrofinas como reguladores do crescimento. Entre os muitos fatores que modulam o desenvolvimento dessas folículos incluem-se os fatores mitóticos de crescimento, que controlam a divisão das células da granulosa e o crescimento do folículo e do ócito (ANDERSON *et al.*, 1998).

REVISÃO DA LITERATURA

do eixo em cascata desses fatores de crescimento, bem como as proteínas ligadas envolvidas no processo de crescimento dos folículos pré-antrais permanece ainda desconhecidos (ROCHE *et al.*, 1998).

2.1 ESTUDO DA FOLICULOGÊNESE

O crescimento folicular é um processo dinâmico que se inicia no ovário do feto (GINTHER *et al.*, 1996). Os folículos primordiais, presentes no estroma ovariano, consistem em um *pool* de células achatadas, sem zona pelúcida, com pouca irrigação sangüínea. O início do desenvolvimento desses folículos imaturos para folículos primários compreende a modificação da morfologia das células da granulosa de achatadas para cubóides, e o aumento do tamanho do oócito. A fase que compreende a evolução de folículo primário a folículo pré-antral ainda é pouco conhecida, mas parece ser gonadotrofina independente (ROCHE *et al.*, 1998). Na seqüência, as células da granulosa e da teca em proliferação adquirem receptores para o FSH e para o LH, respectivamente. Assim, os folículos pré-antrais tornam-se responsivos ao FSH e ao LH, embora não dependam endocrinologicamente dessas gonodotrofinas como reguladoras do crescimento. Dentre os muitos fatores que modulam o desenvolvimento desses folículos incluem-se os fatores mitóticos de crescimento, que controlam a divisão das células da granulosa e o crescimento do folículo e do oócito (WANDJI *et al.*, 1996). No entanto, a ação específica e a natureza do efeito em cascata desses fatores de crescimento, bem como as proteínas ligadoras envolvidas no processo de crescimento dos folículos pré-antrais permanecem ainda desconhecidos (ROCHE *et al.*, 1998).

A formação da cavidade antral ocorre quando o folículo atinge de 200 a 400 μ m (FORTUNE 1994). Os folículos antrais são responsivos ao FSH, que estimula a proliferação das células da granulosa e, conseqüentemente, aumenta a produção de estradiol. Em bovinos, a taxa estimada de crescimento dos folículos antrais em estágio inicial é mais lenta, e o aumento de seu diâmetro de 0,13 a 3,7mm demanda 34 dias. Já após essa fase de desenvolvimento, os folículos antrais de bovinos crescem de 3 a 8mm de diâmetro em apenas oito dias (LUSSIER *et al.*, 1987).

O advento da ultra-sonografia possibilitou compreender com maior facilidade a dinâmica dos folículos, pois eliminou a necessidade de abater os animais avaliados. Desta forma, os mais consistentes estudos sobre a dinâmica folicular foram realizados com a ultra-sonografia dos ovários (PIERSON e GINTHER, 1987c). A ultra-sonografia transretal aumentou a precisão das avaliações do desenvolvimento de folículos antrais (>2mm) pois monitora, de forma direta, não invasiva, freqüente e acurada, a dinâmica *in vivo* dessas estruturas, mesmo quando localizadas no interior dos ovários (GINTHER *et al.*, 1996). Com a ultra-sonografia é possível identificar folículos antrais com diâmetro cavitário aproximado de 2mm, mas há que se ressaltar que a precisão do exame ultra-sonográfico varia conforme a resolução do aparelho, a freqüência da sonda e a habilidade do operador, entre outros aspectos.

A ultra-sonografia ovariana permitiu demonstrar definitivamente a existência de ondas de crescimento folicular durante os diferentes estágios da vida reprodutiva (SAVIO *et al.*, 1988; SIROIS e FORTUNE, 1988;

GINTHER *et al.*, 1989b; MAPLETOFT *et al.*, 1994; THATCHER *et al.*, 1999; DRIANCOURT, 2000).

Em bovinos, a emergência de cada onda de crescimento folicular está associada aos picos endógenos de FSH (ADAMS *et al.*, 1992a; ROCHE *et al.*, 1998). Estudos demonstraram essa relação durante o período de estro - picos periovulatórios de FSH - (ROCHE e IRELAND, 1981); durante o ciclo estral (ADAMS *et al.*, 1992b); no período pós-parto (CROWE *et al.*, 1998 e STAGG *et al.*, 1998) e antes da puberdade (EVANS *et al.*, 1994).

Cada onda de crescimento folicular compreende três fases. Na primeira fase – de recrutamento -, um grupo de pequenos folículos (de 3 a 4mm) inicia o crescimento e atinge diâmetro médio aproximado de 5mm. Essa fase está temporariamente correlacionada ao aumento das concentrações sanguíneas de FSH (ADAMS *et al.*, 1992b). Depois da fase de recrutamento – definida como fase de divergência no perfil de crescimento do folículo dominante em relação aos subordinados -, observa-se coincidência com o decréscimo das concentrações de FSH. BAO *et al.* (1997a, b) observaram que a seleção do folículo dominante ocorre entre 36 e 48 horas após o início da onda de crescimento folicular. Nesse momento, a seleção folicular está temporariamente relacionada à expressão do RNA mensageiro nos receptores de LH (BAO *et al.*, 1997a, b). Assim, o primeiro folículo que adquire receptores para o LH nas células da granulosa é recrutado para se tornar dominante, devido à possibilidade de resposta das células da granulosa ao LH e ao FSH (BAO e GARVERICK, 1998).

Morfologicamente, no momento da seleção o diâmetro do folículo selecionado é 2mm maior que o diâmetro dos folículos subordinados. Sob o ponto de vista endocrinológico, o folículo selecionado apresenta aumentos na produção de estrógenos e alterações na proporção intrafolicular de estrógeno/progesterona (SUNDERLAND *et al.*, 1994). Utilizando a ultrasonografia a cada 8 horas, GUNTHER *et al.* (1996) verificaram que o folículo recrutado como dominante atinge o diâmetro de 3mm seis horas antes dos folículos subordinados. Para esses autores, pode haver uma hierarquia no desenvolvimento dos folículos, mantida desde a emergência até a dominância.

A terceira fase de crescimento da onda folicular é a dominância. GUNTHER *et al.* (1989a) definiram a dominância folicular como o crescimento de uma estrutura que atinja diâmetro mínimo de 11mm, excedendo o diâmetro de todos os outros folículos recrutados na mesma onda de crescimento. Os folículos recrutados que não foram selecionados regressam, processo este denominado atresia. No período de dominância, o folículo selecionado cresce continuamente até atingir a fase de platô. Durante a fase de crescimento ocorre a inibição do crescimento de outros folículos. LUCY *et al.* (1992) constataram decréscimo no número de folículos com diâmetro inferior a 9mm durante o período de dominância. O fenômeno da dominância ainda não está completamente elucidado, mas há indícios de que o folículo dominante secreta compostos que inibem o desenvolvimento dos outros folículos. KASTELIC *et al.* (1990b) verificaram que, em novilhas cíclicas, a infusão de frações protéicas do líquido folicular inibe o

recrutamento de folículos durante os primeiros 5 dias do ciclo estral. LUSSIER *et al.* (1994), por sua vez, observaram que injeções de fluido folicular reduzem as concentrações circulatórias de FSH. Os estrógenos e as inibinas também diminuem as concentrações circulatórias de FSH e bloqueiam o crescimento folicular (IRELAND *et al.*, 1994). Se o folículo dominante cresce durante a fase de diestro, as concentrações sanguíneas de progesterona produzidas pelo corpo lúteo (CL) inibem a secreção de LH, limitando o desenvolvimento e a ovulação do folículo dominante, que entra em processo de atresia. O folículo dominante presente no momento da regressão do corpo lúteo será o folículo ovulatório (THATCHER *et al.*, 1999).

2.2 ESTUDO DA DINÂMICA FOLICULAR EM BUBALINOS

A literatura apresenta poucos trabalhos sobre a dinâmica folicular em bubalinos. Assim, foram implementados estudos que se utilizaram da ultrasonografia para definir os padrões de desenvolvimento dos folículos dessa espécie (BARUSELLI *et al.*, 1997; BARUSELLI, 1997). Há registros de que, em fêmeas bubalinas, o desenvolvimento dos folículos durante o ciclo estral ocorre em ondas, à semelhança do que acontece com as fêmeas bovinas (SAVIO *et al.*, 1988; SIROIS e FORTUNE, 1988; GINTHER *et al.*, 1989b; KNOPF *et al.*, 1989; DRIANCOURT, 1991; FORTUNE *et al.*, 1991; ROCHE

e BOLAND, 1991). BARUSELLI *et al.* (1997) observaram maior número de búfalas (63,3%) com ciclos de duas ondas de crescimento folicular. Já em bovinos, há controvérsias quanto ao número de ondas que se desenvolvem durante o ciclo estral. Alguns autores constataram número de animais com três ondas de crescimento folicular durante o ciclo estral (SAVIO *et al.*, 1988; SIROIS e FORTUNE, 1988). Outros estudiosos relatam que, na maioria dos bovinos, o ciclo estral apresenta duas ondas de crescimento folicular por ciclo estral (GINTHER *et al.*, 1989b; KNOFF *et al.*, 1989). Contudo, todos concordam que o número de ondas de crescimento folicular está associado à duração do ciclo estral. Em búfalas, BARUSELLI *et al.* (1997) verificaram que animais com três ondas de crescimento folicular apresentam fase luteínica ($10,40 \pm 2,11$ vs $12,66 \pm 2,91$ dias; $P < 0,05$), intervalo inter ovulatório ($22,27 \pm 0,89$ vs $24,50 \pm 1,88$ dias; $P < 0,01$) e ciclo estral ($21,84 \pm 1,01$ vs $24,00 \pm 2,21$ dias; $P < 0,01$) de maior duração.

Os mesmos autores (BARUSELLI *et al.*, 1997) constataram que, em animais com três ondas de crescimento folicular durante o ciclo estral, o diâmetro máximo dos folículos da primeira onda foi significativamente maior do que o diâmetro máximo dos folículos da segunda onda ($1,33 \pm 0,18$ vs $1,11 \pm 0,21$ cm) e que o segundo folículo dominante desenvolveu-se no período em que os níveis de progesterona eram mais elevados. Resultados semelhantes foram observados em bovinos por SIROIS e FORTUNE (1990); BERGFELT *et al.* (1991) e FORTUNE (1993), o que demonstra a influência dos níveis de progesterona na diminuição do diâmetro máximo do segundo folículo dominante durante a fase luteínica. Em trabalho publicado em 1994,

BRUKE *et al.* demonstraram o efeito supressivo da progesterona no crescimento folicular. E os resultados obtidos por ADAMS *et al.* (1992a) também apontaram que, em ciclos de três ondas de crescimento folicular, o diâmetro máximo do folículo dominante foi maior na primeira onda - que estava sob níveis mínimos de progesterona durante a fase de crescimento -, que na segunda onda - a qual estava sob os níveis máximos de progesterona durante a fase de crescimento.

No estudo de BARUSELLI *et al.* (1997), apenas uma búfala apresentou uma única onda de crescimento folicular, caracterizada por ciclo estral de curta duração (13 dias) e baixos níveis de progesterona. O ciclo subsequente desse mesmo animal, no entanto, teve duração normal (22 dias) e níveis compatíveis de progesterona. Como a literatura registra a presença de ciclos com fases luteais de curta duração durante o reinício da atividade ovariana no período pós parto em bovinos (SAVIO *et al.*, 1990; PERRY *et al.*, 1991; BRUKE *et al.*, 1994) e em bubalinos (USMANI *et al.*, 1985; BARUSELLI *et al.*, 1994a), e que esse fenômeno está associado a ciclos de uma onda de crescimento folicular em bovinos (SIROIS; FORTUNE, 1990), é possível supor que esse ciclo esteja relacionado a uma fase luteínica de curta duração no período pós-parto. Os trabalhos de pesquisa têm demonstrado que os bubalinos apresentam rápido reinício da atividade ovariana após o parto em condições brasileiras (VALE *et al.*, 19xx). Em búfalas criadas no Vale do Ribeira-SP, verificou-se que a primeira ovulação ocorre $36,6 \pm 16,8$ (17 a 87) dias após o parto (BARUSELLI *et al.*, 1994a).

Os resultados de BARUSELLI *et al.* (1997) não demonstraram diferenças significativas ($P > 0,05$) quanto ao diâmetro máximo do primeiro folículo dominante e ao diâmetro máximo do folículo ovulatório em os ciclos de duas ondas ($1,51 \pm 0,24$ vs $1,55 \pm 0,16$ cm) e em ciclos de três ondas de crescimento folicular ($1,33 \pm 0,18$ vs $1,34 \pm 0,13$ cm). No entanto, diferenças estatisticamente significativas foram constatadas quanto ao diâmetro máximo do primeiro folículo dominante ($1,51 \pm 0,24$ vs $1,33 \pm 0,18$ cm) e do folículo ovulatório ($1,55 \pm 0,16$ vs $1,34 \pm 0,13$ cm), entre ciclos de duas e de três ondas de crescimento folicular. Também em bovinos GINTHER *et al.* (1989b); BERGFELT *et al.* (1991); ADAMS *et al.* (1992a) e FORTUNE (1993) observaram que o diâmetro máximo dos folículos era inferior em ciclos com três ondas de crescimento folicular. Desde que, as búfalas com três ondas de crescimento folicular apresentaram associação entre as altas concentrações de progesterona e o reduzido diâmetro máximo dos folículos, pode-se supor que as concentrações de progesterona também inibem o crescimento folicular nessa espécie (BARUSELLI *et al.*, 1997). O diâmetro máximo dos folículos de bubalinos (BARUSELLI *et al.*, 1997) é semelhante ao que a literatura registra para *Bos taurus* (GINTHER *et al.*, 1989a), no entanto foi ligeiramente superior ao que BARROS *et al.* (1993) e RHODES *et al.* (1995) encontraram em *Bos indicus*.

Em búfalas com duas e três ondas de crescimento folicular durante o ciclo estral, os dias de início de desenvolvimento das ondas foliculares são próximos aos de bovinos (SIROIS e FORTUNE, 1990; FORTUNE, 1993). BARUSELLI *et al.* (1997) relatam que, em búfalas com três ondas, a

segunda onda folicular iniciou-se anteriormente à mesma onda em animais com ciclos de duas ondas de crescimento folicular ($9,30 \pm 1,25$ vs $10,83 \pm 1,09$ dias; $P < 0,01$), à semelhança dos achados de FORTUNE (1993) em bovinos, que observou que a fase de crescimento e a fase estática do primeiro folículo dominante diferem entre si em ciclos de duas e de três ondas foliculares: o primeiro folículo dominante cresce por um período mais prolongado e atinge diâmetros superiores em ciclos de duas ondas do que naqueles de três ondas de crescimento folicular.

Estudos realizados em bubalinos (BARUSELLI *et al.*, 1997) demonstram que há grande variação no dia do início da segunda onda folicular, quando analisados todos os animais em conjunto. Essa variabilidade dificulta a padronização de esquemas de sincronização da onda folicular para o emprego de biotecnologias. Já o número de folículos recrutados por onda, entre as diferentes ondas do mesmo ciclo estral, apresenta baixa variação individual (BARUSELLI *et al.*, 1997). Tais resultados concordam com a grande repetibilidade do recrutamento de folículos em cada onda folicular encontrada por BONI *et al.* (1997), o que sugere que o número de folículos recrutados depende de fatores individuais. Na literatura consultada, não foram encontradas informações a respeito da herdabilidade desta característica, mas a seleção de búfalas com base no número de folículos por onda é atrativa em decorrência das correlações positivas entre o número de pequenos folículos ao início do tratamento superovulatório e a resposta superovulatória em bovinos (ROMERO *et al.*, 1991). E, em bubalinos, esse tipo de seleção é ainda mais importante, pois

estudos histológicos dos ovários demonstraram que a espécie tem menor número de folículos (DANELL, 1987; LE VAN TY *et al.*, 1989).

Os trabalhos voltados ao estudo da dinâmica folicular durante o ciclo estral em bubalinos demonstram que 1) a dinâmica folicular dessa espécie é similar à da espécie bovina; 2) há maior frequência de ciclos de duas ondas de crescimento folicular, embora tenham sido observados ciclos de três e de uma onda de crescimento folicular e 3) o número de ondas foliculares durante o ciclo estral está associado à duração da fase luteal e do ciclo estral (BARUSELLI *et al.*, 1997; BARUSELLI, 1997).

2.3 SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO PARA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO.

O emprego da inseminação artificial em bovinos tem sido amplamente estudado, e utilizado com sucesso em propriedades rurais de todo o mundo, o que faz com que a melhoria genética dos rebanhos seja mais rápida e eficiente. Já em bubalinos essa biotécnica tem sido pouco empregada pelos criadores, em decorrência das dificuldades para identificar as manifestações estrais e o momento apropriado para a realização da IA. A identificação do cio em bubalinos requer duas ou mais observações diárias, ininterruptas, durante toda a estação reprodutiva, e a detecção do início e do final do cio para realizar a inseminação artificial no momento mais apropriado (BARUSELLI, 2001). Os resultados obtidos com

inseminação artificial baseada na detecção visual de cio demonstram média de 51,8% de taxa de concepção à primeira, de 57,9% à segunda, promovendo de 75% a 80% de taxa de prenhez à inseminação artificial do rebanho ao final da estação reprodutiva (BARUSELLI, 1994a; BARNABE *et al.*, 1995a; BARNABE *et al.*, 1995b; BARUSELLI *et al.*, 1995; BARUSELLI, 1998), mas esses índices variam conforme o manejo geral da propriedade.

Além da dificuldade de detectar o cio em bubalinos, um dos fatores que mais limitam o desempenho reprodutivo de rebanhos inseminados artificialmente é a falha na detecção do estro pelo inseminador. O manejo correto para a detecção de cios requer contínuas observações do rebanho, e exige mão-de-obra qualificada, que detenha conhecimento específico e tenha responsabilidade. Rebanhos cuja detecção de cios tenha sido realizada de maneira incorreta apresentam diminuição do desempenho reprodutivo e conseqüente aumento no período de serviço e no intervalo entre partos, acarretando sérios prejuízos ao criador (VALE, 1988; VALE, 1994; BARUSELLI, 2001).

Assim, protocolos que não exigem a identificação de cios contribuirão para o incremento da utilização da inseminação artificial nos rebanhos bubalinos, principalmente porque são facilmente aplicáveis. Tais protocolos objetivam sincronizar a inseminação artificial e empregá-la em todos os animais da propriedade - mesmo naqueles que não estejam manifestando estro ou ciclicidade -, o que promove o aumento do emprego dessa ferramenta em rebanhos bubalinos, e permite que o melhoramento

genético e o incremento da produtividade de carne e de leite sejam mais rápidos e eficientes (BARUSELLI, 1999).

Para DRIANCOURT *et al.* (2000), a sincronização do estro e da ovulação depende do controle de alguns fatores importantes, como: 1) prevenção do desenvolvimento de folículos persistentes que contêm oócitos envelhecidos; 2) recrutamento da nova onda de crescimento folicular, independentemente do estágio do ciclo estral; 3) manipulação da fase luteínica; 4) sincronização precisa do futuro folículo ovulatório.

