

Biotecnologias da reprodução em bubalinos (*Bubalus bubalis*) *Biotechnology of reproduction in buffalo (*Bubalus bubalis*)*

Pietro Sampaio Baruselli¹ e Nécio Antonio Tonizza de Carvalho^{1,2}

¹Departamento de Reprodução Animal, FMVZ-USP, Rua Prof. Orlando Marques de Paiva, 87, CEP 05508-000, São Paulo-SP, Brasil.

²Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Registro – APTA – Vale do Ribeira – SP, Brasil.
Correspondência: barusell@usp.br

Resumo

O protocolo “Ovsynch” tem apresentado satisfatórias taxas de concepção após a IATF durante a estação reprodutiva favorável. No entanto, para a estação reprodutiva desfavorável, recomenda-se o tratamento com E2 associado a P4, com aplicação de eCG na retirada do dispositivo. Nossos resultados com MOET são sugestivos de que a baixa taxa de recuperação de estruturas embrionárias não está relacionada à reposta folicular aos hormônios superovulatórios, mas sim, provavelmente, a falha na captação dos oócitos pelas fímbrias do oviduto após a múltipla ovulação. A obtenção das primeiras prenhez e partos de bezerros búfalos FIV nas Américas, demonstram que é possível o estabelecimento desta técnica para a espécie.

Palavras-chave: Búfalo, IATF, MOET, FIV.

Abstract

The “Ovsynch” protocol has shown satisfactory conception rate after FTAI during the breeding season. However, to the off breeding season, it is recommended the treatment with E2 and P4, plus eCG injection at the moment of device removal. Our MOET results are suggestive that poor embryo recovery rate has not been associated to the follicular response in superovulatory treatment but to some problem with the capture of oocytes by the oviduct after multiple ovulation. The first two births of IVF buffaloes of Americas, showed that it is possible use this biotechnology on this species.

Keywords: Buffalo, FTAI, MOET, IVF.

Introdução

Nos últimos dez anos, o rebanho bubalino mundial apresentou taxa de crescimento de 7,8%, e, a produção de leite desta espécie aumentou 28,3% (Food and Agriculture Organization - FAO, 2005).

Mas, como ocorre nas demais espécies de interesse zootécnico, o crescimento do rebanho bubalino deve estar associado ao controle da produtividade - o que possibilita a identificação dos animais que possuem mérito genético - e à multiplicação e distribuição dos animais melhoradores, com o auxílio das biotecnologias da reprodução. Dessa forma, a bubalinocultura, hoje responsável por 12,4% da produção mundial de leite (FAO, 2005), pode se tornar uma atividade econômica cada vez mais atraente.

Nesse contexto, a inseminação artificial (IA) - que permite a multiplicação de material genético de origem paterna - é indispensável para o melhoramento genético da espécie. Mas, para acelerar o processo de melhoramento genético, aumentando a contribuição das fêmeas, é necessário aliar essa ferramenta a outras biotecnologias, como a múltipla ovulação e transferência de embriões (MOET) e a fecundação *in vitro* (FIV). Desta maneira, podem-se aumentar o rigor e a velocidade de seleção, além de reduzir o intervalo entre gerações.

O objetivo desta revisão é apresentar os resultados de pesquisa de nossa equipe e discuti-los com os conhecimentos existentes na literatura, objetivando otimizar a aplicação de biotécnicas da reprodução em rebanhos bubalinos destinados à produção de leite e de carne.

Inseminação artificial

O emprego da IA em bovinos tem sido amplamente estudado e utilizado com sucesso em propriedades rurais de todo o mundo, permitindo que a melhoria genética dos rebanhos seja mais rápida e eficiente. No entanto, em bubalinos, esta biotécnica tem sido pouco empregada por criadores, devido a certas dificuldades na identificação das manifestações estrais e do momento apropriado para a realização da IA. Esta dificuldade vem sendo observada durante a implantação e o desenvolvimento do Programa de Inseminação Artificial em Bubalinos no Vale do Ribeira- SP, coordenado pelo Departamento de Reprodução Animal da FMVZ-USP

e pela Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Registro – APTA - Vale do Ribeira. Neste Programa já foram realizadas mais de 3.000 IAs em 12 propriedades rurais da região que serviram como base para a publicação de vários trabalhos de pesquisa (Baruselli *et al.*, 1994; Barnabe *et al.*, 1995a,b; Baruselli *et al.*, 1995; 1997; Baruselli, 1997b; 1998; Baruselli *et al.*, 1999a, b, 2000a; Baruselli, 2002). Para a identificação do cio de bubalinos são necessárias duas ou mais observações diárias, ininterruptas, durante toda estação reprodutiva, além da necessidade de se detectar o início e o final do cio para realizar a IA no momento mais apropriado. Os resultados obtidos pela IA com detecção visual de cio demonstram média de 51,8% de taxa de concepção a primeira e de 57,9% à segunda inseminação, conferindo de 75% a 80% de taxa de prenhez a IA do rebanho no final da estação reprodutiva. Observa-se que estes índices apresentam grande variação conforme o manejo geral da propriedade.

Além da dificuldade de detecção de cio em bubalinos, um dos maiores fatores que limitam o desempenho reprodutivo de rebanhos inseminados artificialmente é a falha na detecção do estro pelo inseminador. O manejo correto para detecção de cios exige contínuas observações do rebanho e necessita de mão de obra qualificada, com grande responsabilidade e conhecimento específico. Rebanhos com ineficiência na detecção de cios apresentam diminuição no desempenho reprodutivo com conseqüente aumento no período de serviço e no intervalo entre partos, acarretando sérios prejuízos ao criador.

Assim, a utilização de protocolos que não necessitem de identificação de cios contribuirá para o incremento da utilização da IA nos rebanhos de bubalinos, principalmente devido à sua facilidade de execução. Estes protocolos objetivam sincronizar a IA e empregá-la em todos os animais da propriedade, mesmo naqueles que não estejam manifestando estro ou ciclicidade, colaborando, assim, para o aumento do emprego desta biotecnologia nos rebanhos de bubalinos e permitindo que o melhoramento genético e o incremento da produtividade de carne e de leite sejam mais rápidos e eficientes.