2.4 SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO COM GNRH/LH E PROSTAGLANDINA $F_{2\alpha}$ VISANDO A INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO

A eficiência e a acurácia na detecção do estro são os fatores que mais influenciam o desempenho reprodutivo de rebanhos inseminados artificialmente, sejam eles bovinos sejam eles bubalinos (DEJARNETTE *et al.*, 2001; BARUSELLI, 2001). A sincronização da ovulação por métodos hormonais permite que a inseminação artificial seja realizada em tempo fixo, e elimina a necessidade de observação de cio. Isso propicia grande economia de mão-de-obra, e possibilita que as inseminações sejam agrupadas e programadas otimizando os trabalhos, realizados em dias determinados (BARUSELLI, 1999).

A prostaglandina e seus análogos foram amplamente empregados para sincronizar as manifestações estrais quando da utilização de biotecnologias. A prostaglandina provoca a regressão do corpo lúteo durante fase restrita do ciclo estral (diestro), quando o CL apresenta-se responsável a esse hormônio, com conseqüente luteólise e queda dos níveis sangüíneos de progesterona. Esses eventos promovem as manifestações de estro, seguidas de ovulação 2 a 5 dias após o tratamento com prostaglandina (NEBEL e JOBST, 1998). A responsividade do corpo lúteo à prostaglandina inicia-se no 5º 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 (ODDE, 1990; LARISON e BALL, 1992). No momento em que ocorre a regressão do corpo lúteo, o folículo dominante presente que não iniciou a fase de regressão e de atresia, será o folículo ovulatório (KASTELIC *et al.*, 1990a). KASTELIC e MAPLETOFT (1998) constataram que, quando o tratamento com prostaglandina é realizado no 5º dia do ciclo estral - momento em que o folículo dominante da primeira onda ainda está em fase de crescimento -, o intervalo entre a aplicação e a ovulação é de 3 dias. Se o tratamento tem início no 12º dia do ciclo estral - quando o folículo dominante da segunda onda encontra-se no início da fase de crescimento -, a ovulação ocorre 4,5 dias após a aplicação. Bovinos tratados no 8º dia do ciclo estral freqüentemente apresentam ovulação do folículo dominante da primeira onda folicular 4 dias após a aplicação de prostaglandina. No entanto,

estudo a ovulação não são precisamente sincronizados devido à variação

ocasionalmente pode ocorrer a ovulação do segundo folículo dominante 6 dias após o tratamento.

Também em bubalinos foi detectada variação na duração da manifestação do estro (36 a 96 horas) após a aplicação de prostaglandina (BARUSELLI, 1994a). E, para estudar detalhadamente as variações do estro e da ovulação após a aplicação de prostaglandina nessa espécie PORTO FILHO *et al.* (1999) realizaram experimento no qual acompanharam a dinâmica folicular de animais tratados em diferentes fases do ciclo estral. Os animais foram divididos em dois grupos: o Grupo 1 recebeu prostaglandina antes do Dia-10, e o Grupo 2 recebeu prostaglandina após o Dia-10 do ciclo estral. Os autores verificaram que a fase do ciclo estral na qual foi ministrada a prostaglandina interferiu no intervalo entre a aplicação e o início das manifestações estrais e a ovulação ($P < 0,01$): búfalas tratadas antes do dia 10 apresentaram menor intervalo de tempo ($P < 0,01$) para as manifestações do estro e da ovulação que aquelas tratadas após o dia 10 do ciclo estral ($\text{PGF}_{2\alpha}$ -início do estro = $40,7 \pm 10,9\text{h}$ vs $56,7 \pm 12,8\text{h}$ e $\text{PGF}_{2\alpha}$ -ovulação = $70,0 \pm 11,3\text{h}$ vs $85,6 \pm 12,5\text{h}$, respectivamente). Tais resultados sugerem que, nos animais tratados no início do ciclo estral ocorreu, provavelmente, a ovulação do folículo dominante da primeira onda, presente no momento da aplicação da prostaglandina.

As informações até aqui arroladas demonstram que o sucesso da aplicação da prostaglandina depende da presença do corpo lúteo funcional em fase específica do ciclo estral (diestro). Observa-se, também, que o estro e a ovulação não são precisamente sincronizados devido à variação

do estágio de desenvolvimento folicular no momento da regressão do corpo lúteo, pois alguns animais apresentam atraso no desenvolvimento e na maturação do folículo ovulatório. Em função dessa variação, faz-se necessária a detecção das sintomatologias de estro após o tratamento com prostaglandina, para identificar o momento apropriado para a realização da inseminação artificial (STEVENSON *et al.*, 1999). Assim, protocolos de inseminação artificial em tempo fixo que utilizam somente prostaglandina não têm apresentado bons resultados (THATCHER *et al.*, 1999).

Para viabilizar a inseminação artificial em tempo fixo em bovinos é necessário diminuir a variação do tempo de ovulação após o tratamento com prostaglandina. Assim, alguns estudiosos investigaram o emprego de análogos do GnRH, seguido da aplicação de prostaglandina depois de 7 dias. O tratamento com GnRH em dias desconhecidos do ciclo estral promove a ovulação do folículo dominante presente no momento do tratamento - desde que este esteja na fase de crescimento ou no início da fase estática -, ou provoca a atresia de folículos que não apresentam condições de ovular, e uma nova onda de crescimento folicular ocorre 2 a 3 dias depois (PURSLEY *et al.*, 1995; TWAGIRAMUNGU *et al.*, 1995; BODENSTEINER *et al.*, 1996). WILTBANK (1997) constatou que folículos com 0,9 a 1,0cm de diâmetro e na fase de crescimento ovulam mesmo na presença de corpo lúteo funcional, com altos níveis de progesterona. Verificou, também, que folículos que não ovulam apresentam luteinização. Em outro experimento, PURSLEY *et al.* (1995) detectaram ovulação em 18 de 20 vacas (90%), e em 13 de 24 novilhas (54%) que receberam GnRH,

independentemente da fase do ciclo estral em que se realizou o tratamento. Os autores não recomendam o emprego da sincronização da ovulação com GnRH/PGF_{2α}/GnRH em novilhas pois estas apresentam baixa resposta ovulatória ao GnRH, e porque a ausência de ovulação não sincroniza o desenvolvimento de uma nova onda de crescimento folicular.

Graças à alta taxa de ovulação após o tratamento com GnRH, poucos animais apresentam cio entre a primeira aplicação de GnRH e a aplicação de prostaglandina, em virtude da formação de corpo lúteo que produz progesterona. Entretanto, após a aplicação da prostaglandina, 60 a 70% dos animais tratados manifestam cio em 4 dias (TWAGIRAMUNGU *et al.*, 1995).

PURSLEY *et al.* (1995) demonstraram que a sincronização do estro, e em particular da ovulação, pode ser consideravelmente aumentada com uma segunda dose de GnRH 36-48 horas após a aplicação de prostaglandina. Essa segunda aplicação de GnRH colabora com a eficiência da inseminação em tempo fixo, realizada de 16 a 24 horas após, pois sincroniza a ovulação em curto período de tempo. Em bovinos, BARUSELLI *et al.* (2000) verificaram que animais tratados com o protocolo "Ovsynch" apresentam maior taxa de ovulação após a administração de PGF_{2α} (74,3%; 26/35) que aqueles tratados com dose única de PGF_{2α} (58,8%; 20/34). Apesar dessa maior taxa de ovulação, foram detectadas em estro apenas 22,9% (8/35) do grupo "Ovsynch", contra 64,7% (22/34) das novilhas do grupo prostaglandina (P<0,01).

Estudando a dinâmica folicular durante o tratamento "Ovsynch", PURSLEY *et al.* (1995) verificaram que, após a aplicação da primeira dose de GnRH ocorreram a ovulação e o início da nova onda de crescimento folicular, o que resultou na presença de folículo dominante após 7 dias, no dia da aplicação da prostaglandina. A luteólise provocada pela prostaglandina fez com que todos os animais tratados ovulassem entre 24 e 32 horas após a segunda dose de GnRH. Esses resultados demonstram a grande eficiência do método "Ovsynch" na sincronização da ovulação em bovinos.

VASCONCELOS (1998) obteve 64% de taxa de ovulação após a primeira aplicação de GnRH em 156 vacas Holandesas tratadas em diferentes períodos do ciclo estral. O autor observou variação das taxas de ovulação conforme a época do ciclo estral em que as fêmeas foram tratadas, com menores índices nos animais que se encontravam entre os dias 1 e 4 (23%), e maiores taxas naqueles que estavam entre os dias 5 e 9 (96%). Já, as taxas de ovulação após a segunda dose de GnRH (87%) não foram influenciadas pela fase do ciclo estral, mas variaram ($P < 0,01$) de acordo com a resposta à primeira aplicação do hormônio (92% quando houve ovulação e 79% quando não houve ovulação). Foram observadas ovulações entre a aplicação de prostaglandina e a segunda dose de GnRH (6%), e 7% dos animais não ovularam decorridas 48 horas da aplicação da segunda dose de GnRH.

VASCONCELOS *et al.* (1999); GEARY *et al.* (2000) e DEJARNETTE *et al.* (2001) verificaram que a resposta folicular ao primeiro GnRH

influencia a eficiência da sincronização da ovulação. Animais que não respondem ao tratamento e que se encontram no final da fase de diestro, manifestam o estro e a ovulação prematuramente, e representam, tipicamente, de 8 a 10% dos animais tratados. Animais com estro e ovulação prematuros, quando inseminados em tempo fixo, apresentam baixas taxas de concepção. Esse fenômeno já foi relatado em bovinos de leite e em bovinos de corte (GEARY *et al.*, 2000; DEJARNETTE *et al.*, 2001).

A taxa de concepção de fêmeas bovinas sincronizadas pelo protocolo "Ovsynch" e inseminadas artificialmente em tempo fixo apresenta variações de 26 a 55% (PURSLEY *et al.*, 1995; PURSLEY *et al.*, 1997b; VASCONCELOS, 1998). PURSLEY *et al.* (1997a) encontraram maiores taxas de prenhez aos 60 dias pós-parto em animais tratados com o método "Ovsynch" que naqueles do grupo controle (37 vs 5%; $P < 0,01$). Os mesmos resultados foram observados aos 100 dias pós-parto (53 vs 35%; $P < 0,01$), o que demonstra diminuição do período de serviço em animais que receberam o tratamento.

Comparando a eficiência entre tratamentos hormonais que utilizavam GnRH ou hCG na última aplicação do protocolo "Ovsynch", SCHMITT *et al.* (1996) verificaram taxa de prenhez superior nas novilhas tratadas com hCG (52,9% vs 45,5%), embora essa diferença não tenha tido significância estatística. Os autores verificaram que o emprego do hCG reduziu significativamente os ciclos estrais de curta duração (<16 dias) após a inseminação (6,0% vs 15,5%). Essa redução ocorre porque o CL originado

de ovulação induzida pelo GnRH tem capacidade reduzida de secretar progesterona. Confirmando tais resultados, estudo recente em novilhas *Bos indicus* x *Bos taurus* (MARQUES *et al.*, 2001) demonstrou que o hCG promove ovulação e formação de CL acessório com diâmetro superior, e que produz maiores concentrações de progesterona que o GnRH.

De acordo com MARTINEZ *et al.* (1999), a aplicação de LH apresenta melhores taxas de ovulação que o tratamento com GnRH (78 vs. 56%, respectivamente). Avaliando o efeito da dose de LH em bovinos, OSWALD *et al.* (2000) não encontraram diferenças nas taxas de ovulação quando da aplicação de 5mg (83,3%), de 10mg (66,6%) e de 25mg (83,3%) 48 horas após a administração de PGF_{2α}. Esses resultados indicam que é possível melhorar a eficiência da sincronização da ovulação com a aplicação exógena de LH em bovinos. BERBER *et al.* (2001) avaliaram a eficiência a campo da sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo com GnRH e com LH. Para tanto, sincronizaram e inseminaram 305 búfalas (Grupo GnRH, n=154; Grupo LH, n=151), que receberam 20µg de GnRH (Acetado de buserelina) durante o período pós-parto, e prostaglandina sete dias depois. Dois dias após a aplicação da prostaglandina, as búfalas receberam 10µg de GnRH (Grupo GnRH) ou 12,5mg de LH (Grupo LH). Os animais apresentaram taxas de concepção de 56,49% (n=154) e de 64,24% (n=151) para os Grupo GnRH e LH, respectivamente (P>0,05).

Também em zebuínos a resposta ao protocolo "Ovsynch" foi avaliada (BARROS, 2000; BARUSELLI *et al.*, 2001). Na investigação

realizada por BARROS (2000), os animais foram tratados com GnRH em diferentes estágios - aleatoriamente escolhidos - do ciclo estral e, sete dias mais tarde, receberam PGF_{2α}. Vinte e quatro horas após a administração de PGF_{2α}, todos os animais receberam nova aplicação de GnRH. Cerca de 20 a 24 horas após a segunda dose de GnRH todas as vacas foram inseminadas artificialmente, sem observação do cio (dia 09). Esse protocolo foi testado em vacas lactantes (60 a 90 dias pós-parto) e em vacas não lactantes. As taxas de prenhez após uma única IA em tempo fixo foram de 47,7% e 44,9%, respectivamente, para vacas lactantes e não lactantes. É importante destacar que as vacas Nelore utilizadas nos protocolos acima descritos estavam ciclando (corpo lúteo detectado por palpação retal ou ultra-sonografia). Quando os protocolos foram testados em vacas em anestro, as taxas de prenhez foram bem mais baixas: 14,9% em 67 vacas tratadas, o que indica que tais tratamentos não são efetivos em animais em anestro, e devem ser utilizados somente em vacas que estejam ciclando.

SANTOS et al. (2001) verificaram taxa de regressão do CL ao tratamento com Cloprostenol sódico e D-Cloprostenol de 82,5% e de 85,7%, respectivamente, para animais tratados com o protocolo "Ovsynch". BARROS (2000) avaliou o uso de metade da dose de prostaglandina em fêmeas bovinas sincronizadas com o protocolo GnRH/PGF_{2α}/BE. O experimento resultou em taxa de prenhez similar àquela obtida com a dose integral, o que levou o autor a recomendar o emprego de meia dose de prostaglandina no protocolo de sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo em bovinos. Também em bubalinos foi

constatado que reduzidas doses de prostaglandina são eficientes para provocar a luteólise e para induzir o estro e a ovulação (CHOHAN, 1998).

Para analisar a eficácia de reduzidas doses de GnRH no protocolo de sincronização da inseminação artificial em tempo fixo, FRICKE *et al.* (1998) compararam animais tratados com 50 μ g e com 100 μ g de GnRH (Gonadorelina). Os resultados demonstraram que a diminuição das doses de GnRH reduz os custos por prenhez, sem comprometer a eficiência do protocolo de sincronização. SANTOS *et al.* (2001) também constataram que a diminuição nas doses de GnRH reduz os custos sem comprometer a eficácia do protocolo.

Alguns estudos têm demonstrado que o protocolo "Ovsynch" pode apresentar baixa eficiência em vacas zebuínas lactantes criadas a campo (BARROS, 2000; BARUSELLI *et al.*, 2001). Esses trabalhos indicam a utilização desse protocolo somente em rebanhos com altas taxas de ciclicidade, nem sempre encontradas em propriedades produtoras de carne e leite nos trópicos, que possuem rebanhos predominantemente zebuínos.

Investigações sobre a utilização do método "Ovsynch" em bovinos demonstram eficiência na sincronização da ovulação e satisfatórias taxas de gestação dos rebanho inseminados, sem a necessidade de detecção de cio. Entretanto, a literatura mundial é pobre em estudos voltados ao emprego da sincronização de ovulação com GnRH/PGF_{2 α} /GnRH para inseminação artificial em tempo fixo na espécie bubalina.

3.1 EXPERIMENTO 1 - ESTUDO DA DINÂMICA FOLICULAR DURANTE O TRATAMENTO DE SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO PARA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TIPO FIXO EM BUBALINOS

3.1.1 ANIMAIS E LOCAL DO EXPERIMENTO

Foram utilizadas 33 búfalas da raça Murrah, com idades entre três e dez anos, pertencentes à Fazenda Barra do Campinhal, localizada no Município de Registro, Estado de São Paulo (latitude 24°47'S; longitude 47°43'W), no decorrer do primeiro semestre de 1996.

Durante o experimento, os animais foram mantidos a pasto (Arroz com decumbeira), de acordo com a disponibilidade da irrigação. As vacas foram ordenhadas todos os dias pela manhã, entre 5h00 e 7h00, na presença dos bezerros, para facilitar a retirada do leite. Os bezerros foram separados das mães após a ordenha, eram deles separados os leitões e mantidos no bezerreiro durante o restante do dia e à noite, até a próxima ordenha.

A alimentação dos animais foi feita com rações comerciais, e a mineralização do rebanho foi feita com misturas comerciais, e a vacinação dos animais em vacinas comerciais.

MATERIAL E MÉTODOS

3.1.1.1. Procedimentos Gerais

Os animais foram vacinados contra brucelose, tétano aftoso e diarréico e, anualmente, eram realizados exames para controle de brucelose (tuberculose).

3.1 EXPERIMENTO 1 - ESTUDO DA DINÂMICA FOLICULAR DURANTE O TRATAMENTO DE SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO PARA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO EM BUBALINOS

3.1.1 ANIMAIS E LOCAL DO EXPERIMENTO

Foram utilizadas 33 búfalas da raça Murrah, com idades entre três e dez anos, pertencentes à Fazenda Barra do Campinzal, localizada no Município de Registro, Estado de São Paulo (latitude 24°47'S; longitude 47°43'W), no decorrer do primeiro semestre de 1998.

Durante o experimento, os animais foram mantidos a pasto (*Brachiaria decumbens*), de acordo com a disponibilidade de forragens. As búfalas foram ordenhadas todos os dias pela manhã, entre 5h00 e 7h00, na presença dos bezerros, para facilitar a retirada do leite. Os bezerros permaneciam com as mães após a ordenha, eram delas separados às 12h00 e mantidos no bezerreiro durante o restante do dia e à noite, até a ordenha do próximo dia.

A mineralização do rebanho foi feita com misturas comerciais, e disponibilizada aos animais em cochos cobertos existentes nos pastos e no estábulo, durante todo o ano.

Os animais foram vacinados contra brucelose, febre aftosa e carbúnculo e, anualmente, eram realizados exames para controle de brucelose e tuberculose.

3.1.2 MANEJO REPRODUTIVO

Após o parto, o lote experimental permaneceu sem a presença de touros, para evitar coberturas indesejáveis. Os partos das búfalas tiveram início em fevereiro, e o começo do tratamento ocorreu $65,6 \pm 6,2$ dias após os partos. O estudo foi realizado durante a estação reprodutiva favorável da espécie (BARUSELLI, 1993). Os animais apresentavam, ao início do tratamento, boa condição corporal ($\geq 3,0$; escala de 1 a 5).

3.1.3 PROTOCOLO PARA SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO

Todos os animais foram tratados em diferentes dias – aleatoriamente escolhidos - do período pós-parto. Os animais do Grupo 1 (n=16) receberam $10\mu\text{g}$ de GnRH (Acetato de buserelina, Conceptal®) e, 7 dias mais tarde, foram aplicados 15mg de prostaglandina (Luprostiol, Prosolvin®). Dois dias após a aplicação da prostaglandina os animais receberam $10\mu\text{g}$ de GnRH, sendo inseminados após 16 horas. As búfalas do Grupo 2 receberam o mesmo tratamento daquelas do Grupo 1, com diferença apenas na primeira dose de GnRH ($20\mu\text{g}$, Acetato de buserelina, Conceptal®; Figura 1).