Porém, é preciso ressaltar que antes da programação de qualquer evento reprodutivo em bubalinos, é necessário o conhecimento prévio da característica reprodutiva sazonal da espécie. Os búfalos, quando criados em localidades distantes da região equatorial, têm um comportamento reprodutivo influenciado positivamente pela diminuição de horas de luz do dia (Zicarelli, 1990). Esses dados foram confirmados por levantamentos realizados durante três anos de observação do comportamento reprodutivo na Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Registro - APTA - Vale do Ribeira (Baruselli, 1993) e confirmam os resultados de pesquisas de outros países (Rao *et al.*, 1973; Obi Reddy *et al.*, 1987). As observações demonstram que a búfala encontra condições favoráveis para manifestar suas atividades reprodutivas durante os meses de outono e início do inverno.

Desta forma, foram desenvolvidos programas para a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) durante as estações reprodutivas favorável (outono e inverno) e desfavorável (primavera e verão).

IATF durante a estação reprodutiva favorável

Nossa equipe de pesquisa desenvolveu projeto avaliando a eficiência do protocolo de sincronização da ovulação para a IATF em bubalinos (Baruselli *et al.*, 1999a; 2000a). Os animais receberam 10µg de GnRH (Acetato de busarelina) durante o período pós-parto (média de 60 dias), sendo aplicados 7 dias mais tarde PGF_{2α}. Dois dias após a aplicação da PGF_{2α} os animais receberam 10µg de GnRH, sendo inseminados 16 horas mais tarde.

A primeira fase do projeto objetivou estudar a dinâmica folicular de 33 búfalas tratadas com o protocolo “Ovsynch”, para verificar a resposta da espécie a esta seqüência de tratamentos hormonais. Pela análise dos exames ultra-sonográficos, observou-se que 60,6% dos animais ovularam após a 1ª aplicação de GnRH. Notou-se que os animais que ovularam apresentaram diâmetro superior do maior folículo ($0,95 \pm 0,17$ vs. $0,67 \pm 0,24$ cm; $P < 0,01$). Observou-se, também, que búfalas com elevadas concentrações de P4 (> 1 ng/ml) no dia da aplicação do 1º GnRH apresentaram taxa de ovulação semelhante aos animais com baixas concentrações de P4 (66,6 vs. 55,5%; $P > 0,05$). O intervalo entre a 1ª aplicação de GnRH e a ovulação foi de $33,0 \pm 8,3$ horas ($n = 20$), e o intervalo entre a 2ª aplicação de GnRH e a ovulação foi de $32,0 \pm 5,7$ horas. No dia da aplicação de PGF_{2α}, as búfalas apresentaram folículo com diâmetro médio de $1,03 \pm 0,20$ cm (0,7 a 1,5cm), sugerindo que houve sincronização da onda folicular. As búfalas que ovularam na 1ª aplicação de GnRH ($n = 20$) apresentaram maiores concentrações plasmáticas de P4 no dia da aplicação da PGF_{2α} ($2,56 \pm 1,02$ vs. $1,26 \pm 0,82$ ng/ml; $P < 0,05$). Observou-se que 100% dos animais apresentaram concentração plasmática de P4 abaixo de 1ng/ml 48 horas após a aplicação de PGF_{2α}, demonstrando efetivo efeito luteolítico. Os animais que não ovularam na 1ª aplicação de GnRH ($n = 13$) apresentaram intervalo mais curto entre a 2ª aplicação de GnRH e a ovulação ($22,2 \pm 10,4$ vs. $33,9 \pm 4,9$ h; $P < 0,05$), provavelmente devido à menor sincronização da onda folicular nos animais que não ovularam. Os resultados demonstraram que os bubalinos respondem ao tratamento com GnRH/ PGF_{2α}/GnRH.

Na segunda fase do experimento (Baruselli *et al.*, 1999b), foram inseminadas artificialmente 1.053 búfalas leiteiras pelo protocolo “Ovsynch”, em 6 propriedades rurais do Vale do Ribeira - SP, durante o ano de 1998 e 1999. Nesta fase, estudou-se o efeito de fatores ligados ao escore de condição corporal no início do

tratamento (ECC; escala de 1 a 5; 1 = muito magra e 5 = muito gorda), a ordem de partos, o período pós parto em que se iniciou o tratamento, a ordem de inseminação e o período de inseminação (estação reprodutiva favorável - março a agosto - $n = 967$; estação reprodutiva desfavorável - setembro a dezembro - $n = 86$) sobre a taxa de concepção. As 967 búfalas tratadas durante a estação reprodutiva favorável apresentaram taxa de concepção média de 48,8%. Observou-se influência ($P < 0,05$) da condição corporal na taxa de concepção ($\leq 3,0 = 31,4\%$, $n = 223$; $3,5 = 52,9\%$, $n = 546$; $\geq 4,0 = 57,1\%$, $n = 198$). Este resultado sugere que as búfalas devem apresentar condição corporal $\geq 3,5$ para obtenção de boa eficiência ao tratamento. A ordem de partos também interferiu na eficiência do tratamento ($P < 0,05$). Primíparas apresentaram menor eficiência do que pluríparas (35,5%; $n = 138$ vs. 51,0%; $n = 829$). Portanto, deve-se preferencialmente sincronizar pluríparas para melhorar a eficiência deste tratamento. O período pós-parto em que se iniciou o tratamento e a ordem da inseminação não interferiram estatisticamente no tratamento ($P > 0,05$). Estes resultados demonstram que o tratamento pode ser iniciado entre 40 e 60 dias pós parto e os animais que não se tornaram gestantes à primeira sincronização podem ser tratados novamente. Desta maneira, pode-se alcançar taxa de prenhez do rebanho trabalhado de aproximadamente 75%, com duas inseminações sincronizadas em período de serviço inferior a 100 dias. O grupo de animais inseminados na estação reprodutiva desfavorável apresentou menor taxa de concepção (primavera; 6,9%; $n = 86$) do que o grupo inseminado durante a estação reprodutiva favorável (outono/inverno; 48,8%; $n = 967$; $P < 0,05$). Este dado demonstra que, o protocolo "Ovsynch" não é eficiente para a IATF em bubalinos quando utilizado na estação reprodutiva desfavorável.