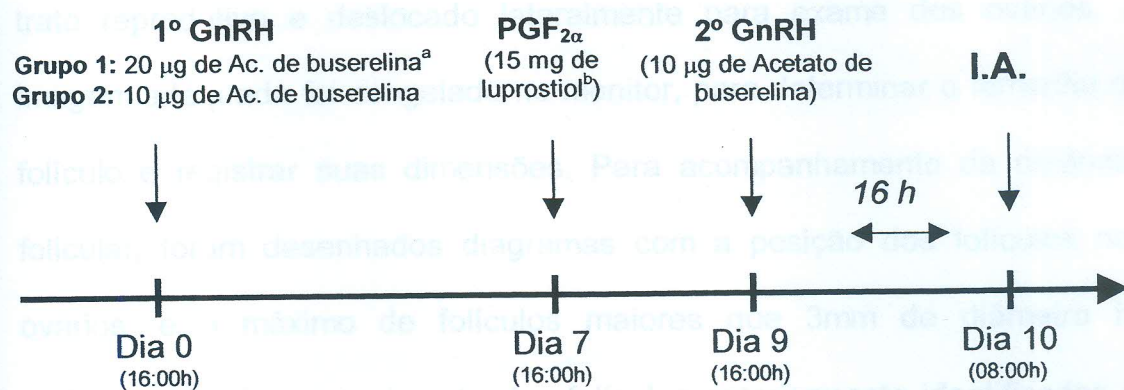


Figura 1. Esquema empregado para a sincronização da ovulação e a inseminação artificial em tempo fixo em bubalinos (^aConceptal®, Hoescht Roussel Veterinária S.A, São Paulo, Brasil; ^bProsolvín®, Intervet, Curitiba, Brasil).

3.1.5 COLETA DE SANGUE PARA DOSAGEM HORMONAL

3.1.4 EXAMES ULTRA-SONOGRÁFICOS

Para avaliação da dinâmica folicular durante o tratamento, as búfalas foram submetidas a exames ultra-sonográficos por via transretal. Os exames foram realizados de 12 em 12 horas, durante 48 horas, para verificar a resposta ovariana após a primeira aplicação de GnRH. Também foram realizadas avaliações no dia da aplicação da prostaglandina, e de 6 em 6 horas após a segunda aplicação de GnRH, para observar o momento da ovulação. Foi utilizado aparelho de ultra-som¹ com transdutor linear de 5 e 7,5MHZ, acoplado a impressora²; os exames foram realizados pelo mesmo operador, para reduzir a possibilidade de erros. O transdutor foi introduzido no reto após a retirada das fezes, e era movimentado sobre a superfície do

do São Paulo (FMVZ/USP), localizado em São Paulo-SP.

¹ PIE MEDICAL 480, Maastricht, Holanda

² MITSUBISHI, Vídeo Printer, P66

trato reprodutivo e deslocado lateralmente para exame dos ovários. A imagem adequada foi congelada no monitor, para determinar o tamanho do folículo e registrar suas dimensões. Para acompanhamento da dinâmica folicular, foram desenhados diagramas com a posição dos folículos nos ovários, e o máximo de folículos maiores que 3mm de diâmetro foi registrado. O desaparecimento dos folículos anteriormente identificados ($\geq 10\text{mm}$) indicou a ocorrência da ovulação (NASSER *et al.*, 1993).

3.1.5 COLHEITA DE SANGUE PARA DOSAGEM HORMONAL

No momento de cada aplicação hormonal (D0, D7 e D9) foram coletadas amostras de sangue da veia jugular. O sangue foi centrifugado para obtenção da fração plasmática, e imediatamente acondicionado em tubos plásticos identificados e congelados a -20°C para posterior dosagem hormonal. As amostras foram colhidas com a finalidade de avaliar as concentrações de progesterona na primeira aplicação de GnRH, na aplicação da prostaglandina e na última aplicação de GnRH. Para a análise hormonal foi utilizado teste comercial de radioimunoensaio (DPC, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, USA). Os ensaios foram realizados no Laboratório de Dosagens Hormonais do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP), localizado em São Paulo-SP.

3.2 EXPERIMENTO 2 - AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA A CAMPO DO PROTOCOLO DE SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO PARA INSEMINAÇÃO EM TEMPO FIXO EM BUBALINOS

3.2.1 ANIMAIS E LOCAL DO EXPERIMENTO

O experimento foi realizado na região sudeste do Brasil, durante as estações reprodutivas favorável (outono e inverno) e desfavorável (primavera e verão), nos anos de 1998 e 1999. Para esse estudo foram utilizadas 1053 búfalas leiteiras pertencentes a seis propriedades rurais do Vale do Ribeira que participam do programa de IA em bubalinos coordenado pelo Departamento de Reprodução Animal (VRA) da FMVZ/USP, e a uma do município de Dourado (Fazenda Santa Elisa), todas no Estado de São Paulo.

O manejo nutricional, sanitário e de produção de leite foi realizado semelhantemente ao descrito no Experimento 1.

3.2.2 PROTOCOLO DE SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO PARA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO

Todos os animais foram tratados em diferentes dias - aleatoriamente escolhidos - do período pós-parto (>40 dias). Os animais receberam 20µg

de GnRH (Acetato de buserelina, Conceptal®) e, 7 dias mais tarde, foram aplicados 15mg de prostaglandina (Luprostiol, Prosolvin®). Dois dias após a aplicação da prostaglandina, os animais receberam 10µg de GnRH (Acetato de buserelina). A inseminação artificial foi efetuada em tempo fixo, sem serem consideradas as manifestações de estro, 16 horas após a última aplicação de GnRH (Figura 2).

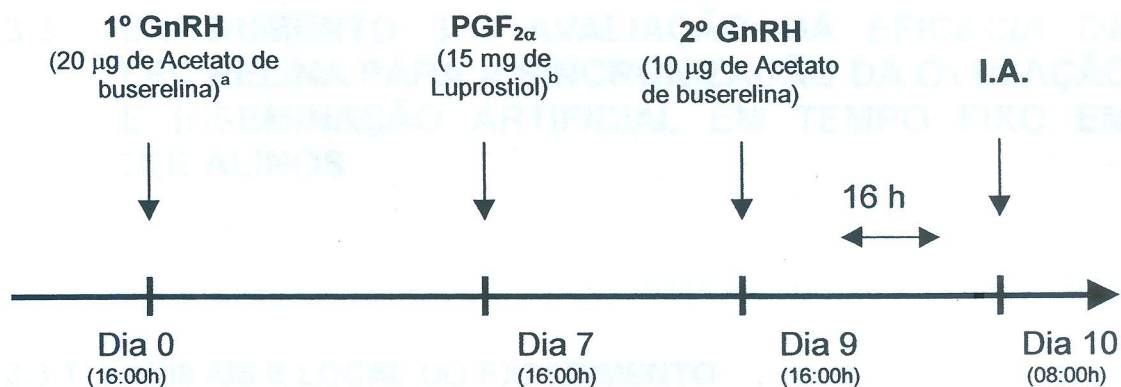


Figura 2. Esquema empregado para a sincronização da ovulação e a inseminação artificial em tempo fixo em bubalinos (^aConceptal®, Hoescht Roussel Veterinária S.A, São Paulo, Brasil; ^bProsolvin®, Intervet, Curitiba, Brasil)

Para a inseminação artificial foram utilizadas partidas de sêmen, analisadas e aprovadas conforme as normas do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998).

Nesse experimento foi estudada a influência de fatores ligados à condição corporal ao início do tratamento (escala de 1 a 5; HOUGHTON *et al.*, 1990), à ordem de partos, ao período pós parto ao início do tratamento, à ordem de inseminação e à época da inseminação (estação reprodutiva

favorável - março a agosto - e estação reprodutiva desfavorável – setembro a dezembro), sobre a taxa de concepção.

O diagnóstico de gestação foi efetuado trinta dias após as inseminações, por meio de ultra-sonografia, com um transdutor linear de 5,0MHz.

3.3 EXPERIMENTO 3 - AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA LECIRELINA PARA A SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO E INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO EM BUBALINOS

3.3.1 ANIMAIS E LOCAL DO EXPERIMENTO

Nesse experimento foram empregadas 270 búfalas com período pós-parto entre 40 e 90 dias, pertencentes a duas fazendas localizadas nos estados de São Paulo (Fazenda A, n=143, Fazenda Santa Elisa, município de Dourado) e de Mato Grosso do Sul (Fazenda B, n=127, Fazenda Santo Antônio, município de Nova Andradina). Os animais foram mantidos em pastagens de *Bracharia decumbens* e receberam sal mineralizado como única suplementação. O manejo sanitário e de produção de leite foi realizado semelhantemente ao descrito no Experimento 1.

Em cada propriedade os animais foram subdivididos em dois grupos, de acordo com a condição corporal e o período pós-parto.

3.3.2 PROTOCOLO DE SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO PARA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO

A sincronização da ovulação foi realizada com duas aplicações intramusculares (IM) de um agonista de GnRH, com intervalo de nove dias entre a primeira e a segunda. Nos animais do Grupo 1 (n=132), o agonista de GnRH empregado foi o Acetato de Buserelina (doses de 20 e 10 μ g para a primeira e a segunda aplicação, respectivamente), enquanto que nos animais do Grupo 2 (n=138), o agonista de GnRH utilizado foi a Lecirelina (50 e 25 μ g para a primeira e a segunda aplicação, respectivamente). Em ambos os grupos, sete dias após a primeira aplicação de GnRH foram administrados 15mg de prostaglandina (Luprostiol). A inseminação artificial foi efetuada em tempo fixo, sem considerar as manifestações de estro, 16 horas após a última aplicação de GnRH (Figura 3).



Figura 3. Esquema empregado para a sincronização da ovulação e a inseminação artificial em tempo fixo em bubalinos (^aConceptal®, Hoescht Roussel Veterinária S.A, São Paulo, Brasil; ^bGestran-Plus®, Tecnopec, São Paulo, Brasil; ^cProsolvín®, Intervet, Curitiba, Brasil).

Para a inseminação artificial foram utilizadas partidas de sêmen, analisadas e aprovadas conforme as normas do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998). As partidas de sêmen foram divididas uniformemente entre os grupos, para evitar possíveis interferências delas sobre a eficiência dos tratamentos. Além disso, as inseminações artificiais foram realizadas pelo mesmo técnico, para diminuir eventuais discrepâncias decorrentes do inseminador sobre o tratamento.

O diagnóstico de gestação foi efetuado trinta dias após as inseminações, por meio de ultra-sonografia, com transdutor linear de 5,0MHz.

3.4 EXPERIMENTO 4 - ADEQUAÇÃO DAS DOSES DE AGONISTAS DE GnRH (ACETATO DE BUSERELINA E LECIRELINA) DURANTE O PROTOCOLO DE SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO PARA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO EM BUBALINOS

3.4.1 ANIMAIS E LOCAL DO EXPERIMENTO

Foram utilizadas 482 búfalas da raça Murrah, com idades entre 3 e 10 anos, pertencentes a quatro propriedades localizadas no Vale do Ribeira que participam do programa de IA em bubalinos coordenado pelo VRA da FMVZ/USP, e a uma propriedade localizada no município de Dourado

(Fazenda Santa Elisa), Estado de São Paulo, no decorrer do primeiro semestre de 2000.

O manejo nutricional, sanitário e de produção de leite foi realizado de semelhançamente ao descrito no Experimento 1.

Em cada propriedade as búfalas foram divididas em 2 grupos experimentais, de acordo com o agonista de GnRH adotado: Acetato de Buserelina e Lecirelina. Cada um dos dois grupos foi subdividido em outros dois grupos, de acordo com as doses que receberam dos diferentes análogos do GnRH. Assim, os Grupos 1 e 2 receberam diferentes doses de Acetato de Buserelina, e os Grupos 3 e 4 receberam diferentes doses de Lecirelina. Para a formação dos grupos foram considerados a condição corporal e o período pós-parto.

3.4.2 PROTOCOLO DE SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO PARA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO

Os animais do Grupo 1 (n=84) e do Grupo 2 (n=86) receberam, em diferentes dias do período pós-parto (>40 dias), 20 μ g e 10 μ g de Acetato de Buserelina IM (Conceptal®), respectivamente. Sete dias mais tarde, foram tratados com 150 μ g de prostaglandina (D-Cloprostenol sódico, Preloban®). Dois dias após a administração da prostaglandina, as búfalas receberam 10 μ g de Acetato de Buserelina, IM. A inseminação artificial em tempo fixo foi

realizada 16 horas após a terceira administração hormonal em ambos os grupos (Figura 4).

- **Búfalas tratadas com diferentes doses de Acetato de Buserelina**

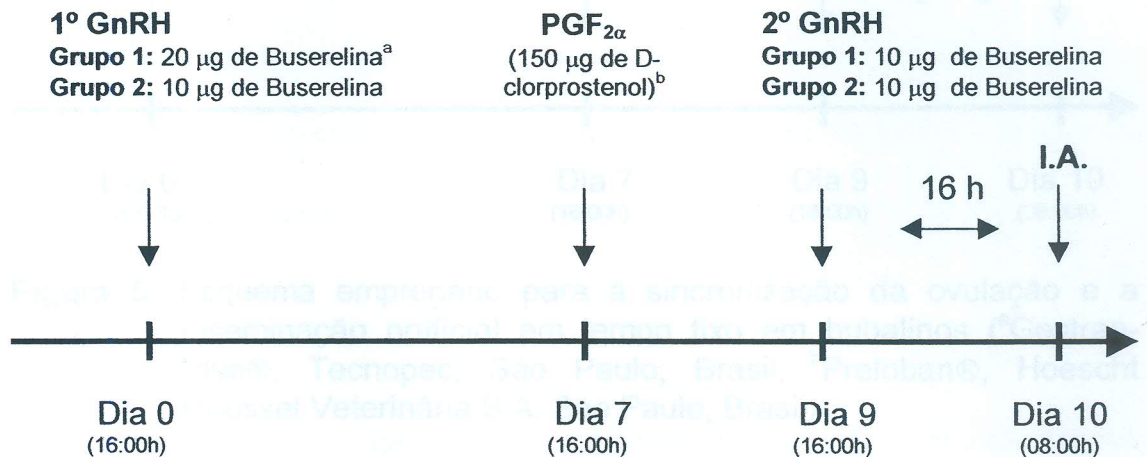


Figura 4. Esquema empregado para a sincronização da ovulação e a inseminação artificial em tempo fixo em bubalinos (^aConceptal®, Hoescht Roussel Veterinária S.A, São Paulo, Brasil; ^bPreloban®, Hoescht Roussel Veterinária S.A, São Paulo, Brasil)

As fêmeas do Grupo 3 (n=155) e do Grupo 4 (n=157) foram tratadas seguindo o mesmo protocolo, mas o análogo do GnRH utilizado foi a Lecirelina (Gestran-plus®), nas dosagens de 50µg (Grupo 3) e de 25µg (Grupo 4) na primeira e na segunda aplicação. A inseminação artificial em tempo fixo foi realizada 16 horas após a terceira administração hormonal em ambos os grupos (Figura 5). Para a inseminação artificial foram empregados os mesmos cuidados descritos no Experimento 3. O diagnóstico de gestação foi efetuado trinta dias após as inseminações, por meio de ultrassonografia, com um transdutor linear de 5,0MHz.

• **Búfalas tratadas com diferentes doses de Lecirelina**

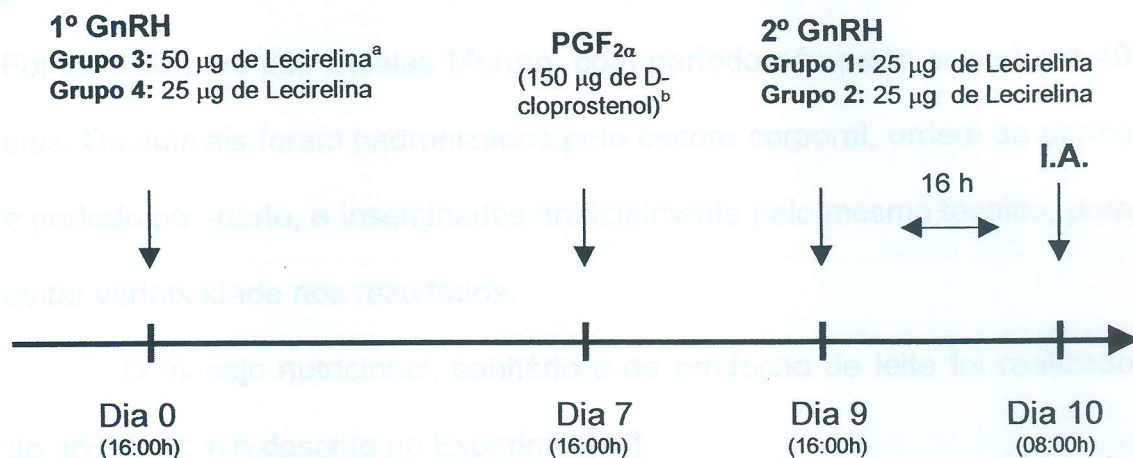


Figura 5. Esquema empregado para a sincronização da ovulação e a inseminação artificial em tempo fixo em bubalinos (^aGestran-Plus®, Tecnopec, São Paulo, Brasil; ^bPreloban®, Hoescht Roussel Veterinária S.A, São Paulo, Brasil).

3.5 EXPERIMENTO 5 - REDUÇÃO DA DOSE DE PROSTAGLANDINA F_{2α} NO TRATAMENTO DE SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO PARA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO EM BUBALINOS

3.5.1 ANIMAIS E LOCAL DO EXPERIMENTO

O experimento foi realizado em cinco propriedades do Vale do Ribeira que participam do programa de IA em bubalinos coordenado pelo VRA da FMVZ/USP, em uma propriedade do município de Dourado (Fazenda Santa Elisa), e em uma propriedade do município de São Carlos

(Fazenda Betel), todas localizadas no Estado de São Paulo, no decorrer do primeiro semestre de 2001 (estação reprodutiva favorável da espécie). Foram utilizadas 262 búfalas Murrah, com período pós-parto superior a 40 dias. Os animais foram padronizados pelo escore corporal, ordem de partos e período pós-parto, e inseminados artificialmente pelo mesmo técnico, para evitar variabilidade nos resultados.

O manejo nutricional, sanitário e de produção de leite foi realizado de acordo com o descrito no Experimento 1.

3.5.2 PROTOCOLO DE SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO PARA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO

Os animais do Grupo 1 (n=125) receberam 25 μ g de GnRH, IM (Lecirelina, Gestran-plus®) e, após sete dias, receberam 75 μ g de prostaglandina F_{2 α} , IM (D-Cloprotenol sódico, Preloban®). Dois dias após a aplicação da PGF_{2 α} , esses animais receberam 25 μ g de GnRH, IM (Lecirelina). Os animais do Grupo 2 (n=137) receberam o mesmo tratamento, à exceção da dose de de prostaglandina (150 μ g de D-Cloprotenol sódico, Preloban®). A inseminação artificial em tempo fixo foi realizada 16 horas após a terceira administração hormonal em ambos os grupos (Figura 6).