Em outro estudo, Baruselli *et al.* (1999b) objetivaram avaliar a eficiência de outro análogo de GnRH (Lecirelina; Gestran Plus[®]). Os animais tratados com Lecirelina foram comparados ao Grupo controle, composto de animais sincronizados com Acetato de buserelina (Conceptal[®]). Foram utilizadas 270 búfalas pertencentes a 2 propriedades rurais localizadas nos Estados de São Paulo e de Mato Grosso do Sul. As búfalas do Grupo 1 ($n = 132$) receberam 20 μ g de Acetato de buserelina e, 7 dias mais tarde, PGF_{2 α} . Dois dias após a PGF_{2 α} , os animais receberam 10 μ g Acetato de buserelina. No Grupo 2 ($n = 138$) foi empregado o mesmo protocolo, diferindo na 1^a (50 μ g de Lecirelina) e na 3^a (25 μ g de Lecirelina) doses de GnRH. Procedeu-se à IATF 16 horas após o 2^o GnRH em ambos os grupos. Observou-se que não houve diferença na taxa de concepção entre os tratamentos (Acetato de buserelina = 47,0% vs. Lecirelina = 50%). Com base nestes resultados podemos concluir que é possível utilizar a Lecirelina para sincronizar a ovulação para a IATF em bubalinos.

Posteriormente, Baruselli (2002) objetivaram avaliar a eficiência de diferentes doses de GnRH (Acetato de buserelina e Lecirelina) na IATF. Foram utilizadas 482 búfalas que receberam 20 μ g (Grupo 1; $n = 84$) e 10 μ g (Grupo 2; $n = 86$) de Acetato de buserelina e, 7 dias mais tarde, PGF_{2 α} . Dois dias após a PGF_{2 α} os animais receberam 10 μ g de Acetato de buserelina. Nos Grupos 3 e 4 foram tratadas seguindo o mesmo protocolo, diferindo apenas o análogo de GnRH, (Grupo 3 = 50 μ g e Grupo 4 = 25 μ g de Lecirelina). Procedeu-se à IATF 16 horas após o 2^o GnRH. Os animais apresentaram semelhantes taxas de concepção, 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 demonstram que é possível utilizar reduzidas doses de Acetato de buserelina e de Lecirelina no protocolo de IATF em bubalinos.

Com o objetivo de estudar novas alternativas de sincronização da ovulação com gonadotrofinas, nossa equipe realizou outros dois experimentos para avaliar o efeito da substituição do GnRH (hormônio liberador de gonadotrofinas) pelo LH (hormônio luteinizante; Berber *et al.*, 1999) e pelo hCG (gonadotrofina coriônica humana; Carvalho *et al.*, 2004a) na segunda aplicação hormonal do protocolo "Ovsynch" em bubalinos. O LH e o hCG agem diretamente no folículo induzindo a ovulação, enquanto que o GnRH estimula a hipófise para liberação do LH endógeno, o qual irá provocar a ovulação. No caso de ausência de estoque de LH na hipófise, a aplicação de GnRH não induz a liberação de LH e, consequentemente, não ocorrerá a ovulação.

Neste sentido, foi acompanhada a dinâmica folicular pela ultra-sonografia de 30 búfalas (Grupo 1, $n = 15$; GnRH/PGF_{2 α} /GnRH e Grupo 2, $n = 15$; GnRH/PGF_{2 α} /LH). Para avaliar a eficiência a campo dos protocolos, foram sincronizadas e inseminadas 305 búfalas (Grupo 1, $n = 154$; Grupo 2, $n = 151$). Os animais receberam 20 μ g de GnRH (Acetato de buserelina, Conceptal[®]) durante o período pós-parto, sendo aplicados 7 dias mais tarde, 15mg de PGF_{2 α} (d-cloprostenol, Prosolvin[®]). Dois dias após a aplicação da PGF_{2 α} , os animais receberam 10 μ g de GnRH (Grupo 1) ou 12,5mg de LH (Grupo 2; Lutropin-V[®]). Observou-se taxa de ovulação após a primeira aplicação de GnRH de 86,6% (26/30). A taxa de ovulação após a segunda dose de GnRH e ao LH foi de 93,3% (14/15) e de 93,3% (14/15), respectivamente. A ovulação ocorreu $36,4 \pm 10,4$ horas após a primeira aplicação de GnRH. O Grupo 1 (GnRH) apresentou média de $26,5 \pm 9,6$ horas desde a última aplicação hormonal até a ovulação. Os animais do Grupo 2 ovularam $24,4 \pm 7,9$ horas após a aplicação de LH. O momento da ovulação entre os dois grupos não diferiu estatisticamente (GnRH vs. LH; $P > 0,05$). Os animais inseminados a campo com GnRH e LH apresentaram taxas de concepção de 56,49% ($n = 154$) e 64,24% ($n = 151$), respectivamente ($P = 0,08$). Os resultados demonstraram que houve sincronização da ovulação e boa eficiência do protocolo a campo nos dois grupos estudados, com tendência a melhores índices nos animais tratados com LH.