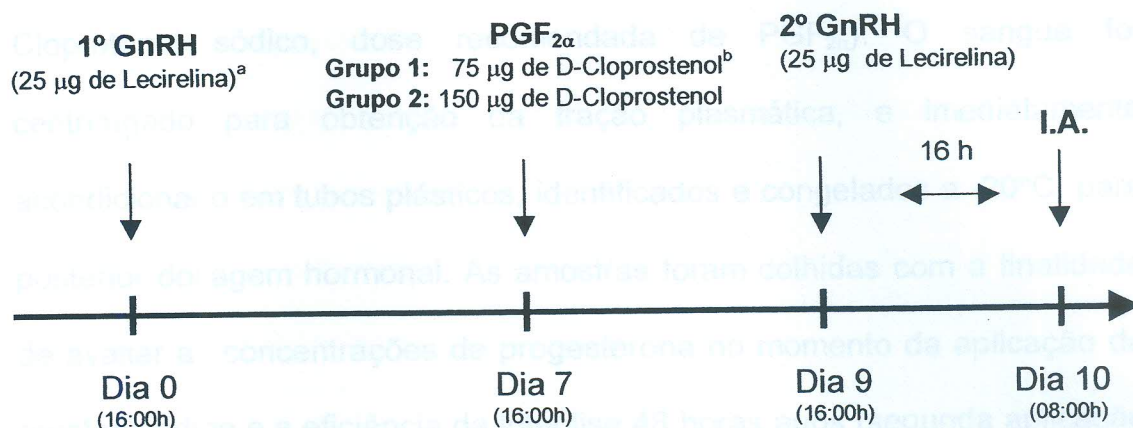


Figura 6. Esquema empregado para a sincronização da ovulação e a inseminação artificial em tempo fixo em bubalinos (^aGestran-Plus®, Tecnopec, São Paulo, Brasil; ^bPreloban®, Hoescht Roussel Veterinária S.A, São Paulo, Brasil).

Para a inseminação artificial foram adotados os mesmos cuidados do Experimento 3. O diagnóstico de gestação foi efetuado trinta dias após as inseminações, por meio de ultra-sonografia, com um transdutor linear de 5,0MHz.

3.5.3 COLHEITA DE SANGUE PARA DOSAGEM HORMONAL

Durante o protocolo de sincronização da ovulação foram colhidas amostras de sangue da veia jugular dos animais no momento da aplicação da prostaglandina (Dia 7) e da segunda administração do GnRH (Dia 9). Para tanto, foram utilizadas 35 búfalas do Grupo 1 (75µg de D-Cloprotenol

sódico, Preloban®; meia dose de PGF_{2α}), e 30 do Grupo 2 (150µg de D-Cloprotenol sódico, dose recomendada de PGF_{2α}). O sangue foi centrifugado para obtenção da fração plasmática, e imediatamente acondicionado em tubos plásticos, identificados e congelados a -20°C, para posterior dosagem hormonal. As amostras foram colhidas com a finalidade de avaliar as concentrações de progesterona no momento da aplicação da prostaglandina e a eficiência da luteólise 48 horas após (segunda aplicação de GnRH). Para a análise hormonal foi utilizado o teste comercial de radioimunoensaio (DPC, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, USA). Os ensaios foram realizadas no Laboratório de Dosagens Hormonais do VRA da FMVZ/USP, localizado em São Paulo-SP.

3.6 EXPERIMENTO 6 - EFICÁCIA DA ADMINISTRAÇÃO DE GnRH 7 DIAS ANTES DO TRATAMENTO DE SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO PARA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO EM BUBALINOS

3.6.1 ANIMAIS E LOCAL DO EXPERIMENTO

Foram utilizadas 223 búfalas da raça Murrah, pertencentes a cinco propriedades do Vale do Ribeira que participam do programa de IA em bubalinos coordenado pelo VRA da FMVZ/USP, e a uma propriedade no

município de São Carlos (Fazenda Betel), Estado de São Paulo, no decorrer do primeiro semestre de 2001.

Os grupos experimentais foram formados de acordo com a condição corporal e o período pós-parto.

O manejo nutricional, sanitário e de produção de leite foi realizado de acordo com o descrito no Experimento 1.

3.6.2 PROTOCOLO DE SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO PARA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO

No Grupo 1 (n=109), as fêmeas bubalinas receberam 25µg de GnRH, IM (Lecirelina, Gestran-plus®) sete dias antes (D-7) do início do tratamento para sincronização com GnRH/PGF_{2α}/GnRH, e inseminação artificial em tempo fixo em diferentes dias – aleatoriamente escolhidos - do período pós-parto (>40 dias). O Grupo 2 (n=114) – controle - recebeu uma aplicação de solução salina também no D-7. Em seguida, todos os animais foram tratados com 25µg de GnRH (dia 0), IM (Lecirelina, Gestran-plus®) e, sete dias mais tarde, foram aplicados 150µg de prostaglandina F_{2α}, IM (D-Cloprotenol sódico, Preloban®). Dois dias após a aplicação da PGF_{2α}, os animais receberam 25µg de GnRH, IM (Lecirelina). A inseminação artificial em tempo fixo foi realizada 16 horas após a terceira administração hormonal, em ambos os grupos (Figura 7).

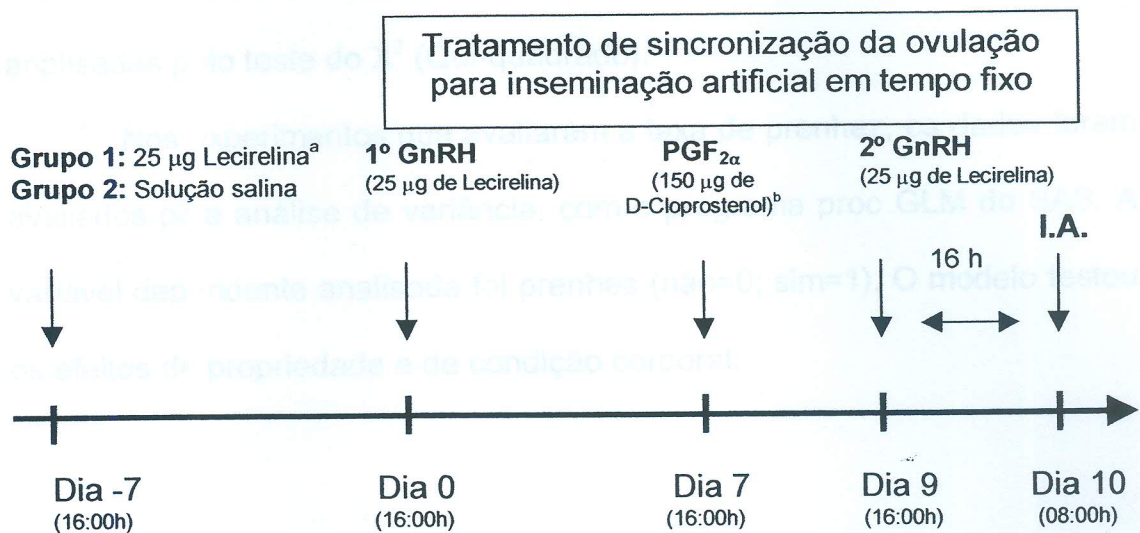


Figura 7. Esquema empregado para a sincronização da ovulação e a inseminação artificial em tempo fixo em bubalinos (^aGestran-Plus®, Tecnopec, São Paulo, Brasil; ^bPreloban®, Hoescht Roussel Veterinária S.A, São Paulo, Brasil).

Para a inseminação artificial foram empregados os mesmos cuidados do Experimento 3. O diagnóstico de gestação foi efetuado trinta dias após as inseminações, por meio de ultra-sonografia, com transdutor linear de 5,0MHz.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$. No Experimento 1, foram calculadas as medidas de tendência central (média \pm desvio padrão). O teste "t" de Student foi utilizado para avaliar as diferenças

entre as médias. As diferenças que implicavam em proporções foram analisadas pelo teste do X^2 (Qui-quadrado).

Nos experimentos que avaliaram a taxa de prenhez, os dados foram avaliados pela análise de variância, com o programa proc GLM do SAS. A variável dependente analisada foi prenhes (não=0; sim=1). O modelo testou os efeitos de propriedade e de condição corporal.

RESULTADOS

4.1 EXPERIMENTO 1 - ESTUDO DA DINÂMICA FOLIGULAR DURANTE O TRATAMENTO DE SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO PARA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO EM BUBALINOS

No Experimento 1 observou-se que 60,6% dos animais ovularam após a 1ª aplicação de GnRH. Não se verificou diferença estatisticamente significativa entre os Grupos (Grupo 1 = 70,5 vs Grupo 2 = 50,0%). Na Tabela 1 estão expostos os resultados do estudo da dinâmica folicular durante o tratamento.

O intervalo entre a 1ª aplicação de GnRH e a ovulação foi, em média, de $33,0 \pm 5,3$ h ($n=20$). A dose de GnRH (10 μ g vs 20 μ g) não afetou o tempo de ovulação ($P > 0,05$), sendo de $30,7 \pm 8,7$ horas para o Grupo 1 e de $34,9 \pm 8,1$ horas para o Grupo 2 (Tabela 1). A concentração de progesterona no momento da primeira aplicação de GnRH também não afetou a taxa de ovulação. Foram verificadas taxas semelhantes de ovulação por animais tratados na ausência (66,6%) ou na presença (55,5%) de progesterona (Tabela 3).

No dia da primeira aplicação de GnRH, o diâmetro folicular médio era de $5,7 \pm 1,9$ mm para os búfalos do Grupo 1 e de $5,7 \pm 1,9$ mm para os

RESULTADOS

animais do Grupo 2, não havendo diferença estatística entre ambos ($P > 0,05$; Tabela 1). Entretanto, analisando os grupos conjuntamente, verificou-se que os animais que ovularam ($n = 20$) após a primeira aplicação de GnRH apresentaram, em média, maior diâmetro folicular ($P < 0,01$) que

4.1 EXPERIMENTO 1 - ESTUDO DA DINÂMICA FOLICULAR DURANTE O TRATAMENTO DE SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO PARA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO EM BUBALINOS

No Experimento 1 observou-se que 60,6% dos animais ovularam após a 1ª aplicação de GnRH. Não se verificou diferença estatisticamente significativa entre os Grupos (Grupo 1 = 70,5 vs Grupo 2 = 50,0%). Na Tabela 1 estão expostos os resultados do estudo da dinâmica folicular durante o tratamento.

O intervalo entre a 1ª aplicação de GnRH e a ovulação foi, em média, de $33,0 \pm 8,3$ h (n=20). A dose de GnRH (10 μ g vs 20 μ g) não interferiu no tempo de ovulação (P > 0,05), sendo de $30,7 \pm 8,7$ horas para o Grupo 1 e de $34,9 \pm 8,4$ horas para o Grupo 2 (Tabela 1). A concentração de progesterona no momento da primeira aplicação de GnRH também não interferiu na taxa de ovulação. Foram verificadas taxas semelhantes de ovulação para animais tratados na ausência (66,6%) ou na presença (55,5%) de progesterona (Tabela 3).

No dia da primeira aplicação de GnRH, o diâmetro folicular médio era de $8,0 \pm 1,9$ mm para as búfalas do Grupo 1, e de $8,7 \pm 2,7$ mm para as fêmeas do Grupo 2, não havendo diferença estatística entre ambos (P > 0,05; Tabela 1). Entretanto, analisando os grupos conjuntamente, verificou-se que os animais que ovularam (n = 20) após a primeira aplicação de GnRH apresentaram, em média, maior diâmetro folicular (P < 0,01) que

aqueles que não ovularam ($n = 13$): $9,5 \pm 1,7$ vs $6,7 \pm 2,4$ mm, respectivamente.

No dia da aplicação de $\text{PGF}_{2\alpha}$, os folículos tinham diâmetro médio de $10,3 \pm 2,0$ mm (0,7 a 1,5mm). O Grupo 1 apresentou maior diâmetro folicular que o Grupo 2 ($11,2 \pm 1,7$ vs $9,1 \pm 1,5$ mm; $P < 0,01$). Notou-se, também, que os animais que ovularam após a primeira aplicação de GnRH ($n=20$) apresentaram maiores concentrações de progesterona no dia da aplicação da $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($2,56 \pm 1,02$ vs $1,26 \pm 0,82$ ng/ml; $P < 0,05$). A totalidade (100%) dos animais apresentaram concentrações plasmáticas de progesterona inferiores a 1ng/ml 48 horas após o tratamento com $\text{PGF}_{2\alpha}$.

O intervalo entre a 2ª aplicação de GnRH e a ovulação foi de $32,0 \pm 5,7$ horas para os Grupos 1 e 2. Os animais que não ovularam à primeira aplicação de GnRH apresentaram intervalo mais curto ($P < 0,01$) entre a segunda aplicação de GnRH e a ovulação que aqueles que ovularam ($26,8 \pm 4,1$ vs $33,9 \pm 4,9$ h; Tabela 2). Também foi possível constatar que os animais do grupo 1 apresentaram menor intervalo que aqueles do Grupo 2 ($29,3 \pm 5,6$ vs $34,1 \pm 5,0$ h; $P < 0,05$; Tabela 1). Apesar das diferenças encontradas, a maioria das ovulações sincronizadas após a segunda aplicação de GnRH ocorreu dentro de um período de 12 horas (92,3%; 24/26; Gráfico 1), e de 24 horas (100% 26/26), para os Grupos 1 e 2, quando analisados conjuntamente.

Vinte e seis (78,8%) dos animais tratados ($n=33$) apresentaram ovulação sincronizada (Grupo 1 = 62,7%; Grupo 2 = 88,2%), 6 (15,1%) ovularam entre a aplicação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e o segundo tratamento com GnRH, e

2 (6,0%) não ovularam após o final do tratamento (Tabela 4). A primeira dose de GnRH não interferiu ($P > 0,05$) na eficiência do protocolo, não sendo observada diferença entre os Grupos com relação às taxas de ovulação sincronizada. Entretanto, quando os dados foram analisados conjuntamente, apesar de não ocorrer diferença estatística, os resultados sugerem tendência ($P = 0,06$) de melhores resultados no grupo de búfalas que ovularam à primeira aplicação de GnRH que naquelas que não ovularam (90,0 vs 61,5%, respectivamente; Tabela 2). Os animais que não ovularam à primeira aplicação de GnRH apresentaram tendência a manifestar ovulações antecipadas entre a aplicação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e a segunda dose de GnRH (5,0 vs 30,8%; $P = 0,06$).

Diâmetro do maior oócito no momento do tratamento (mm)	12,7 ± 1,9 (12/16)	10,8 ± 3,2 (15/17)	0,08
Diâmetro máximo do oócito ovulatório (mm)	13,3 ± 1,0 (11/18)	13,3 ± 1,7 (15/17)	0,99
Intervalo entre o tratamento e a ovulação (h)	29,3 ± 5,5 (11/16)	34,1 ± 5,0 (16/17)	0,03
Taxa de ovulação sincronizada (%)	90,0 (11/12)	61,5 (10/16)	0,30

TABELA 1. Dinâmica folicular durante o tratamento de sincronização da ovulação com GnRH/PGF_{2α}/GnRH, para inseminação em tempo fixo em bubalinos - São Paulo - 1998

Dinâmica folicular	Grupo 1 (10µg)	Grupo 2 (20µg)	Valor do P
Primeiro tratamento com GnRH (D-0)			
Diâmetro do maior fólculo no momento do tratamento (mm)	8,0 ± 1,9 (16/16)	8,7 ± 2,7 (17/17)	0,36
Diâmetro máximo do fólculo ovulatório (mm)	11,0 ± 0,9 (8/16)	11,7 ± 1,9 (12/17)	0,31
Intervalo entre o tratamento e a ovulação (h)	30,7 ± 8,7 (8/16)	34,9 ± 8,4 (12/17)	0,28
Taxa de ovulação (%)	50,0 (8/16)	70,5 (12/17)	0,20
Tratamento com PGF_{2α} (D-7)			
Diâmetro do maior fólculo no momento do tratamento (mm)	11,2 ± 1,7 (16/16)	9,1 ± 1,5 (17/17)	<0,001
Fólculo Dominante (> 8 mm) (%)	87,5 (14/16)	76,5 (13/17)	0,21
Segundo tratamento com GnRH (D-9)			
Diâmetro do maior fólculo no momento do tratamento (mm)	12,7 ± 1,9 (12/16)	10,8 ± 3,2 (16/17)	0,06
Diâmetro máximo do fólculo ovulatório (mm)	13,3 ± 1,0 (11/16)	13,3 ± 1,7 (15/17)	0,99
Intervalo entre o tratamento e a ovulação (h)	29,3 ± 5,6 (11/16)	34,1 ± 5,0 (15/17)	0,03
Taxa de ovulação sincronizada (%)	68,7 (11/16)	88,2 (15/17)	0,30

TABELA 2. Taxa de ovulação conforme a concentração plasmática de progesterona no momento da primeira aplicação de GnRH em fêmeas bubalinas sincronizadas com GnRH/PGF_{2α}/GnRH, para inseminação artificial em tempo fixo - São Paulo - 1998

Concentração de Progesterona (ng/ml)	Número de Animais	Taxa de Ovulação (%)
< 1,0	15	53,3 (10)
> 1,0	18	55,5 (10)
Total	33	60,6 (20)

TABELA 2. Efeito da ovulação à primeira aplicação de GnRH na eficiência do protocolo de sincronização da ovulação com GnRH/PGF_{2α}/GnRH, para inseminação artificial em tempo fixo em bubalinos - São Paulo - 1998

	Ovulação ao 1° GnRH (Dia 0)	Ausência de ovulação ao 1° GnRH (Dia 0)	Valor de P
Número de animais	20/33 (60,6%)	13/33 (39,4%)	
Diâmetro do maior folículo no momento da aplicação do primeiro GnRH (mm)	9,5 ± 1,7	6,9 ± 2,4	< 0,002
Diâmetro do maior folículo no momento da aplicação da PGF _{2α} (mm)	9,0 ± 1,3	11,7 ± 1,9	< 0,001
Concentração de progesterona no momento da aplicação de PGF _{2α} (ng/ml)	2,56 ± 1,02	1,26 ± 0,82	0,0006
Sincronização da ovulação após a segunda aplicação de GnRH (%)	90,0 (18/20)	61,5 (8/13)	0,06
Intervalo entre a aplicação do segundo GnRH e a ovulação (h)	33,9 ± 4,9	26,8 ± 4,1	0,001
Ovulações entre a aplicação da PGF _{2α} e do 2° GnRH (%)	5,0 (1/20)	30,8 (4/13)	0,06
Ausência de ovulação após o 2° GnRH (%)	5,0 (1/20)	5,8 (1/13)	0,64

TABELA 3. Taxa de ovulação conforme a concentração plasmática de progesterona no momento da primeira aplicação de GnRH em fêmeas bubalinas sincronizadas com GnRH/PGF_{2α}/GnRH, para inseminação artificial em tempo fixo - São Paulo - 1998

Concentração de Progesterona (ng/ml)	Número de Animais	Taxa de Ovulação (%)
< 1,0	15	66,6 (10)
> 1,0	18	55,5 (10)
Total	33	60,6 (20)

TABELA 4. Eficiência do protocolo de sincronização da ovulação com GnRH/PGF_{2α}/GnRH, para inseminação artificial em tempo fixo, conforme a dose de GnRH em bubalinos - São Paulo - 1998

Dose de GnRH	Ovulação Sincronizada	Ovulação não sincronizada	Ausência de ovulação após o 2° GnRH
10 µg	11/16 (68,7%)	4/16 (25,0%)	1/16 (6,2%)
20 µg	15/17 (88,2%)	1/17 (5,9%)	1/17 (5,8%)
Total	26/33 (78,8%)	5/33 (15,1%)	2/33 (6,0%)

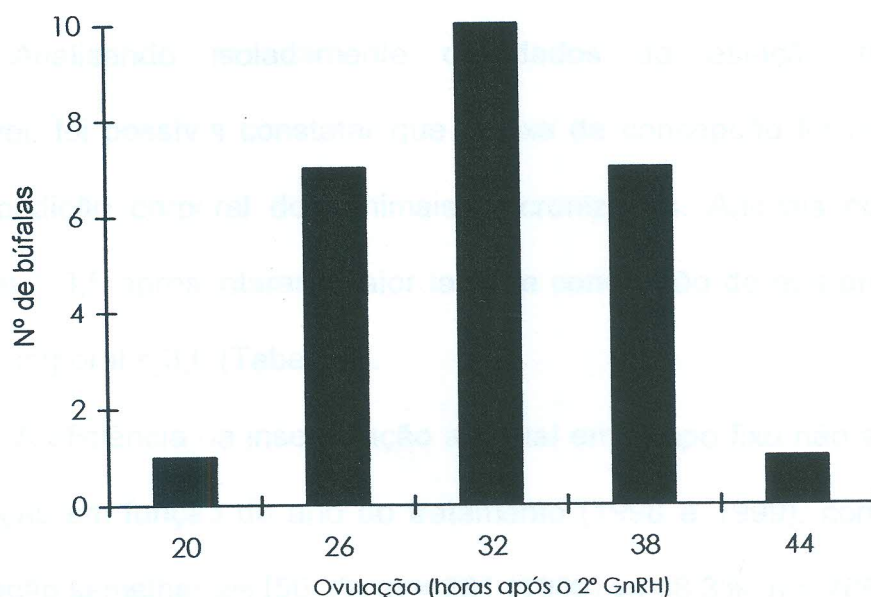


GRÁFICO 1. Distribuição das ovulações após a segunda aplicação de GnRH (média de $32,0 \pm 5,7$ h), em fêmeas bubalinas tratadas com o protocolo de sincronização da ovulação com GnRH/PGF_{2α}/GnRH, para inseminação artificial em tempo fixo (n=26). São Paulo, 1998.