No experimento em que a última aplicação de GnRH foi substituída pela de hCG (Carvalho *et al.*,

2004a), foram utilizadas 212 búfalas das raças Murrah, Mediterrâneo e mestiças (Murrah x Mediterrâneo), nas regiões do Vale do Ribeira e de São Carlos - SP, entre os meses de maio e setembro de 2002. Os animais apresentavam ECC $\geq 3,0$. Destes, 80 foram selecionados para colheita de sangue e dosagem das concentrações plasmáticas de P4. Todas as fêmeas receberam 25 μ g de GnRH (IM; Lecirelina, Gestran Plus[®]) no D0. No D7, 0,150mg de PGF_{2 α} foram administrados (d-cloprostenol, Prolise[®]). Quarenta e oito horas após a aplicação de PGF_{2 α} (D9), os animais do Grupo 1 (G1, n = 94) receberam 25 μ g de GnRH e os animais do Grupo 2 (G2 = 118) 1.500 UI de hCG (Vetecor[®]). As búfalas dos G1 e G2 foram inseminadas no D10, 16 horas após a última aplicação hormonal. No D22, foi realizada a colheita de sangue e posterior dosagem de progesterona. Após 18 dias (D40), foi realizado o diagnóstico de gestação por ultra-sonografia. A taxa de concepção foi de 46,8% para o G1 e de 50,8% para o G2 (P>0,05). Verificou-se que a concentração plasmática de P4 foi menor para as búfalas do G1 (2,94 $\pm$ 1,51 ng/ml) em relação às do G2 (4,02 $\pm$ 2,34 ng/ml; P<0,05). Isso sugere que os corpos lúteos (CLs) formados após as ovulações induzidas pelo hCG possuem maior habilidade em secretar P4 que os CLs dos animais tratados com GnRH. Em resumo, a substituição da última aplicação de GnRH do protocolo "Ovsynch" pela de hCG, para IATF em fêmeas bubalinas, aumentou a concentração plasmática de P4. No entanto, não possibilitou o esperado aumento na taxa de concepção.

Nos dois experimentos supracitados, tanto a utilização de LH quanto a de hCG em substituição à última aplicação de GnRH, não proporcionaram aumento significativo na taxa de concepção de búfalas submetidas à IATF. Dessa maneira, como estes hormônios custam mais caro do que o GnRH, torna-se inviável a utilização destes no protocolo "Ovsynch".

Em seqüência, foi realizado outro estudo (Baruselli *et al.*, 2003b) objetivando verificar a eficiência da utilização do dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR-B[®]) associado ao protocolo "Ovsynch" para a IATF. Para tanto, foram utilizadas 171 búfalas divididas em dois grupos. Os animais apresentavam ECC $\geq 3,0$. As búfalas do Grupo 1 (controle; n = 65) receberam 25 μ g de GnRH (Lecirelina; Gestran Plus[®]) no D0 (tarde). No D7 (tarde), foi aplicado 0,150 mg de PGF_{2 α} (d-cloprostenol; Prolise[®]). Quarenta e oito horas após a aplicação de PGF_{2 α} , foi administrada a última dose de GnRH (D9, tarde). As fêmeas do G2 ("Ovsynch" + P4; n = 106) foram submetidas ao mesmo tratamento do G1 (GnRH - 25 μ g, D0/PGF_{2 α} - 0,150 mg D7/GnRH - 25 μ g, D9). No entanto, junto à primeira aplicação de GnRH, receberam um dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR-B[®]), o qual foi removido no dia da aplicação de PGF_{2 α} (D7, tarde). Todas as búfalas foram inseminadas 16 horas após a última aplicação hormonal (D10, manhã). O diagnóstico de gestação foi realizado 30 dias após a IATF por ultra-sonografia (Pie Medical 480; transdutor linear de 5,5 MHz). A taxa de concepção para os G1 e G2 foram respectivamente de 55,4% (33/65) e 57,5% (61/106; P>0,05).

Wiltbank *et al.* (2002) trabalhando com bovinos, verificaram maior taxa de gestação em animais tratados com a associação P4 + "Ovsynch" (GnRH + CIDR-B/PGF_{2 α} /GnRH; 55,2%) que naqueles tratados com o protocolo tradicional (GnRH/PGF_{2 α} /GnRH; 34,7%). Stevenson *et al.* (1997) observaram maior taxa de prenhez em vacas em anestro tratadas com a associação norgestomet/"Ovsynch" e submetidas à IATF do que naquelas tratadas apenas com PGF_{2 α} e inseminadas após detecção de cio (62% vs. 27%, respectivamente).

Satisfatórias taxas de prenhez estão sendo obtidas em vacas em anestro tratadas com a combinação progestágenos/hormônios que sincronizem a ovulação (Wiltbank *et al.*, 2002). Contudo, em fêmeas ciclando e com bom ECC, o protocolo "Ovsynch" proporciona aceitáveis taxas de concepção. O efeito do ECC na taxa de concepção em animais submetidos à IATF foi verificado previamente por Geary *et al.* (1998) em bovinos e por Baruselli *et al.* (2000a) em bubalinos. Dessa forma, como as búfalas utilizadas no presente experimento apresentavam ECC $\geq 3,0$, a progesterona exógena não proporcionou efeito positivo na taxa de concepção.

IATF durante a estação reprodutiva desfavorável

Como verificado nos trabalhos supracitados, os búfalos apresentam eficiente resposta a sincronização da ovulação para a IATF durante a estação reprodutiva favorável (outono e inverno). No entanto, quando sincronizados para IATF na estação reprodutiva desfavorável (primavera e verão) apresentam baixas taxas de ovulação e de concepção (Baruselli *et al.*, 1999b; Bartolomeu, 2003; Moura, 2003).

Na Itália foi estudado o uso do CRESTAR[®] e do PRID[®] em búfalas leiteiras durante a primavera (Zicarelli *et al.*, 1997). Os resultados foram indicativos de baixa eficiência dos tratamentos. Os autores verificaram que 55,7% das novilhas e 40,6% das vacas não ovularam até 96 horas da retirada dos dispositivos de P4. Rajamahendran e Thamotharam (1983) observaram 80% de estro em búfalas tratadas com progesterona, no entanto, a taxa de prenhez à IATF (60 a 84 horas após a retirada dos dispositivos de P4) foi de apenas 33%. No Brasil, búfalas submetidas à IATF após a sincronização da ovulação com CIDR-B[®] e CRESTAR[®] também apresentaram baixa taxa de prenhez (21,0 e 27,3 %, respectivamente; Bartolomeu *et al.*, 2001).

Assim, torna-se necessário o desenvolvimento de protocolos de sincronização da ovulação para a IATF

que apresentem respostas eficientes durante o ano para possibilitar ao criador a distribuição dos partos e da produção leiteira, juntamente com a utilização de sêmen de touros provados.

Neste sentido, nossa equipe desenvolveu projetos avaliando a eficiência de protocolos de desestacionalização para IATF em bubalinos na estação reprodutiva desfavorável (Baruselli *et al.*, 2002a; 2003c; Porto Filho, 2004; Porto Filho *et al.*, 2004). As búfalas receberam tratamento à base de progesterona, benzoato de estradiol, PGF_{2α}, eCG e hCG, segundo os protocolos apresentados nos experimentos a seguir:

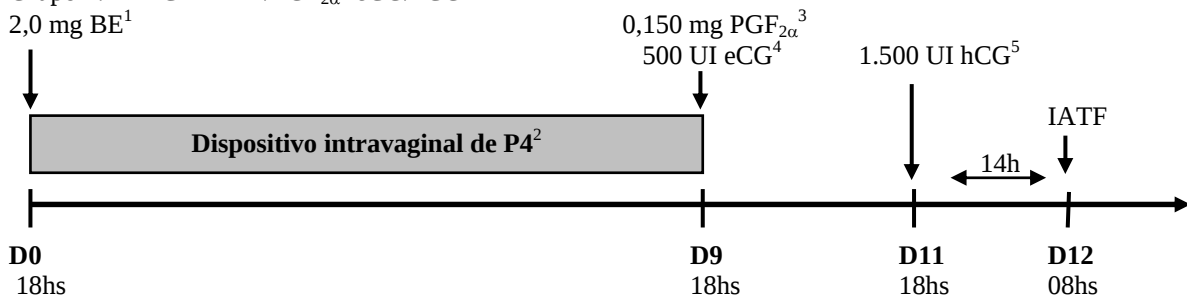
Experimento 1

O objetivo deste experimento foi avaliar diferentes protocolos de sincronização da ovulação para a IATF durante a estação reprodutiva desfavorável (primavera e verão).

Para tanto, foram tratadas 135 búfalas multiparas nos meses de Dezembro e Janeiro, as quais foram divididas em dois grupos de acordo com o ECC e a idade. As búfalas foram sincronizadas conforme o protocolo apresentado na Fig. 1. Para a IATF foi utilizado sêmen de um mesmo touro.

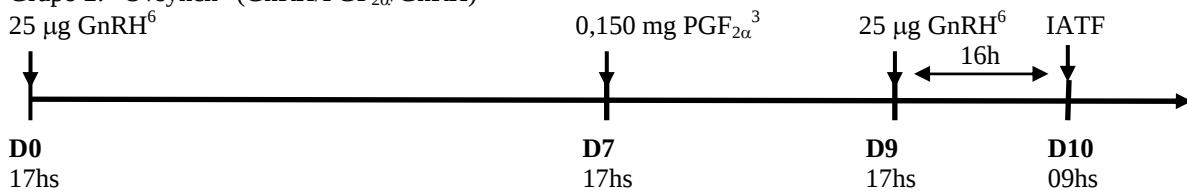
Grupo 1: BE+CIDR-B®/PGF_{2α}+eCG/hCG

2,0 mg BE¹



Grupo 2: “Ovsynch” (GnRH/PGF_{2α}/GnRH)

25 µg GnRH⁶



1. Estrogin® - Farmavet

2. CIDR-B® - Pfizer

3. Prolise® - Arsa

4. Novormon® - Syntex

5. Vetecor® - Calier

6. Gestran Plus® - Arsa

Figura 1. Protocolos de sincronização da ovulação e inseminação artificial em tempo fixo durante a estação reprodutiva desfavorável. São Paulo - SP, 2002.

Fonte: Baruselli *et al.*, 2002a.

A taxa de concepção foi maior para as búfalas do G1 do que para as do G2 ($P < 0,01$; Tabela 1). A baixa taxa de concepção observada nos animais tratados com o protocolo “Ovsynch” está de acordo com resultados prévios (Baruselli *et al.*, 1999b). Já, a taxa de concepção do grupo tratado com BE+CIDR-B®/PGF_{2α}+eCG/hCG na estação reprodutiva desfavorável, foi considerada satisfatória, semelhantemente ao observado quando da utilização da IATF na estação reprodutiva favorável. Esse resultado, que foi alcançado após uma sequência de pesquisas, indica que é possível inseminar artificialmente búfalas durante todo o ano, associando a introdução de material genético superior à desestacionalização dos partos.

Tabela. Eficiência de diferentes protocolos de sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo durante a estação reprodutiva desfavorável em búfalos. São Paulo - SP, 2002

Tratamentos	Nº de animais inseminados	Taxa de concepção (%)
Grupo 1 (BE+CIDR-B®/PGF _{2α} +eCG/ hCG)	86	53,5 (46/86) ^a
Grupo 2 (GnRH/PGF _{2α} /GnRH)	39	28,2 (11/39) ^b

^{ab} diferentes dentro de uma mesma coluna denota diferença estatística ($P < 0,01$)

Fonte: Baruselli *et al.*, 2002a

Na Itália, Barile *et al.* (2001), utilizando duas IAs (uma 72 e a outra 96 horas após a remoção do