4.2 EXPERIMENTO 2 - AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA A CAMPO DO PROTOCOLO DE SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO PARA INSEMINAÇÃO EM TEMPO FIXO EM BUBALINOS

A taxa de concepção das 1053 búfalas do experimento demonstrou resposta ao tratamento hormonal (média de 45,4%). Entretanto, os animais sincronizados durante a estação reprodutiva favorável apresentaram resultados superiores àqueles dos animais sincronizados durante o período desfavorável (48,8% vs 6,9%; $P < 0,05$; Tabela 5).

Analisando isoladamente os dados da estação reprodutiva favorável, foi possível constatar que a taxa de concepção foi influenciada pela condição corporal dos animais sincronizados. Animais com escore corporal $\geq 3,5$ apresentaram maior taxa de concepção do que animais com escore corporal $\leq 3,0$ (Tabela 6).

A eficiência da inseminação artificial em tempo fixo não apresentou diferenças em função do ano do tratamento (1998 e 1999), com taxas de concepção semelhantes [50,2%, $n = 261$ (1998) vs 48,3%, $n = 706$ (1999); $P > 0,05$].

As búfalas múltiparas apresentaram maiores taxas de concepção (51,0%) que as primíparas (35,5%), e essas taxas diferiram estatisticamente ($P < 0,05$; Tabela 7).

O período pós-parto não interferiu na taxa de concepção das búfalas sincronizadas. A taxa de concepção dos animais inseminados antes

de 60 dias foi de 50,9% (170/334); entre 60 a 99 dias de 48,2% (158/328), e acima de 100 dias, de 47,2% (144/305; Tabela 8).

TABELA 5. Taxa de concepção de búfalas sincronizadas com GnRH/PGF_{2α}/GnRH e inseminadas em tempo fixo, conforme a estação reprodutiva - São Paulo - 1998/1999

Estação reprodutiva	Número de animais	Taxa de concepção % (n)
Estação favorável (abril a agosto)	967	48,8 (472) ^a
Estação desfavorável (setembro a dezembro)	86	6,9 (06) ^b
Total	1053	45,4 (478)

(a ≠ b; P < 0,05)

(n) búfalas prenhes

TABELA 6. Taxa de concepção de búfalas sincronizadas com GnRH/PGF_{2α}/GnRH e inseminadas em tempo fixo, conforme a condição corporal. São Paulo - 1998/1999

Condição Corporal	Número de animais	Taxa de concepção % (n)
≤ 3,0	223	31,1 (70) ^a
3,5	546	52,9 (289) ^b
≥ 4,0	198	57,1 (113) ^b
Total	967	48,8 (472)

(a ≠ b; P < 0,05)

(n) búfalas prenhes

TABELA 7. Taxa de concepção de búfalas sincronizadas com GnRH/PGF_{2α}/GnRH e inseminadas em tempo fixo, conforme a ordem de partos - São Paulo - 1998/1999

Ordem de Partos	Número de animais	Taxa de concepção % (n)
Primíparas	138	35,5 (49) ^a
Múltiparas	829	51,0 (423) ^b
Total	967	48,8 (472)

(a ≠ b; P < 0,05)

(n) búfalas prenhes

TABELA 8. Taxa de concepção de búfalas sincronizadas com GnRH/PGF_{2α}/GnRH e inseminadas em tempo fixo, conforme o período pós parto - São Paulo - 1998/1999

Período pós-parto (dias)	Número de animais	Taxa de concepção % (n)
< 60	334	50,9 (170)
60 a 99	328	48,2 (158)
> 100	305	47,2 (144)
Total	967	48,8 (472)

(n) búfalas prenhes

4.3 EXPERIMENTO 3 - AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA LECIRELINA PARA A SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO E INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO EM BUBALINOS

Neste experimento não se observou efeito da interação propriedade - tratamento (0,89) sobre as taxas de concepção, que foram semelhantes nas duas propriedades. Na propriedade A, os animais tratados com Acetato de Buserelina apresentaram taxa de concepção de 48,5% (34/70), semelhante ($P > 0,05$) àquela constatada nas búfalas tratadas com Lecirelina (50,7%; 37/73). Na propriedade B, os animais também apresentaram taxas de concepção semelhantes em resposta aos dois tratamentos (Acetato de Buserelina = 45,2%, 28/62; Lecirelina = 49,2%, 32/65). As taxas de concepção por propriedade estão apresentadas na Tabela 9.

Os dados das propriedades foram agrupados conjuntamente, e estão apresentados na Tabela 10. Foram observadas taxas médias de concepção de 47,0% para os animais sincronizados com Acetato de Buserelina, e de 50,0% para aqueles que receberam Lecirelina, as quais não representam diferença estatística ($P > 0,05$).

TABELA 9. Taxas de concepção, conforme o agonista de GnRH empregado para a sincronização da ovulação com GnRH/PGF_{2α}/GnRH – São Paulo (Fazenda A) e Mato Grosso do Sul (Fazenda B) - 1999

Propriedade	Tratamento	Agonista de GnRH	Taxa de concepção % (n)
Propriedade A	Grupo 1	Buserelina	48,5 (34/70)
	Grupo 2	Lecirelina	50,7 (37/73)
Propriedade B	Grupo 1	Buserelina	45,2 (28/62)
	Grupo 2	Lecirelina	49,2 (32/65)

TABELA 10. Taxa de concepção conforme o agonista de GnRH empregado para a sincronização da ovulação com GnRH/PGF_{2α}/GnRH e inseminação artificial em tempo fixo em bubalinos – São Paulo e Mato Grosso do Sul - 1999

Tratamento	Agonista de GnRH	Taxa de concepção % (n)
Grupo 1	Buserelina	47,0 (62/132)
Grupo 2	Lecirelina	50,0 (69/138)
Total		48,5 (133/270)

4.4 EXPERIMENTO 4 - ADEQUAÇÃO DAS DOSES DE AGONISTAS DE GnRH (ACETATO DE BUSERELINA E LECIRELINA) DURANTE O PROTOCOLO DE SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO PARA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO EM BUBALINOS

Também no Experimento 4 não se observou efeito da interação propriedade - tratamento (0,78) sobre as taxas de concepção, que foram semelhantes nas propriedades. Essas taxas, tampouco, sofreram influência da interação condição corporal - tratamento. Assim, a única variável independente considerada no modelo foi o tratamento.

A análise das taxas de concepção dos grupos experimentais permitiu constatar que os tratamentos não apresentaram diferenças estatísticas entre si. Os animais tratados com diferentes doses de Acetato de Buserelina na primeira aplicação de GnRH (Grupo 1 = 20 μ g vs Grupo 2 = 10 μ g) apresentaram taxas de concepção semelhantes ($P > 0,05$). No Grupo 1, das 84 búfalas tratadas e inseminadas em tempo fixo, 47 (55,9%) tornaram-se gestantes e, no Grupo 2, das 86 búfalas tratadas, 45 (52,3%) engravidaram (Tabela 11).

Os Grupos 3 e 4, tratados com diferentes doses de Lecirelina quando da primeira aplicação de GnRH (Grupo 3 = 50 μ g vs Grupo 4 = 25 μ g), também não apresentaram diferenças entre si. No Grupo 3 foi observada taxa de concepção de 49,0% (76/155), semelhante à taxa de 48,4% (76/157) verificada para o Grupo 4 (Tabela 12).

Uma vez que não foram observadas diferenças entre os grupos, foi possível estimar a redução de custos dos tratamentos (Tabela 13): houve economia de R\$13,68 por prenhez nos animais tratados com reduzidas doses de Acetado de Buserelina, e de R\$6,44 por prenhez nas fêmeas tratadas com reduzidas doses de Lecirelina.

TABELA 11. Taxa de concepção de fêmeas bubalinas sincronizadas com GnRH/PGF_{2α}/GnRH para inseminação artificial em tempo fixo, conforme a dose utilizada na primeira aplicação de GnRH (Acetado de Buserelina) - São Paulo - 2000

Dose do primeiro GnRH	Número de animais	Taxa de concepção %
20 µg	84	55,9 (47/84)
10 µg	86	52,3 (45/86)
Total	170	54,1 (92/170)

TABELA 12. Taxa de concepção de fêmeas bubalinas sincronizadas com GnRH/PGF_{2α}/GnRH para inseminação artificial em tempo fixo, conforme a dose utilizada na primeira aplicação de GnRH (Lecirelina) - São Paulo, - 2000

Dose do primeiro GnRH	Número de animais	Taxa de concepção % (n)
50 µg	155	49,0 (76/155)
25 µg	157	48,4 (76/157)
Total	312	48,7 (152/312)

TABELA 13. Análise de custos da sincronização da ovulação com GnRH/PGF_{2α}/GnRH para inseminação artificial em tempo fixo em bubalinos, com redução das doses utilizadas na primeira aplicação de GnRH (Acetato de Buserelina - 20µg vs 10µg - e Lecirelina - 50µg vs 25µg) - São Paulo - 2001

	Experimento 1 (Acetato de buserelina)		Experimento 2 (Lecirelina)	
	Dose total	Meia dose	Dose total	Meia dose
Numero de animais	84	86	155	157
Número de Prenhes^a	47	45	76	76
Custo do GnRH^b				
Por búfala (R\$)	27,79	18,50	9,90	6,60
Por Prenhez (R\$)	49,60	35,36	20,19	13,63
Custo da PGF_{2α}^b				
Por búfala (R\$)	4,50	4,50	4,50	4,50
Por Prenhez (R\$) ^c	8,04	8,60	9,18	9,30
Custo total do tratamento				
Por búfala (R\$)	32,29	23,00	14,40	11,10
Por Prenhez (R\$)	57,64	43,96	29,37	22,93

^a Número de búfalas prenhes ao exame ultra-sonográfico 30 dias após a IA.

^b Custo médio dos hormônios, orçado em duas empresas agropecuárias. Médias de R\$3,30 por 25µg de Lecirelina e de R\$9,25 por 10µg de Acetato de Buserelina.

^c O custo por prenhez foi calculado dividindo o total do custo com os hormônios pelo número de búfalas prenhes.

Cotação do dólar no dia do orçamento (US\$1.00 = R\$2,50).

4.5 EXPERIMENTO 5 - REDUÇÃO DA DOSE DE PROSTAGLANDINA F_{2α} NO TRATAMENTO DE SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO PARA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO EM BUBALINOS

Não se verificou efeito da interação propriedade - tratamento (0,44), bem como da interação condição corporal - tratamento neste experimento. Assim, o modelo utilizado empregou como variável independente apenas o tratamento. A eficiência da luteólise, medida pela concentração plasmática de progesterona 48 horas após a aplicação de prostaglandina, não diferiu ($P > 0,05$) entre os tratamentos. Observou-se que, nas búfalas tratadas com meia dose de prostaglandina (75 μ g), 88,6% (n=35) tiveram luteólise, e que, nos animais tratados com as doses desse hormônio recomendadas pelos fabricantes (150 μ g), 90,0% (n = 30) manifestaram esse quadro (Tabela 14, Gráfico 2). Quatro animais (11,42%) do grupo que recebeu meia dose de PGF_{2 α} , e 3 (10,0%) fêmeas do grupo no qual foi administrada dose recomendada não apresentaram diminuição das concentrações plasmáticas de progesterona 48 horas após o tratamento (Gráfico 3).

A taxa de concepção não foi influenciada pela dosagem de PGF_{2 α} ($P > 0,05$). O Grupo tratado com meia dose de PGF_{2 α} (75 μ g; n=125) apresentou taxa de concepção semelhante àquela do grupo tratado com a dose recomendada de PGF_{2 α} (150 μ g; n=137), como demonstra a Tabela 15). As taxa de concepção foram de 48,0% (60/125) e 40,9% (56/137),

respectivamente, para os grupos tratados com meia dose e com a dose recomendada.

A economia, para cada búfala prenhe tratada com dose reduzida de prostaglandina, foi de R\$8,81 (Tabela 16).

TABELA 14. Resposta luteolítica de fêmeas bubalinas tratadas com diferentes doses de prostaglandina no protocolo de sincronização da ovulação (GnRH/PGF_{2α}/GnRH), para inseminação artificial em tempo fixo - São Paulo - 2001

Grupos experimentais	Dose de Prostaglandina (D-cloprostenol sódico)	Número de animais com concentração de P4 > 1ng/ml no dia da PGF _{2α}	Percentual de animais com concentração de P4 < 1ng/ml 48h após a aplicação de PGF _{2α} - % (n)
½ dose de PGF _{2α}	75 µg	35	88,6 (31/35)
Dose recomendada de PGF _{2α}	150 µg	30	90,0 (27/30)
Total		65	89,2 (58/65)

* Considerou-se resposta luteolítica a concentração plasmática de progesterona inferior a 1ng/ml 48 horas após a aplicação de prostaglandina.

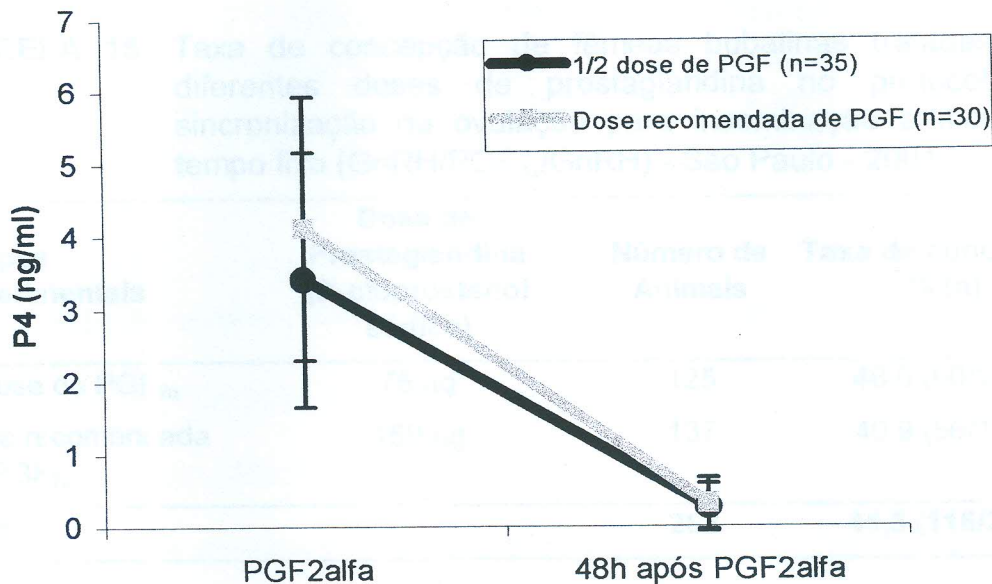


GRÁFICO 2. Concentração média de progesterona no momento da aplicação de prostaglandia (D-Cloprostenol sódico) e após 48 horas, em fêmeas bubalinas sincronizadas com GnRH/PGF_{2α}/GnRH (n = 65). São Paulo, 2001.

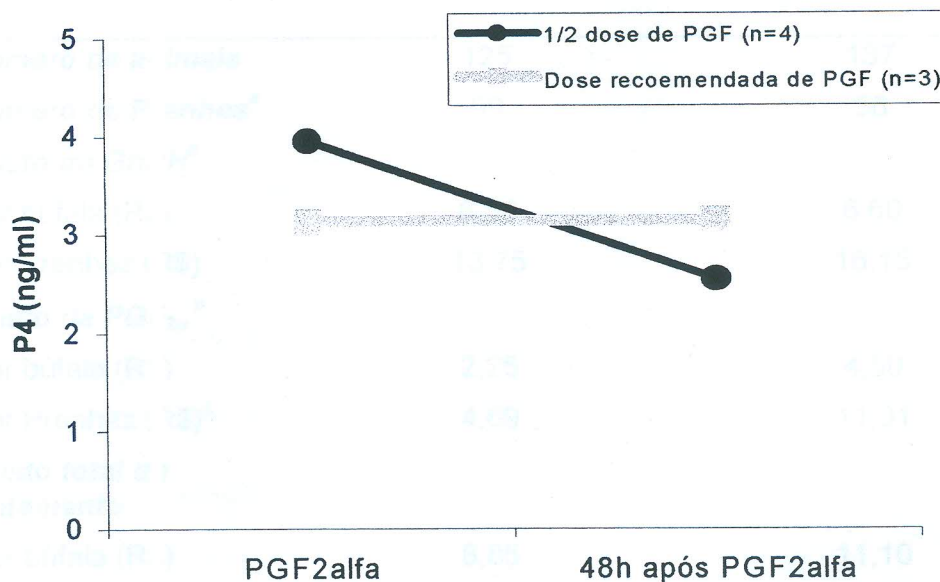


GRÁFICO 3. Concentração média de progesterona no momento da aplicação de prostaglandia (D-Cloprostenol sódico) e após 48 horas, em fêmeas bubalinas sincronizadas com GnRH/PGF_{2α}/GnRH (n = 7). São Paulo, 2001.

TABELA 15. Taxa de concepção de fêmeas bubalinas tratadas com diferentes doses de prostaglandina no protocolo de sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo (GnRH/PGF_{2α}/GnRH) - São Paulo - 2001

Grupos experimentais	Dose de Prostaglandina (D-cloprostenol sódico)	Número de Animais	Taxa de concepção % (n)
½ dose de PGF _{2α}	75 µg	125	48,0 (60/125)
Dose recomendada de PGF _{2α}	150 µg	137	40,9 (56/137)
Total		262	44,3 (116/262)

TABELA 16. Análise de custos da sincronização da ovulação com GnRH/PGF_{2α}/GnRH para inseminação artificial em tempo fixo em bubalinos, com redução da dose de prostaglandina (D-Cloprostenol sódico, 75µg vs 150µg) - São Paulo - 2001

	Experimento 1 (1/2 dose; 75 µg)	Experimento 2 (Dose recomendada; 150 µg)
Numero de animais	125	137
Número de Prenhes^a	60	56
Custo do GnRH^b		
Por búfala (R\$)	6,60	6,60
Por Prenhez (R\$)	13,75	16,15
Custo da PGF_{2α}^b		
Por búfala (R\$)	2,25	4,50
Por Prenhez (R\$) ^c	4,69	11,01
Custo total do tratamento		
Por búfala (R\$)	8,85	11,10
Por Prenhez (R\$)	18,44	27,25

^a Número de búfalas prenhes ao exame ultra-sonográfico 30 dias após a IA.