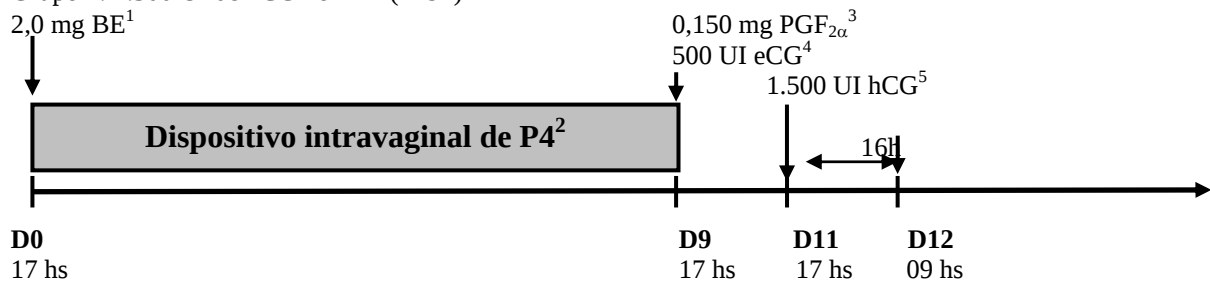
PRID®), administraram eCG no momento de retirada dos dispositivos de progesterona, e obtiveram taxa de concepção de 50%. O protocolo proposto no presente experimento permite a utilização de apenas uma inseminação, devido a indução e sincronização da ovulação pelo tratamento com hCG. Os resultados são indicativos de que a utilização do protocolo BE+P4/PGF_{2α}+eCG/hCG resulta em satisfatória taxa de concepção em búfalas submetidas a IATF durante a estação reprodutiva desfavorável.

Experimentos 2 e 3

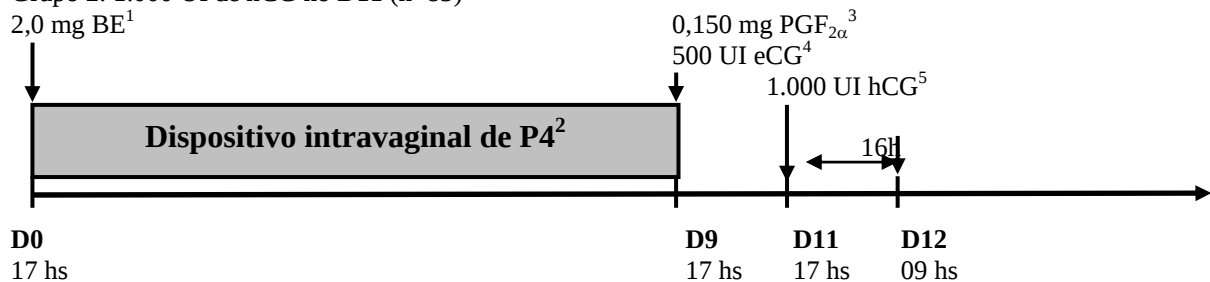
Objetivou-se com os experimentos 2 e 3 reduzir as doses de hGC (Exp. 2) e de eCG (Exp. 3) nos protocolos de sincronização da ovulação para IATF durante a estação reprodutiva desfavorável (primavera e verão) estudado anteriormente, visando minimizar os custos dos tratamentos sem comprometimento da taxa de concepção.

No Experimento 2, foram utilizadas 174 búfalas leiteiras, divididas aleatoriamente em dois grupos de acordo com o ECC e a idade. O protocolo experimental está apresentado na Fig. 2.

Grupo 1: 1.500 UI de hCG no D11 (n=91)



Grupo 2: 1.000 UI de hCG no D11 (n=83)



1. Benzoato de Estradiol® - Syntex

2. DIB® - Syntex

3. Prolise® - Arsa

4. Novormon® - Syntex

5. Vetecor® - Calier

Figura 2. Representação esquemática dos tratamentos para sincronização da ovulação com dispositivo intravaginal de P4 associado ao eCG (500 UI) e ao hCG (1.500 vs. 1.000 UI) em búfalas durante a estação reprodutiva desfavorável. São Paulo - SP, 2003.

Fonte: Baruselli *et al.*, 2003c.

As doses de hCG (G1 = 1.500 e G2 = 1.000 UI) não influenciaram as taxas de concepção à IATF ($P>0,05$), que foram de 53,8% (49/91) para os animais do G1 e de 53,0% (44/83) para aqueles do G2. A taxa de concepção total foi de 53,4% (93/174), confirmando a satisfatória resposta ao tratamento de sincronização da ovulação para IATF na estação reprodutiva desfavorável.

No Experimento 3, foram utilizadas 105 búfalas divididas aleatoriamente em dois grupos, de acordo com o ECC e a idade. As aplicações hormonais foram conduzidas como descrito no experimento 2, diferindo apenas na dose de eCG (500 UI para o Grupo 1 e 400 UI para o Grupo 2). Todas as búfalas receberam 1.000UI de hCG. Verificou-se que as diferentes doses de eCG não influenciaram a taxa de concepção ($P>0,05$). As fêmeas do G1 (500 UI de eCG) apresentaram taxa de concepção de 42,6% (23/54) e as do G2 (400 UI de eCG) de 43,1% (22/51).

A base farmacológica dos protocolos de sincronização da ovulação para a IATF durante a estação reprodutiva desfavorável, é bastante discutida na literatura para bovinos e, efeitos atribuídos a tais hormônios, quanto à simulação da fase luteínica, à atresia folicular, à emergência da nova onda de crescimento folicular e à sincronização da ovulação são relatados por vários pesquisadores (Wishart, 1972; Gordon, 1976; Odde, 1990; Bó *et al.*, 1994; 1995; Driancourt, 2000; Rocha, 2000; Lane *et al.*, 2001).

Para bubalinos, foi verificado que a taxa de concepção não sofreu qualquer influência significativa das

doses de hCG e de eCG. Os resultados obtidos no presente experimento foram superiores aos achados de Moura (2003) – 10% -, Singh *et al.* (1983) – 8,3% - e Singh *et al.* (1984) - 14% -, que trabalharam com búfalas em anestro sem a utilização de eCG ou de hCG. Porém, são semelhantes aos relatados por Saini *et al.* (1986) - 42,8% -, Shah *et al.* (1987) - 53,3% - e Singh *et al.* (1983) - 41,6%, que associaram o eCG aos dispositivos de P4.