^b Custo médio dos hormônios, orçado em duas empresas agropecuárias. Médias de R\$3,30 reais por 25µg de Lecirelina e de R\$4,50 por 150µg de D-Cloprostenol sódico.

^c O custo por prenhez foi calculado dividindo o total do custo com os hormônios pelo número de búfalas prenhes.

Cotação do dólar no dia do orçamento (US\$1.00 = R\$2,50).

4.6 EXPERIMENTO 6 - EFICÁCIA DA ADMINISTRAÇÃO DE GnRH 7 DIAS ANTES DO TRATAMENTO DE SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO PARA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO EM BUBALINOS

Não se verificou efeito de interação propriedade - tratamento (0,88), bem como da interação condição corporal - tratamento neste experimento. Assim, o modelo utilizado empregou como variável independente apenas o tratamento. Os animais que receberam GnRH 7 dias antes do tratamento tradicional de sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo apresentaram maiores taxas de concepção ($P < 0,01$). Foram observadas taxas de concepção de 39,5% para o grupo controle, e de 56,0% para os animais que receberam GnRH 7 dias antes do tratamento tradicional (Tabela 17).

A análise de custos indicou que os animais tratados com GnRH 7 dias antes do início do protocolo de sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo apresentaram custo adicional por búfala sincronizada (R\$14,40 vs R\$11,10). No entanto, o custo por prenhez, nesse mesmo grupo, foi inferior àquele do grupo controle (R\$25,73 vs R\$28,12), conforme demonstra a Tabela 18.

Custo por búfala (R \$)	11,10	14,40
Custo por prenhez (R \$)	28,12	25,73

Número de búfalas prenhes ao exame ultrassonográfico 30 dias após a IA.

Custo médio dos hormônios, usado em duas empresas agropecuárias: Meios de R\$3,30 por 25mg de Leuprolina, e de R\$4,80 por 150mg de O-Cloprostenol sódico.

O custo por prenhez foi calculado dividindo o total do custo com os hormônios pelo número de búfalas prenhes.

Capítulo 18. 2018 no dia do nascimento (US\$1,00 = R\$2,50)

TABELA 17. Taxa de concepção de fêmeas bubalinas tratadas com GnRH 7 dias antes do início da sincronização da ovulação com GnRH/PGF_{2α}/GnRH para inseminação artificial em tempo fixo - São Paulo - 2001

Grupos experimentais	Número de Animais	Taxa de Concepção (%)
Pré-sincronização com GnRH (Dia -7)	109	56,0 (61/109) ^a
Controle	114	39,5 (45/114) ^b
Total	223	47,5 (106/223)

(a ≠ b; P < 0,01)

TABELA 18. Análise de custos da sincronização da ovulação com GnRH/PGF_{2α}/GnRH para inseminação artificial em tempo fixo em fêmeas bubalinas tratadas com GnRH 7 dias antes do início do protocolo tradicional. São Paulo, 2001.

	Experimento 1 (controle)	Experimento 2 (Pré-sincronização com GnRH, Dia -7)
Numero de animais	114	109
Número de Prenhes^a	45	61
Custo do GnRH^b		
Por búfala (R\$)	6,60	9,90
Por Prenhez (R\$)	16,72	17,69
Custo da PGF_{2α}^b		
Por búfala (R\$)	4,50	4,50
Por Prenhez (R\$) ^c	11,40	8,04
Custo total do tratamento		
Por búfala (R\$)	11,10	14,40
Por Prenhez (R\$)	28,12	25,73

^a Número de búfalas prenhes ao exame ultra-sonográfico 30 dias após a IA.

^b Custo médio dos hormônios, orçado em duas empresas agropecuárias. Médias de R\$3,30 por 25µg de Lecirelina, e de R\$4,50 por 150µg de D-Cloprostenol sódico.

^c O custo por prenhez foi calculado dividindo o total do custo com os hormônios pelo número de búfalas prenhes.

Cotação do dólar no dia do orçamento (US\$1.00 = R\$2,50).

com a resposta à sincronização da ovulação com GnRH. Há um grande número de fêmeas bubalinas ovulando pouco tempo depois do primeiro serviço do tratamento (Experimento 1). Tais resultados coincidem com a resposta à sincronização artificial em tempo fixo na espécie bubalina, apresentada por diversos de bons resultados, como PURSLEY *et al.* (1997) com o uso de *antagonism* em bovinos.

No Experimento 1, após a primeira aplicação de GnRH do protocolo de sincronização, foi verificada taxa média de ovulação de 66,6%. Os resultados desse experimento resultaram taxa de ovulação inferior às taxas relatadas em bovinos por WILT BANK (1997) - 80% - e PURSLEY *et al.* (1997) - 90%. No entanto, os resultados de estudo realizado no tratamento de Ruzá com bubalinas (BERBER *et al.*, 2001) também demonstraram uma taxa de ovulação após a primeira aplicação de GnRH (80%) a partir de resultados encontrados em bovinos. É possível que os resultados de BERBER *et al.* (2001) possam ter sido influenciados positivamente pela utilização do protocolo de sincronização do experimento, pois estes utilizaram fêmeas com condição corporal e a nível fisiológico de 3,0-5) para a aplicação do tratamento, uma vez que PURSLEY *et al.* (2001a) demonstraram maior eficiência reprodutiva em fêmeas bubalinas com melhor condição corporal.

DISCUSSÃO

Para WILT BANK *et al.* (1998), a taxa de ovulação após a administração de GnRH está associada ao número de ovários com folículos dominantes - estágios avançados de crescimento - presentes no momento do tratamento. No Experimento 1 da presente investigação, o diâmetro folicular no momento do

Em resposta à sincronização da ovulação com GnRH/PGF_{2α}/GnRH, grande número de fêmeas bubalinas ovulou decorrido curto período de tempo do término do tratamento (Experimento 1). Tais resultados indicam que a inseminação artificial em tempo fixo na espécie bubalina apresenta perspectivas de bons resultados, como PURSLEY *et al.* (1995) verificaram anteriormente em bovinos.

No Experimento 1, após a primeira aplicação de GnRH do protocolo de sincronização, foi verificada taxa média de ovulação de 60,6%. Os resultados desse experimento assinalam taxa de ovulação inferior àquelas observadas em bovinos por WILTBANK (1997) - 85% - e PURSLEY *et al.* (1995) - 90%. No entanto, os resultados de estudo realizado recentemente no Brasil com bubalinos (BERBER *et al.*, 2001) também demonstraram alta taxa de ovulação à primeira aplicação de GnRH (86%), à semelhança dos resultados encontrados em bovinos. É possível que os resultados de BERBER *et al.* (2001) possam ter sido influenciados positivamente pela condição corporal dos animais do experimento, pois esses estudiosos selecionaram animais com condição corporal \geq a 3,5 (escala de 1 a 5) para avaliar a resposta ao tratamento, uma vez que BARUSELLI *et al.* (2001a) constataram maior eficiência reprodutiva em fêmeas bubalinas com melhor condição corporal.

Para MARTINEZ *et al.* (1999), a taxa de ovulação após o tratamento com GnRH está associada ao número de animais com folículos dominantes - na fase de crescimento - presentes no momento do tratamento. No Experimento 1 da presente investigação, o diâmetro folicular no momento do

tratamento influenciou a taxa de ovulação após a administração de GnRH: os animais que ovularam apresentavam maior diâmetro folicular do que aqueles que não ovularam ($9,5\text{mm} \pm 1,7\text{mm}$ vs $6,7\text{mm} \pm 2,4\text{mm}$; $P < 0,01$). Outros autores (PURSLEY *et al.*, 1995; MARTINEZ *et al.*, 1999) também verificaram maior diâmetro folicular em bovinos que ovularam à primeira aplicação de GnRH. Folículos dominantes ($> 9\text{mm}$) apresentam maior número de receptores para LH nas células da granulosa, conforme postulam XU *et al.* (1995) e BODENSTEINER *et al.* (1996), promovendo maiores taxas de ovulação.

Ainda no Experimento 1, a concentração de progesterona no momento da primeira aplicação de GnRH não interferiu na taxa de ovulação, o que indica que é possível atingir taxas semelhantes na ausência ou na presença de progesterona. Esses resultados estão em conformidade com aqueles de MARTINEZ *et al.* (1999), que observaram altas taxas de ovulação mesmo em animais que se encontravam na fase de diestro. Tais achados, juntamente com o aumento da taxa ovulatória em função do diâmetro do folículo dominante, sugerem que o *status* folicular no momento do tratamento tem considerável influência sobre a taxa de ovulação de animais tratados com GnRH, tanto na presença quanto na ausência de progesterona.

BODENSTEINER *et al.* (1996) e PURSLEY *et al.* (1995) demonstraram que a ovulação ocorre de 30 a 32 horas após a aplicação de GnRH em bovinos. Em bubalinos, BERBER *et al.* (2001) observaram ovulação $36,4 \pm 10,4$ horas após a primeira aplicação de GnRH. Os

resultados de tais autores, bem como aqueles ora encontrados ($33,0h \pm 8,3h$), sugerem que, na espécie bubalina, o intervalo entre a primeira aplicação de GnRH e a ovulação é semelhante ao que ocorre na espécie bovina.

Segundo RUSBRIDGE *et al.* (1992), após 6 dias da administração de GnRH 75% dos animais que ovulam apresentam formação de corpos lúteos acessórios. Resultados semelhantes foram verificados no Brasil por MARQUES *et al.* (2001), que reportam 100% de taxa de ovulação em novilhas bovinas tratadas com GnRH, LH e hCG no dia 7 do ciclo estral. Esses autores constataram, ainda, aumento nas concentrações plasmáticas de progesterona nos animais que ovularam, em decorrência da formação de um corpo lúteo acessório. As búfalas do experimento ora descrito que ovularam após a primeira aplicação de GnRH apresentaram maiores concentrações plasmáticas de progesterona no dia da aplicação da $PGF_{2\alpha}$ (dia 7) que aquelas que não ovularam ($2,56 \pm 1,02$ vs $1,26 \pm 0,82$ ng/ml). Esses achados concordam com os resultados de investigações realizadas com bovinos, que apontaram maiores concentrações de progesterona em animais com corpo lúteo acessório (RUSBRIDGE *et al.*, 1992; PURSLEY *et al.*, 1995; MARQUES *et al.*, 2001), e podem indicar que as búfalas que ovularam à primeira aplicação de GnRH tinham corpos lúteos acessórios.

No dia da aplicação da $PGF_{2\alpha}$, as búfalas do Grupo 1 e aquelas que não ovularam à primeira aplicação de GnRH apresentaram maior diâmetro folicular que as fêmeas do Grupo 2 e aquelas que ovularam à primeira aplicação de GnRH (Tabelas 1 e 2). MARTINEZ *et al.* (1999) verificaram que

a nova onda de crescimento folicular somente é induzida quando ocorre ovulação após a primeira aplicação de GnRH. Observaram, também, que animais que não ovularam à primeira aplicação de GnRH possuíam folículos menores (< 9mm), que não sofreram atresia e apresentaram crescimento folicular contínuo. Tais informações foram confirmadas por DRIANCOURT (2000), que constatou que folículos FSH-dependentes (< 0,8mm) - que ainda não adquiriram receptores para LH - não respondem ao tratamento com GnRH e, nesses casos, a onda de crescimento folicular não é sincronizada. Como no Grupo 1 foi observada menor taxa de ovulação, associada ao menor diâmetro folicular dos animais que não ovularam à primeira aplicação de GnRH, pode-se supor que os folículos que não ovularam após o tratamento estariam na fase inicial de desenvolvimento folicular. Tais folículos não foram sincronizados, continuaram a crescer e apresentaram maior diâmetro no dia do tratamento com PGF_{2α} (dia 7), que aqueles de animais cuja taxa de ovulação à primeira aplicação de GnRH era maior. De acordo com PURSLEY *et al.* (1995), a ovulação sincroniza o início da nova onda de crescimento folicular 1 a 2 dias depois do tratamento, em 100% dos animais.

Além disso, os resultados do Experimento 1 demonstraram que os animais que não ovularam à primeira aplicação de GnRH apresentaram intervalo mais curto e menos sincronizado entre a segunda aplicação de GnRH e a ovulação, que aqueles que ovularam. Observou-se, também, que esses animais apresentaram menor taxa de ovulação sincronizada (Tabela 2), o que também foi verificado por VASCONCELOS (1998), que trabalhou

com bovinos. Para DEJARNETTE *et al.* (2001), a eficiência do tratamento de sincronização da ovulação depende da resposta à primeira aplicação de GnRH, e consideram que essa resposta é um fator limitante do protocolo de sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo. No presente experimento foram verificadas antecipação da ovulação, baixa taxa de sincronização da ovulação e baixas concentrações de progesterona no dia 7 em animais que não ovularam à primeira aplicação de GnRH. Tais resultados indicam que quando há ausência de ovulação no início do tratamento, a sincronização da onda de crescimento folicular não ocorre, o que provoca variação do momento da ovulação nos animais submetidos ao protocolo.

Em bovinos, 100% das vacas e 75% das novilhas ovulam entre 24 e 32 horas após a segunda aplicação de GnRH (PURSLEY *et al.*, 1995). No presente experimento, as búfalas apresentaram 78,8% de ovulações sincronizadas, com intervalo entre a segunda aplicação de GnRH e a ovulação de $32,0 \pm 5,7$ horas. A maioria das búfalas apresentou ovulação sincronizada (intervalo de 12 horas), demonstrando a viabilidade de sincronizar a ovulação nessa espécie. Os dados encontrados neste experimento estão próximos aos achados por FRICKE *et al.* (1998), VASCONCELOS *et al.* (1999) e SANTOS *et al.* (2001), que observaram taxas de ovulação sincronizada próximas a 80% após o emprego do protocolo "Ovsynch".

O tratamento com GnRH/PGF_{2 α} /GnRH em bubalinos proporcionou alta taxa de ovulação sincronizada, diferentemente do que observaram

PORTO-FILHO *et al.* (1999), que utilizaram apenas prostaglandina. Essa constatação também foi relatada em bovinos (TWAGIRAMUNGU *et al.*, 1995; PURSLEY *et al.*, 1995; THATCHER *et al.*, 1999; BARUSELLI *et al.*, 2000), e indica que o tratamento associando GnRH e prostaglandina apresenta grande potencialidade para sincronizar a ovulação e realizar a inseminação artificial em tempo fixo com sucesso, sem a necessidade de detecção de cios.

Tendo em vista as considerações até aqui expostas, referentes ao Experimento 1, o Experimento 2 da presente tese teve como objetivo avaliar a eficiência, a campo, do tratamento com GnRH/PGF_{2α}/GnRH em bubalinos. Como a eficiência reprodutiva depende de curto período de serviço e alta taxa de concepção (PURSLEY *et al.*, 1995), o experimento procurou analisar a taxa de concepção proporcionada pela inseminação artificial em tempo fixo de acordo com o período pós-parto, considerando os fatores que podem interferir na sua eficiência.

Em decorrência da estacionalidade reprodutiva dos bubalinos, a sincronização da ovulação para a inseminação artificial em tempo fixo apresentou resultados satisfatórios somente durante a estação favorável (período favorável = 48,8% vs período desfavorável = 6,9%; P<0,01). Os resultados do Experimento 2 concordam com os achados de ZICARELLI (1999), que, em estudo realizado na Itália, constatou reduzidas taxas reprodutivas durante o período reprodutivo desfavorável. Segundo alguns autores, a estacionalidade reprodutiva dos bubalinos é caracterizada pela variação endocrinológica decorrente da secreção de melatonina durante o

ano (ZICARELLI, 1999).

Os resultados deste experimento demonstraram que, durante a estação reprodutiva favorável, o emprego da sincronização da ovulação em bubalinos é perfeitamente viável. Nesse período, a sincronização da ovulação proporcionou taxa de concepção média de 48,5% após uma única inseminação artificial em tempo fixo. Essa taxa de concepção é similar àquelas encontradas em estudos nos quais a inseminação artificial foi realizada doze horas após a detecção natural do cio (BARUSELLI *et al.*, 1994; MOIOLI *et al.*, 1998). Portanto, pode-se inferir que as ovulações tenham sido eficientemente sincronizadas, apresentando fertilidade adequada. É importante ressaltar que, como o tratamento com GnRH provoca inibição da manifestação de estro, com grande número de ovulações silenciosas (BARUSELLI *et al.*, 2000), o comportamento estral dos animais quando esse protocolo é empregado não deve ser considerado.

A taxa de concepção das búfalas inseminadas sofreu interferência de algumas variáveis. A condição corporal das fêmeas ao início do tratamento influenciou significativamente a eficiência do protocolo. Assim, para que taxas de concepção superiores sejam obtidas, os animais utilizados devem apresentar escore corporal $\geq 3,5$ (escala de 1 a 5). GEARY *et al.* (1998), estudando a sincronização da ovulação em 220 bovinos, demonstraram maiores taxas de concepção em animais com melhor condição corporal. Ainda em bovinos, CAVALLIERI e FITZPATRICK (1995) cometam que a condição corporal influencia diretamente a ciclicidade ovariana, e a resposta aos tratamentos que visam controlar o ciclo estral e a

ovulação. Em búfalas inseminadas artificialmente após a detecção natural do estro também foi constatada grande influência da condição corporal na eficiência reprodutiva (BARUSELLI *et al.*, 2001a). Assim, é possível supor que tanto bubalinos quanto bovinos com baixos escores corporais, quando sincronizados, apresentam comprometimento da taxa de concepção; já aqueles com escores intermediários ou elevados, quando sincronizados, apresentam satisfatórias taxas de concepção. Assim, é importante ressaltar que o estado corporal dos animais tratados tem influência significativa sobre a eficiência do protocolo e, portanto, deve ser avaliado antes do início dos tratamentos, para evitar o comprometimento da eficiência da sincronização da ovulação para a inseminação artificial em tempo fixo.

A diferença entre as taxas de concepção de fêmeas primíparas e múltíparas (35,5% vs. 51,0%) demonstrou que a ordem de partos é fator determinante na eficiência do protocolo. Segundo FERREIRA *et al.* (1997), fêmeas primíparas demandam parte de sua energia para a continuidade do crescimento corporal, e fêmeas múltíparas - devido à sua menor exigência nutricional - convergem essa energia para os processos reprodutivos, o que lhes garante maior ciclicidade ovariana e atividade reprodutiva (CAVALLIERI e FITZPATRICK, 1995). Além disso, WETTEMAN, (1994) relata que a falta de energia disponível para os processos reprodutivos promove a interrupção dos ciclos estrais em virtude da redução na secreção de gonadotrofinas e, com isso, há diminuição do crescimento folicular. Isso indica que fêmeas primíparas apresentam algum comprometimento em programas de sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo. Desta

forma, e dependendo do sistema de manejo da propriedade, para alcançar melhores taxas de prenhez à inseminação artificial é recomendável utilizar preferencialmente fêmeas pluríparas.

O período pós-parto no qual é implementado o protocolo de sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo é de fundamental importância para a obtenção de boas taxas de concepção. Processos envolvidos na involução uterina e no reinício da atividade ovariana dependem diretamente de fatores fisiológicos no momento do parto e durante o período pós-parto. No entanto, GEARY *et al.* (1998) observaram que a sincronização da ovulação pelo método "Ovsynch" apresenta melhores resultados quando realizada em períodos inferiores a 70 dias pós-parto. Confirmando essa informação, PURSLEY *et al.* (1997) encontraram maiores taxas de prenhez aos 60 dias após o parto nos animais tratados com o método "ovsynch" que nos animais do grupo controle (detecção de estro). Como neste experimento não foi observada diferença na taxa de concepção quando a sincronização foi realizada precocemente (40 a 60 dias pós-parto), é possível supor que esse tratamento torne possível a obtenção de intervalo entre partos ao redor de 12/13 meses, possibilitando que os ganhos genéticos advindos da inseminação artificial sejam acompanhados pela otimização do desempenho reprodutivo.

O sistema empregado possibilitou que a inseminação artificial fosse realizada em 100% das fêmeas do rebanho, sem os atrasos na concepção geralmente decorrentes de deficiências na detecção dos estros. Os resultados deste experimento indicam que, em propriedades cujo manejo de

inseminação artificial consista em apenas uma sincronização, metade das fêmeas se tornarão gestantes. Assim, é possível obter prenhez em metade do rebanho com a inseminação artificial, destinando a outra metade à cobertura natural, o que permite reduzir o número de touros. Considerando, ainda, que o retorno ao cio das búfalas que não emprenham com o tratamento ocorre de forma relativamente sincronizada, é possível efetuar um manejo intensivo de detecção de cios e inseminação artificial por um período de aproximadamente cinco dias, o que possibilita a reinseminação de um grande número de animais que não conceberam inicialmente (BERBER *et al.*, 2001).

Em resumo, os dados do Experimento 2 demonstram que a utilização da inseminação artificial em tempo fixo com sincronização da ovulação em bubalinos é viável. No entanto, para garantir melhores resultados, as búfalas inseminadas devem ter bom estado corporal, ser preferencialmente múltiparas e estar na estação reprodutiva favorável.

O Experimento 3 teve o objetivo de avaliar se há alteração na eficácia do protocolo de sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo em bubalinos quando se emprega a Lecirelina como agonista do GnRH. A Lecirelina é um hormônio hipotalâmico sintético de ação prolongada, um superanálogo do GnRH obtido pela modificação estrutural da Gonadorelina. No presente experimento não foram verificadas diferenças nas taxas de concepção quando da utilização do Acetato de Buserelina ou de Lecirelina no protocolo de sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo. A taxa de concepção obtida no grupo

tratado com Lecirelina (48,5%) está próxima também dos resultados de BERBER *et al.* (2001), que inseminaram, em tempo fixo, búfalas tratadas com Acetato de Buserelina. A magnitude da amostra aqui utilizada, e a repetição do resultado em dois rebanhos diferentes, permitem afirmar que a utilização da Lecirelina apresenta bons resultados na sincronização da ovulação em fêmeas bubalinas, como já fora verificado para o Acetato de Buserelina. Os resultados do Experimento 3 demonstram que tanto o Acetato de Buserelina quanto a Lecirelina podem ser utilizados para a sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo em fêmeas bubalinas.

Estudos de viabilidade econômica em rebanhos que utilizam protocolos de sincronização da ovulação (“Ovsynch”) demonstraram que grande parte dos custos com os hormônios se deve à aquisição do GnRH, e que reduzidas doses de GnRH têm o mesmo efeito na indução da ovulação do folículo dominante (NEBEL e JOBST, 1998; SANTOS *et al.*, 2001). Dessa forma, o Experimento 4 procurou avaliar a eficiência de reduzidas doses de Acetato de Buserelina e de Lecirelina na sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo em bubalinos. Os resultados indicaram que é possível reduzir as doses de Acetato de Buserelina e de Lecirelina sem comprometer a eficiência dos tratamentos para inseminação artificial em tempo fixo em bubalinos. FRICKE *et al.* (1998) ressaltam que muitos criadores não utilizam o protocolo de inseminação artificial em tempo fixo (“Ovsynch”) devido ao custo do tratamento. Dessa forma, os autores realizaram estudo que objetivava diminuir os custos do protocolo utilizando

reduzidas doses de GnRH em bovinos (50 μ g vs 100 μ g de Cistorelina), e verificaram que a diminuição da dose de GnRH não compromete a eficiência do protocolo, e reduz os gastos com a sincronização e os custos por vaca prenhe por inseminação artificial. SANTOS *et al.* (2001) também constataram que a diminuição das doses de GnRH (Gonadorelina: 0,10mg vs 0,25mg) reduz os custos e não compromete a eficácia do protocolo. Assim, analisando os resultados do Experimento 4 e os achados da literatura, é possível recomendar a diminuição das doses de GnRH em fêmeas bubalinas sincronizadas com o protocolo GnRH/PGF_{2 α} /GnRH para inseminação artificial em tempo fixo. A redução da dose de GnRH promoveu economia de R\$13,68 por prenhez em búfalas tratados com reduzidas doses de Acetado de Buserelina, e de R\$6,44 por prenhez em animais tratados com reduzidas doses de Lecirelina. Tais valores são consideráveis, e colaboram para viabilizar o emprego dessa biotecnologia pelo setor produtivo.

A possibilidade de reduzir a dose de prostaglandina sem comprometer a eficiência da luteólise também colabora para reduzir os custos do protocolo de sincronização da ovulação. O gasto com a administração de prostaglandina representa significativa parcela do protocolo. No entanto, algumas precauções devem ser tomadas quando da redução da dose de prostaglandina, uma vez que a eficácia da luteólise é muito importante para o sucesso do protocolo – se não ocorrer a regressão do corpo lúteo, mesmo ocorrendo a ovulação após a segunda aplicação de GnRH, não haverá concepção (SANTOS *et al.*, 2001). No presente estudo,

foram verificadas taxas de regressão do corpo lúteo de 88,6% em búfalas tratadas com meia dose, e de 90,0% naquelas tratadas com as doses recomendadas de prostaglandina, o que não representa significância estatística os grupos (Experimento 5). As taxas de regressão de corpos lúteos anteriormente citadas concordam com os achados de SANTOS *et al.* (2001), que trabalharam com bovinos sincronizados pelo método "Ovsynch". As taxas de concepção das búfalas inseminadas em tempo fixo a campo também não diferiram entre os grupos, à semelhança dos resultados de BARROS (2000), que avaliou o uso de metade da dose de prostaglandina em fêmeas bovinas sincronizadas com o protocolo GnRH/PGF_{2α}/BE e verificou taxa de prenhez similar àquela obtida com a dose integral. Também em bubalinos foi constatado que reduzidas doses de prostaglandina são eficientes para provocar a luteólise e para induzir o estro e a ovulação (CHOHAN, 1998). Essas informações permitem recomendar meia dose de prostaglandina (D-Cloprostenol sódico) para provocar a regressão do corpo lúteo eficientemente, sem comprometer a taxa de concepção do protocolo de sincronização a campo. Com a utilização de meia dose de prostaglandina é possível reduzir os custos do tratamento em R\$8,81 por búfala prenhe ao final do período de inseminação artificial, o que contribui significativamente para a otimização econômica da propriedade.

O tratamento com GnRH 7 dias antes da início do protocolo tradicional de sincronização da ovulação para a inseminação artificial em tempo fixo aumentou significativamente a taxa de concepção das fêmeas bubalinas (Experimento 6). Como a aplicação de GnRH em dias

desconhecidos do período pós parto sincroniza a onda de crescimento folicular (PURSLEY *et al.*, 1995), pode-se supor que ocorreu aumento do número de folículos dominantes responsivos ao primeiro GnRH no início do tratamento, aumentando a taxa de ovulação. Como mencionado no Experimento 1 deste trabalho, e também por alguns pesquisadores (VASCONCELOS *et al.*, 1999; SANTOS *et al.*, 2001), quando ocorre ovulação à primeira aplicação do GnRH do protocolo, a taxa de ovulação sincronizada aumenta, melhorando significativamente a eficiência do tratamento. THATCHER *et al.* (2001) também discutem a possibilidade de aumentar a taxa de ovulação ao primeiro GnRH no início do tratamento, com a aplicação de duas doses de prostaglandina à intervalo de 14 dias e iniciando o protocolo "Ovsynch" 12 dias após a segunda aplicação de prostaglandina. Caso as vacas estejam ciclando, estima-se que 90% dos animais tratados estarão entre os dias 5 e 10 do ciclo estral, fase ideal para responderem com eficiência ao tratamento com GnRH. Os autores verificaram aumento na eficiência do protocolo "Ovsynch" com a utilização de duas doses de prostaglandina antes do início do tratamento (48% vs 36%). Em síntese, este experimento mostrou que a aplicação de GnRH 7 dias antes do início do protocolo para a sincronização da ovulação melhora a eficiência do tratamento. A par disto, mesmo com o aumento do custo que esse tratamento implica, ocorre diminuição no custo por prenhez em decorrência do aumento da taxa de concepção, o que possibilita uma melhor relação custo/benefício do processo.

A literatura consultada, e as condições em que foi realizado o presente estudo, permitem-nos concluir que:

- Os Fêmeas Bubalinas respondem ao tratamento com GnRH/PGF_{2α}/GnRH com ovulações sincronizadas, que permitem a inseminação artificial em tempo fixo.
- A utilização da inseminação artificial em tempo fixo com sincronização da ovulação em bubalinos é viável.
- O emprego da Lecirelina como sincronizador de ovulação para a inseminação artificial em tempo fixo apresenta resultados semelhantes àqueles obtidos com o Acetato de Buserelina.
- Reduzidas doses de Acetato de Buserelina e de Lecirelina no protocolo de inseminação artificial em tempo fixo são eficazes e diminuem o custo do tratamento.
- A utilização de meia dose de PGF_{2α} para a inseminação artificial em tempo fixo em bubalinos apresenta resultados semelhantes àqueles obtidos com a dose recomendada pelo fabricante.
- Maiores taxas de concepção foram obtidas em animais tratados com GnRH 7 dias antes do início do protocolo de sincronização para a inseminação artificial em tempo fixo.

CONCLUSÕES



A literatura consultada, e as condições em que foi realizado o presente estudo, permitem-nos concluir que:

- As fêmeas bubalinas respondem ao tratamento com GnRH/PGF_{2α}/GnRH com ovulações sincronizadas, que permitem a inseminação artificial em tempo fixo.
- A utilização da inseminação artificial em tempo fixo com sincronização da ovulação em bubalinos é viável.
- O emprego da Lecirelina como sincronizador da ovulação para a inseminação artificial em tempo fixo apresenta resultados semelhantes àqueles obtidos com o Acetato de Buserelina.
- Reduzidas doses de Acetato de Buserelina e de Lecirelina no protocolo de inseminação artificial em tempo fixo são eficazes e diminuem os custos do tratamento.
- A utilização de meia dose de PGF_{2α} para a inseminação artificial em tempo fixo em bubalinos apresenta resultados semelhantes àqueles obtidos com a dose recomendada pelo fabricante.
- Maiores taxas de concepção foram obtidas em animais tratados com GnRH 7 dias antes do início do protocolo de sincronização para a inseminação artificial em tempo fixo.

- ADAMS, G.P.; MATTERI, R.L.; GINTHER, O.J. Effect of progesterone on regression of follicles, emergence of follicular waves and circulating follicle-stimulating hormone in heifers. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 55, p.627-40, 1992a.
- ADAMS, G.P.; MATTERI, R.L.; KASTELIC, J.P.; KO, J.C.H.; GINTHER, O.J. Association between surges of follicle stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 54, p.177-88, 1992b.
- BAO, B.; GARVERICK, H.A. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. *Journal Animal Science*, v. 78, p.1903-1921, 1993.
- BAO, B.; GARVERICK, H.A.; SMITH, G.W.; SMITH, M.F.; SALFEN, B.E.; YOUNGQUIST, R.S. Changes in messenger RNA encoding LH receptor, cytochrome P450 side chain cleavage, and aromatase or associated 1 with recruitment and selection of bovine ovarian follicles. *Biology of Reproduction*, v. 56, p.1155-1166, 1997.
- BAO, B.; GARVERICK, H.A.; SMITH, G.W.; SMITH, M.F.; SALFEN, B.E.; YOUNGQUIST, R.S. Expression of messenger RNA encoding 3 β -HSD during recruitment and selection of bovine ovarian follicles: identification of dominant follicle by expression of 3 β -HSD mRNA within the granulosa cell layer. *Biology of Reproduction*, v. 58, p.1466-1473, 1997.
- BARNABE, V.H.; BARUSSELLI, F.S.; BARNABE, R.C. Implantação de progesterona de inserção artificial. In: XI CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, v. 1, p. 140-150, 1995.
- BARNABE, V.H.; BARUSSELLI, F.S.; BARNABE, R.C. Implantação de progesterona de inserção artificial. In: I SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PESQUISA EM MEDICINA VETERINÁRIA, v. 1, p. 92-100, 1995.

- ADAMS, G.P.; MATTERI, R.L.; GINTHER, O.J. Effect of progesterone on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating follicle-stimulating hormone in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.95, p.627-40, 1992a.
- ADAMS, G.P.; MATTERI, R.L.; KASTELIC, J.P.; KO, J.C.H.; GINTHER, O.J. Association between surges of follicle stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.94, p.177-88, 1992b.
- BAO, B.; GARVERICK, H.A. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. **Journal Animal Science**, v. 76, p.1903-1921, 1998.
- BAO, B.; GARVERICK, H.A.; SMITH, G.W.; SMITH, M.F.; SALFEN, B.E.; YOUNGQUIST, R.S. Changes in messenger RNA encoding LH receptor, cytochrome P450 side chain cleavage, and aromatase or associated with recruitment and selection of bovine ovarian follicles. **Biology of Reproduction**, v. 56, p. 1158-1168, 1997^a.
- BAO, B.; GARVERICK, H.A.; SMITH, G.W.; SMITH, M.F.; SALFEN, B.E.; YOUNGQUIST, R.S. Expression of messenger RNA encoding 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ 5- Δ 4 isomerase during recruitment and selection of bovine ovarian follicle: identification of dominant follicle by expression of 3 β -HSD mRNA within the granulosa cell layer. **Biology of Reproduction**, v. 56, p. 1466-1473, 1997^b.
- BARNABE, V.H.; BARUSELLI, P.S.; BARNABE, R.C. Implantação de programas de inseminação artificial. In: XI CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, v.1, p.142-155, 1995a.
- BARNABE, V.H.; BARUSELLI, P.S.; BARNABE, R.C.; VISINTIN, J.A.; MOLERO-FILHO, J.R.; PORTO-FILHO, R.M. Inseminação artificial em bubalinos utilizando dois diferentes diluidores. In: I SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PESQUISA EM MEDICINA VETERINÁRIA. v. 1, p. 92, 1995b.

- 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**. p. 158-189, 2000.
- BARROS, C.M.; FIGUEIREDO, R.A.; PAPA, F.O.; ROCHA, G. Follicular growth in Nelore cows (*Bos indicus*) after PGF2 administration. **Journal of Animal Science**, v.71, p.216, 1993. Supplement 1.
- BARUSELLI, P.S. Basic requirements for artificial insemination and embryo transfer in buffaloes. **Buffalo Journal**, Suppl. 2, p. 53-60, 1994a.
- BARUSELLI, P.S. Folliculogenesis in buffalo. **Bubalus Bubalis**, v.4, p. 79-92, 1997. (Supplement 4)
- BARUSELLI, P.S. Inseminação artificial em tempo fixo com sincronização da ovulação em bubalinos. In: BARNABE, W.H.; TONHATI, H.; BARUSELLI, P.S. (eds). **Bubalinos: sanidade, reprodução e produção**. Jaboticabal: FUNEP, 1999. p.126-142.
- BARUSELLI, P.S. Novos avanços na reprodução bubalina. In: BARUSELLI, P.S. (ed). **A bubalinocultura brasileira: situação atual e perspectivas**. ABCB: São Paulo, 1998, p. 77-138.
- BARUSELLI, P.S. Reproduccion en bufalos lecheros. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUCCIÓN ANIMAL, 4., Cordoba, 2001. **Proceedings**, v.1, p.149-179, 2001.
- BARUSELLI, P.S. Sexual behaviour in buffaloes. In: IV WORD BUFFALO CONGRESS. São Paulo, Brasil, v. 1, p. 158-73, 1994b.
- BARUSELLI, P.S.; BARNABE, V.H.; BARNABE, R.C.; VISINTIN, J.A.; MOLERO-Filho, J.R.; PORTO, R. Effect of body condition score at calving on postpartum reproductive performance in buffalo. **Buffalo Journal**, v.1, p.53-65, 2001a.
- BARUSELLI, P.S.; BARNABE, V.H.; BARNABE, R.C.; VISINTIN, J.A.; MOLERO-FILHO, J.R; PORTO-FILHO, R. Condição corporal ao parto e eficiência reprodutiva de fêmeas bubalinas inseminadas artificialmente. In: IX CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. v.1, p.380, 1995.

- BARUSELLI, P.S.; MARQUES, M.O.; CARVALHO, N.A.T.; MADUREIRA, E.H.; CAMPOS FILHO, E.P. Efeito de diferentes protocolos de inseminação artificial em tempo fixo na estação de monta de vacas de corte lactantes. *In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUCCIÓN ANIMAL*, 4., Cordoba, 2001. **Proceedings**, v.1, p.236, 2001b.
- BARUSELLI, P.S.; MARQUES, M.O.; CARVALHO, N.A.T.; VALENTIM, R.; BERBER, R.C.A.; CARVALHO FILHO, A.F.; MADUREIRA, E.H.; COSTA NETO, W.P. Dinâmica folicular em novilhas receptoras de embrião bovino submetidas à sincronização da ovulação para inovulação em tempo fixo. *In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES*, 15., Rio Quente, 2000. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, v.28., p.217, 2000.
- BARUSELLI, P.S.; MUCCIOLO, R.G.; VISINTIN, J.A.; VIANA, W.G.; ARRUDA, R.P.; MADUREIRA, E.H.; OLIVEIRA, C.A.; MOLERO-FILHO, J.R. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in buffalo (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, v. 47 (8), p. 1531-1547, 1997.
- BARUSELLI, P.S.; OLIVEIRA, J.F.S.; MENDES, M.L.M.; JORGE, A.M.; FUJII, T.; PALAZZO, J.P.C. Diagnóstico da bubalinocultura do Vale do Ribeira. Campinas. **Documento Técnico CATI**, v.94, 16p., 1993.
- BARUSELLI, P.S.; VIANA, W.G.; MUCCIOLO, R.G.; OLIVEIRA, C.A.; MADUREIRA, E.H. Ovarian activity and sexual behaviour during postpartum period in buffaloes. . *In: WORLD BUFFALO CONGRESS*, 4., São Paulo, 1994a. **Anais**. v.3, p.440-2.
- BERBER, R.C.A. MADUREIRA, E.H.; BARUSELLI, P.S. Comparison of two ovsynch protocols (GnRH vs. LH) for fixed timed insemination in buffalo (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**. (no prelo)
- 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 de Reprodução Animal**, v.25, p.379-381, 2001.