As doses de 400 UI de eCG e 1.000 UI de hCG não influenciaram negativamente as taxas de concepção. Em bovinos, Marques *et al.* (2004) verificaram semelhantes taxas de concepção após a administração de 1.500, 1.000 e 500 UI de hCG. De acordo com tais autores, a administração de 500 UI de hCG é suficiente para proporcionar taxas de concepção satisfatórias em vacas de corte, sem influenciar negativamente os resultados. No mesmo sentido, Reis *et al.* (2004) verificaram que a dose de 400 UI de eCG, associada ao DIB® para sincronização da ovulação em receptoras de embrião, proporciona taxa de concepção semelhante ($P>0,05$) àquelas obtidas com dosagens de 500 e 600 UI. Tais resultados, associados aos da presente investigação, sugerem que a redução para 400 UI de eCG e para 1.000 UI de hCG podem ser indicadas para a sincronização da ovulação visando a IATF em búfalas na estação reprodutiva desfavorável, minimizando os custos de implantação do protocolo.

Os resultados positivos do presente estudo que empregou dispositivos intravaginais de P4, associados a promotores de crescimento folicular (eCG) e a indutores de ovulação (hCG) na estação reprodutiva desfavorável possibilitam indicar o emprego da IATF na espécie bubalina durante todo o ano, favorecendo a introdução de material genético superior e possibilitando a distribuição dos partos e da produção de leite uniformemente.

Recentemente foi realizado estudo objetivando substituir o hCG pelo GnRH como indutor de ovulação em búfalas sincronizadas para IATF durante a estação reprodutiva desfavorável (Carvalho *et al.*, 2005). Pela avaliação ultra-sonográfica, não se verificou diferença na taxa e na sincronização da ovulação. Esse dado é indicativo de que o GnRH pode ser empregado como indutor de ovulação, possibilitando ainda mais a redução dos custos do protocolo. Futuros estudos devem ser realizados para averiguar a taxa de concepção com o emprego do GnRH.

Múltipla ovulação e transferência de embriões

Devido às semelhanças na dinâmica e no padrão de dominância folicular existentes entre as espécies bovina e bubalina, as técnicas de MOET utilizadas em bovinos são, via de regra, adaptadas aos bubalinos (Baruselli, 1997a; Baruselli *et al.*, 1997).

Os primeiros estudiosos a utilizarem a MOET em bubalinos foram Drost *et al.* (1983). Nesse trabalho, realizado na Flórida, os autores também registram o nascimento do primeiro búfalo com o auxílio dessa técnica.

Posteriormente, Drost e Elsdén (1985) observaram, por meio de avaliação microscópica, que os embriões de búfalos, embora tenham o mesmo tamanho, são mais escuros que os embriões de bovinos. Outra peculiaridade da espécie está relacionada ao desenvolvimento embrionário, que, nos primeiros sete dias, é de 24 a 36 horas mais veloz que aquele apresentado pelos embriões bovinos (Drost e Elsdén, 1985; Misra *et al.*, 1990; 1991; 1998; Anwar e Ullah, 1998). Na Bulgária, Karaivanov *et al.* (1987) verificaram que os embriões de búfalos permanecem no oviduto entre 74 e 100 horas, e adentram o corno uterino 100 a 108 horas depois do início do cio.

Com o auxílio de exames ultra-sonográficos, Baruselli (1997a) constatou, no Brasil, que a espécie bubalina responde aos tratamentos superovulatórios com taxa de ovulação média de 62,8%. Essa taxa é semelhante àquela observada por Stock *et al.* (1996) em bovinos.

As melhores taxas de recuperação de estruturas embrionárias, e a maior eficiência em transferência de embriões em búfalas superovuladas, até o momento, são aquelas registradas por Misra *et al.* (1991), que superovularam 16 búfalas - selecionadas por apresentarem mais de 4 ovulações em tratamentos superovulatórios anteriores - com 600mg de FSH em doses decrescentes, durante 5 dias, e obtiveram média de 4,37 estruturas embrionárias e 3,13 embriões transferíveis por doadora. Entretanto, há que considerar que, embora nesse trabalho os autores tenham utilizado búfalas previamente selecionadas, ainda assim os resultados obtidos foram inferiores à média da espécie bovina que, de acordo com Boland *et al.* (1991), é de 10 estruturas embrionárias recuperadas, das quais 6 são embriões viáveis para a transferência.

Em 1997, Zicarelli superovulou 336 búfalas na Itália, e verificou que a porcentagem de animais que responderam ao tratamento - produzindo pelo menos um embrião transferível - variou entre 49 e 68,7%.

Baruselli *et al.* (2000b) constataram que apenas 34,8% das ovulações decorrentes de programas de superovulação em fêmeas bubalinas resultaram na colheita de estruturas embrionárias após a lavagem - *post mortem* - dos ovidutos e do útero.

O confronto entre os trabalhos até aqui mencionados e os achados de Adams (1994) – que obteve taxas de recuperação de embriões de 62% a 78% em relação ao número de ovulações, e de 63% a 80% em relação ao número de corpos lúteos (CL) em bovinos – sugere que as fêmeas bubalinas são menos eficientes que as fêmeas bovinas na recuperação de embriões.

Bó *et al.* (1996) observaram, em fêmeas bovinas superovuladas, alta correlação entre o número de folículos potencialmente ovulatórios ($\geq 8\text{mm}$) no estro e o número de embriões. Essa correlação não foi

constatada por Baruselli (1997a) e Baruselli *et al.* (1999c,d), que não encontraram, em fêmeas bubalinas superovuladas, relação estatisticamente significativa ($P > 0,05$) entre o número de folículos $\geq 8\text{mm}$ observados no estro e o número de estruturas embrionárias. Tais resultados induzem a hipótese de que as fêmeas bubalinas tenham algum tipo de comprometimento que lhes dificulte a recuperação embrionária (Baruselli *et al.*, 2000b).