- BERGFELT, D.R.; KASTELIC, J.P.; GINTHER, O.J. Continued periodic emergence of follicular waves in non-bred progesterone-treated heifers. **Animal Reproduction Science**, v.24, p.193-204, 1991.
- BODENSTEINER, K.J.; KOT, K.; WILTBANK, M.C.; GINTHER, O.J. Synchronization of emergence of follicular wave in cattle. **Theriogenology**, v. 45: p. 1115:1128, 1996.
- BONI, R.; ROELOFSEN, V.M.; PIETERSE, M.; KOGUT, J.; KRUIPTH, A.M. Follicular dynamics repeatability and predictability of follicular recruitment in cows undergoing repeated follicular puncture. **Theriogenology**, v.48, p.277-89, 1997.
- BRUKE, C.R.; MIHM, M.; MACMILLAN, K.L.; ROCHE, J.F. Some effects of premature concentrations of progesterone on luteal and follicular characteristics during the oestrus cycle in heifers. **Animal Reproduction Science**, v.35, p.27-39, 1994.
- CAVALIERI, J.; FITZPATRICK L.A. Artificial insemination of *Bos indicus* heifers: The effects of body weight, condition score, ovarian cyclic status and insemination regimen on pregnancy rate. **Australian Veterinary Journal**. v. 72, p. 441-447, 1995.
- CHOHAN, K.R. Estrus synchronization with lower dose of PGF_{2α} and subsequent fertility in subestrus buffalo. **Theriogenology**, v.50, p.1101-1108, 1998.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. Belo Horizonte, 1998. 45p. 2ª Edição.
- CROWE, M.A.; PABMANABHAN, V.; MIHM, M.; BEITINS, I.Z.; ROCHE, J.F. Resumption of follicular waves in beef cows is not associated with periparturient changes in follicle-stimulating hormone heterogeneity despite major changes in steroid and luteinizing hormone concentration. **Biology of Reproduction**, v. 58, p. 1445-1450, 1998.
- DANELL, B. **Oestrous behaviour, ovarian morphology and cyclical variation in follicular system and endocrine pattern in water buffalo**

- heifers. Uppsala, 1987, 124p. Tese (Doutorado) - Faculty of Veterinary Medicine, Swedish University of Agricultural Sciences.
- DEJARNETTE, J.N.; SALVERSON, R.L.; MARSHALL, C.E. Incidence of premature estrus in lactating dairy cows and conception rates to studing estrus or fixed-time inseminations after synchronization using GnRH and PGF2 α . **Animal Reproduction Science**, v. 67, p. 27-35, 2001.
- DRIANCOURT, M.A. Follicular dynamics in sheep and cattle. **Theriogenology**, v.35, p.55-79, 1991.
- DRIANCOURT, M.A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. **Theriogenology**, v. 55, p. 1211-1239, 2000.
- EVANS, A.C.O.; ADAMS, G.P.; RAWLINGS, N.C. Endocrine and ovarian follicular changes leading up to the first ovulation in prepubertal heifers. **Journal Reproduction Fertility**, v. 100, p. 187-194, 1994.
- FAO (Food and Agriculture Organization), FAOSTAT – Agriculture data. [Http://apps.fao.org/cgi-gin/nph-db.pl?subset=agriculture/](http://apps.fao.org/cgi-gin/nph-db.pl?subset=agriculture/). 1999.
- FERREIRA, M.B.D.; LOPES, B.C.; ANDRADE, I.C.; CONCEIÇÃO, V.J. Escore corporal e anestro pós-parto em primíparas zebu. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v. 21, n. 2, p. 114-116, 1997.
- FORTUNE, J.E. Follicular dynamics during the bovine estrus cycle: A limiting factor in improvement of fertility? **Animal Reproduction Science**, v.33, p.111-25, 1993.
- FORTUNE, J.E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biology of Reproduction**, v.50, p.225-32, 1994.
- FORTUNE, J.E.; SIROIS, J.; TURZILLO, A.M.; LAVOIR, M. Follicle selection in domestic ruminants. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.43, p.187-98, 1991. Supplement.
- FRICKE, P.M.; GUENTHER, J.N.; WILTBANK, M.C. Efficacy of decreasing the dose of GnRH used in a protocol for synchronization of ovulation and time AI in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v.50, p.1275-1284, 1998.

- GEARY, T.W.; WHITTIER, J.C.; DOWNING, E.R.; LEFEVER, D.G.; SILCOX, R.W.; HOLLAND, M.D.; NETT, T.M.; NISWENDER, G.D. Pregnancy rates of postpartum beef cows that were synchronized using Syncro-Mate-B® or the ovsynch protocol. **Journal Animal Science**. v. 76, p. 1523 -1527, 1998.
- GEARY; T.W. DOWNING, E.R.; BRUEMMER, J.E.; WHITTIER, J.C. Ovarian and estrous response of suckled beef cows to the select synch estrous synchronization protocol. **Prof. Anim. Sci**, v. 16, p. 1-5, 2000.
- GINTHER, O.J.; KASTELIC, J.P.; KNOPF, L. Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrus cycle. **Animal Reproduction Science**, v.20, p.187-200, 1989a.
- GINTHER, O.J.; KNOPF, L.; KASTELIC, J.P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrus cycle with two and three follicular waves. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.87, p.223-30, 1989b.
- GINTHER, O.J.; WILTBANK, M.C.; FRICKE, P.M.; GIBBONS, J.R.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, v.55, p. 1187-1194, 1996.
- IRELAND, J.L.; GOOD, T.E.; KNIGHT, P.G.; IRELAND, J.J. Alterations in amounts of different forms of inhibin during follicular atresia. **Biology of Reproduction**, v.50, p.1265-1276, 1994.
- KASTEKIC, J.P.; MAPLETOFT, R.J. Recent developments in estrus synchronization in cattle. (no prelo)
- KASTELIC, J.P.; KNOPF, L.; GINTHER, O.J. Effect of day of postaglandin F2a treatment on selection and development of the ovulatory follicle in heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 23, p. 169-180, 1990a.
- KASTELIC, J.P.; KO, J.C.H.; GINTHER, O.J. Supression of dominant and subordinate ovarian follicles by a proteinaceous fraction of follicular fluid in heifers. **Theriogenology**, v.34, p.499-509, 1990b.
- KNOPF, K.; KASTELIC, J.P.; SCHALLENBERGER, E.; GINTHER, O.J. Ovarian follicular dynamics in heifers: test of two-wave hypothesis by

- ultrasonically monitoring individual follicles. **Domestic Animal Endocrinology**, v.6, p.111-9, 1989.
- LARISON, L.L.; BALL, P.J.H. Regulation of estrus cycle in dairy cattle: a review. **Theriogenology**, v.38, p. 255-267, 1992.
- LE VAN TY; CHUPIN, D.; DRIANCOURT, D.A. Ovarian follicular population in buffaloes and cows. **Animal Reproduction Science**, v.19, p.171-8, 1989.
- LUCY, M.C.; SAVIO, J.D.; BADINGA, R.L.; DE LA SOTA, R.L.; THATCHER, W.W. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. **Journal Animal Science**, v.70, p.3615-26, 1992.
- LUSSIER, J.G.; MATTON, P.; DUFOUR, J.J. Growth rates of follicles in the ovarian of the cow. **Journal Reproduction Fertility**, v. 81, p. 301-307, 1987.
- LUSSIER, J.G.; MATTON, P.; GUIBAULT, L.A.; GRASSO, F.; MAPLETOFT, R.J.; CARRUTHERS, T.D. Ovarian follicular development and endocrine responses in follicular-fluid-treated and hemiovariectomized heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**., v.102, p.95-105, 1994.
- MAPLETOFT, R.J.; BO, G.A.; PIERSON, R.A. Recruitment of follicles for superovulation. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v.16, p.127-41, 1994.
- MARQUES, M.O.; MADUREIRA, E.H.; OLIVEIRA, C.A.; BO, G.A.; BARUSELLI, P.S. Avaliação ultra-sonográfica e concentração plasmática de progesterona em novilhas *Bos taurus* x *Bos indicus* submetidas a diferentes tratamentos no dia 7 do ciclo estral. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUCCIÓN ANIMAL, 4., Cordoba, 2001. **Proceedings**, v.1, p.265, 2001.
- MARTINEZ, M.F.; ADAMS, G.P.; BERGFELT, D.R.; KASTELIC, J.P.; MAPLETOFT, R.J. Effect of LH or GnRH on the dominant follicle of the first follicular wave in beef heifers. **Animal Reproduction Science**. v. 57, p. 23-33, 1999.

- NASSER, L.F.; ADAMS, G.A.; BO, G.A.; MAPLETOFT, R.J. Ovarian superovulatory response relative to follicular wave emergence in heifers. **Theriogenology**, v.40, p.713-24, 1993.
- NEBEL, R.L.; JOBST, S.M. Evaluation of a systematic breeding programs for lactating dairy cows: a review. **Journal Dairy Science**, v. 81, p. 1169-1174, 1998.
- NOGUEIRA, J.R.; BARBOSA, C.; MATTOS, J.C.A.; CAMPOS, B.E.S.; CAMARGO, D.F.V. Peso ao nascer e desenvolvimento ponderal de bubalinos da raça Mediterrâneo e Jafarabadi. **Boletim de Indústria Animal**, v. 46, p.193-8, 1989a.
- NOGUEIRA, J.R.; BARBOSA, C.; MATTOS, J.C.A.; CAMPOS, B.E.S.; CAPELLOZA, C.N.Z. Aspectos da eficiência reprodutiva de bualinos das raças Mediterâneo e Jafarabadi. **Boletim de Indústria Animal**, v.46, p.45-54, 1989b.
- ODDE, K.G. A review of sinchronization of estrus in postpartum cattle. **Journal Animal Science**, v. 68, p.817-830, 1990.
- OSWALD, M.; MARTINEZ, M.F.; COLAZO, M.G.; FREY, T.N.; MAPLETOFT, R.J. Effect of dose of porcine LH and cloprostenol in a estrus synchronization program in beef heifers. **Theriogenology**, v. 53, p. 205, 2000.
- PALTA, P.; MADAN, M.L. Alteration in hypophysial responsiveness to synthetic GnRH at different postpartum intervals in Murrah Buffalo (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, v.44, p.403-411, 1995.
- PERRY, R.C.; CORAH, L.R.; KIRACOFE, G.H.; STEVENSON, J.S.; BEAL, W.E. Endocrine changes and ultrasonography of ovaries in suckled beef cows during resumption of postpartum estrous cycles. **Journal Animal Science**, v.69, p.2548-55, 1991.
- PIERSON, R.A.; GINTHER, O.J. Reliability of diagnostic ultrasonography for identification and measurement of follicles and detecting the corpus luteum in heifers. **Theriogenology**, v.28, p.929-36, 1987c.

- PORTO-FILHO, R.M.; BARUSELLI, P.S.; MADUREIRA, E.H.; MUCCIOLO, R.G. Detecção de cio em búfalas através do sistema de radiotelemetria. **Rev. Bras. Reprod. Anim.** v. 23, p. 356-358, 1999.
- PURSLEY, J.R.; KOSOROK, M.R.; WILTBANK, M.C. Reproductive management of lactating dairy cows using synchronization of ovulation. **Journal Dairy Science**, v.80, p.301-06, 1997a.
- PURSLEY, J.R.; MEE, M.O.; WILTBANK, M.C. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2 and GnRH. **Theriogenology**, v.44, p. 915-23, 1995.
- PURSLEY, J.R.; WILTBANK, M.C.; STEVENSON, J.S.; OTTOBRE, J.S.; GARVERICK, H.A. Pregnancy rates per artificial insemination for cows and heifers inseminated at synchronization of ovulation. **Journal Dairy Science**, v.80, p. 295-300, 1997b.
- RHODES, F.M.; DE'ATH, G.; ENTWISTLE, K.W. Animal and temporal effects on ovarian follicular dynamics in Brahman heifers. **Animal Reproduction Science**, v.38, p.265-77, 1995.
- ROCHE, J.F.; BOLAND, M.P. Turnover of dominant follicle in cattle of different reproductive stage. **Theriogenology**, v.35, p.81-90, 1991.
- ROCHE, J.F.; IRELAND, J.J. The differential effect of progesterone on concentrations of luteinising hormone and follicular stimulating hormone in heifers. **Endocrinology**, v. 108, p. 568-572, 1981.
- ROCHE, J.F.; MIHM, M.; DISKIN, M.G.; IRELAND, J.J. A review of regulation of follicle growth in cattle. **Journal Animal Science**, v. 76, p. 16-29, 1998 (suppl. 3).
- ROMERO, A.; ALBERT, J.; BRINK, Z.; SEIDEL Jr, G.E. Numbers of small follicles in ovaries affect superovulation response in cattle. **Theriogenology**, v.35, p.265, 1991.
- RUSBRIDGE, S.M.; BRAMLEY, T.A.; WEBB, R. A comparison of GnRH-induced corpora lutea and spontaneously formed CL in heifers. **Journal Reproduction Fertility**. Abstract series v. 9, p. 33, 1992.

- SANTOS, R.M.; VASCONCELOS, J.L.M.; SILVA, E.P.B.C.; MENEGYETTI, M.; FERREIRA, N.; OLIVEIRA, C.A. Avaliação da eficácia de D-Cloprostenol ou Cloprostenol sódico e de diferentes doses de Gonadorelina (0,10mg vs 0,25mg) no protocolo "Ovsynch" em vacas holandesas. **Rev. Bras. Repr. Anim.**, v.25, p. 298-300, 2001.
- SAVIO, J.D.; BOLAND, M.P.; ROCHE, J.F. Development of dominant follicles and ovarian activity in the post-partum period of dairy cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.88, p.581-91, 1990.
- SAVIO, J.D.; KEENAN, L.; BOLAND, M.P.; ROCHE, J.F. Patter of growth of dominant follicles during oestrus cycle in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.83, p.663-71, 1988.
- SCHMITT, E.J.P.; DIAZ, T.; DROST, M. THATCHER, W.W. Use of a gonadotropin release hormone agonist or human chorionic gonadotropin for timed insemination in cattle. **Journal Animal Science**, v. 74, p. 1084-1091, 1996.
- 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, p.916-25, 1990.
- SIROIS, J.; FORTUNE, J.E. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. **Biology of Reproduction**, v.39, p.308-17, 1988.
- STAGG, K.L.; SPICER, J.; SREENANA, J.M.; ROCHE, J.F. DISKIN, M.G. Effect of calf isolation on follicular wave dynamics, gonadotropin and metabolic hormone changes, and interval to first ovulation in beef cows fed either of two energy levels postpartum. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 777-783, 1998.
- STEVENSON, J.S.; KOBAYASHI, Y; THOMPSON, K.E. Reproductive performance of dairy cows in various programmed breeding systems including ovsynch and combinations gonadotropin-releasing hormone and prostaglandin F2 α . **Journal Dairy Science**, v. 82, p. 506-515, 1999.

- SUNDERLAND, S.J.; CROWE, M.A.; BOLAND, M.P.; ROCHE, J.F.; IRELAND, J.J. Selection, dominance and atresia of follicles during the oestrous cycle of heifers. **Journal Reproduction Fertility**, v. 101, p. 547-555, 1994.
- TANEJA, M.; SINGH, G.; TOTEY, S.M.; ALI, A. Follicular dynamics in water buffalo superovulated in presence or absence of a dominant follicle. **Theriogenology**, v.44, p.581-97, 1995.
- THATCHER, W.W.; MATTOS, R.; MOREIRA, F.; BINELLI, M.; AMBROSE, J.D. Experimental manipulation of follicular growth. **Reproduction in Domestic Animals**, Suppl. 6, p.27-33, 1999.
- THATCHER, W.W.; MOREIRA, F.; SANTOS, J.E.P.; MATTOS, LOPES, F.L.; PANCARCI, S.M.; RISCO, C.A. Effects of hormonal treatments on reproductive performance and embryo production. **Theriogenology**, v. 55, p. 75-89, 2001.
- TWAGIRAMUNGU, H.; GUILBAULT, L.A.; DEUFOUR, J.J. Synchronization of ovarian follicular waves with a gonadotropin-releasing hormone agonist to increase the precision of estrus in cattle: a review. **Journal Animal Science** v. 73, p. 3141-3151, 1995.
- USMANI, R.H.; AHMAD, D.M.; INSKEEP, E.K.; DAILEY, R.A.; LEWIS, P.E.; LEWIS, G.S. Uterine involution and postpartum ovarian activity in Nili-Ravi buffaloes. **Theriogenology**, v.24, p.435-48, 1985.
- VALE, W.G. Breeding and management of buffaloes and its economical importance for Latin America. SIMPOSIUM INTERNACIONAL DE BÚFALOS DE VENEZUELA, 1., Maracaibo, 2000. **Proceedings**, v.1, p.128-155, 2000.
- VALE, W.G. **Bubalinos: fisiologia e patologia da reprodução**. Campinas, Fundação Cargil, 1988. 86p.
- VALE, W.G. Reproductive management of water buffalo under amazon conditions. **Buffalo Journal**, v.7, p.137-45, 1994. Supplement.
- VASCONCELOS, J.L.M. Avaliação do protocolo de sincronização de ovação "ovsynch" e de fatores relacionados à associação entre

- produção de leite e taxa de concepção. Jaboticabal, 1998, 128p. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista.
- VASCONCELOS, J.L.M.; SILCOX, R.W.; ROSA, G.J.M.; PURSLEY, J.R.; WILTBANK, M.C. Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrous cycle in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 52, p. 1067-1078, 1999.
- VELLOSO, L.; SCHALCH, E.; ZANETTI, M.A.; FELÍCIO, P.E.; HIGASHI, H. Comparative performance of buffalo, zebu (nelore) and holstein steers, fed crude soybean meal, dry cassava meal and ground sugar-cane in a feed lot trial. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 4., São Paulo, 1994. **Anais**. v.2, p.266-268, 1994.
- VILLARES, J.B. Social aspects of buffaloes breeding for social economics conditions progress of the mankind. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 4., São Paulo, 1994. **Anais**. v.1, p.190-5.
- VILLARES, J.B.; RAMOS, A.A.; ROCHA, G.P. Eficiência reprodutiva de búfalos Jafarabadi nos Vales do Tietê e Ribeira, em São Paulo, Brasil. **Bubalinos**, Campinas, v.1, p.253-76, 1979.
- WANDJI, S.A.; SRSEN, V.; VOSS, A.K.; EPPIG, J.J.; FORTUNE, E.G. Initiation in vitro of growth of bovine primordial follicle. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 942-948, 1996.
- WETTEMAN, R.P. Management of nutritional factors affecting the prepartum and postpartum cow. In: FIELDS, J.M.; SAND, R.S. **Factors Affecting Calf Crop**. Boca Raton: CRS Press, Inc. 1994, p. 155-165.
- WILTBANK, M.C. How information on hormonal regulation of the ovary has improved understanding of timed breeding programs. **Proceedings, ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY FOR THERIOGENOLOGY**. p. 83-97, 1997.
- XU, Z.; GARVERICK, H.A.; SMITH, G.W. SMITH, M.F.; HAMILTON, S.A.; YOUNGQUIST, R.S. Expression of follicle-stimulating hormone and

luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid in bovine follicles during the first follicle wave. **Biology Reproduction**. v. 53, p. 951-957, 1995.

ZICARELLI, L. Management in different environmental condition. **Buffalo Journal**, p.17-38, 1994. Supplement 2.

ZICARELLI, L. Out-of-breeding-season mating technique in buffalo (OBSM). In: **BUBALINOS: SANIDADE, REPRODUÇÃO E PRODUÇÃO.**, 1999, p. 179-202.