Misra *et al.* (1998), trabalhando com búfalas superovuladas, observaram que altas concentrações de E2 e sua prolongada elevação, ou a grande proporção de estrógeno/progesterona, podem aumentar a turgidez do sistema genital, dificultando a captação dos oócitos pelas fimbrias. Além disso, segundo Bellve e McDonald (1970), as altas concentrações de E2 encontradas em fêmeas de pequenos ruminantes superovuladas promovem reversão no peristaltismo do oviduto, o que pode ocasionar perda dos oócitos que, eventualmente, tenham sido captados pelas fimbrias.

Na ausência de ovulação os folículos anovulatórios de búfalas superovuladas secretam altas concentrações de E2 (Schallenger *et al.*, 1990). Para Zicarelli (1997), quanto menor for a incidência de cistos ovarianos e de folículos anovulatórios, maior será a taxa de recuperação embrionária nessa espécie.

Concentrações anormais de hormônios esteróides ovarianos podem afetar os mecanismos de transporte dos gametas femininos (Hunter, 1988). O desequilíbrio entre as concentrações dos hormônios esteróides, ou seja, a elevação na proporção estrógeno/progesterona, pode prejudicar a interação entre os oócitos durante as ovulações e as células ciliadas da endosalpíngex. E a falta dessa interação promove a perda de oócitos, pois nesse período, de acordo com Hunter (1998), o fluxo dos fluidos do oviduto direciona-se à cavidade abdominal.

A relação entre os hormônios esteróides e a taxa de recuperação de estruturas embrionárias em fêmeas bubalinas superovuladas anteriormente mencionada foi utilizada como base para a elaboração de novas técnicas de MOET para a espécie. Estudos foram conduzidos com o objetivo principal de reduzir as concentrações plasmáticas de E2 em búfalas superovuladas.

Carvalho (2001) avaliou o emprego de bioimplantes auriculares contendo o agonista de GnRH deslorelina associado ao LH na superovulação de fêmeas bubalinas, e não confirmou os achados de D'Occhio e Aspdén (1999), para os quais esse agonista reduz as concentrações plasmáticas de E2 em novilhas bovinas superovuladas. Também não obteve maior taxa de recuperação de estruturas embrionárias.

Posteriormente, Baruselli *et al.* (2002b) utilizara P4 exógena em búfalas superovuladas durante o período pré-ovulatório, entre as aplicações de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e de LH, constatando que a elevação das concentrações plasmáticas de P4 reduz as concentrações sanguíneas de E_2 , o que foi verificado por Price *et al.* (1999) em fêmeas bovinas superovuladas.

Carvalho (2001) e Baruselli *et al.* (2002b) partiram da hipótese de que a redução das concentrações plasmáticas de E_2 diminuiria a turgidez uterina, proporcionando maior mobilidade das fimbrias em torno do ovário e, conseqüentemente, aumento na taxa de recuperação de estruturas embrionárias em fêmeas bubalinas superovuladas. Entretanto, Baruselli *et al.* (2002b) verificaram que, embora as concentrações plasmáticas de E2 tenham sido menores nas búfalas que receberam P4 exógena no período pré-ovulatório ($14,85 \pm 3,24 \text{ pg/ml}$) que naquelas do grupo controle ($20,04 \pm 4,08 \text{ pg/ml}$), a taxa de recuperação de estruturas embrionárias permaneceu baixa em ambos os grupos.

Danell (1987) observou, por histologia ovariana, que novilhas bubalinas apresentam reduzido número de folículos primordiais e maior taxa de atresia folicular comparado à novilhas bovinas. Le Van Ty *et al.* (1989) também observaram a existência de menor número de folículos antrais na espécie bubalina que na espécie bovina. Os autores notaram que os ovários de búfalo possuem 20% dos folículos antrais encontrados nos ovários de bovinos ($47,5 \pm 23,8$ vs. $233,0 \pm 95,8$; $P < 0,002$). O número de folículos não atresícos ($> 1,7\text{mm}$), envolvidos na resposta ovariana à gonadotrofina exógena é de 1 a 5 (média de 2,9) para búfalos, e de 17 a 32 (média de 22,1) para bovinos (Le Van Ty *et al.*, 1989). Outra característica da espécie bubalina é que, as camadas de células da granulosa são ligadas fragilmente aos oócitos, ao contrário do que ocorre na espécie bovina (Gasparrini, 2002).

Sabe-se que a Somatotropina Recombinate Bovina (rBST), aumenta a população de pequenos folículos antrais e melhora a qualidade dos oócitos por efeito direto e/ou indireto através do fator-I de crescimento semelhante à insulina (IGF-I – Gong *et al.*, 1996; Pavlok *et al.*, 1996; Deaver e Bryan, 1999; Lucy, 2000). O tratamento com rBST estimula a expansão das células do cumulus (Izadyar *et al.*, 1996; 1998a,b), o que pode contribuir para a adesão dos oócitos à fimbria e às células ciliadas da endosalpíngex e, essa interação, pode aumentar a taxa de recuperação embrionária em animais superovulados.

Dessa forma, a relação entre o hormônio rBST, os folículos e a qualidade dos oócitos, foi também utilizada como base para a elaboração de técnicas de MOET para a espécie bubalina.

Songsasen *et al.* (1999), verificou em fêmeas bubalinas superovuladas aumento no número e na proporção de embriões transferíveis para os animais tratados anteriormente com rBST, resultado que, provavelmente decorreu da melhor qualidade dos oócitos destes animais.

Para verificar a eficiência da rBST na resposta superovulatória de fêmeas bubalinas, Baruselli *et al.* (2003a) realizaram estudo com 16 búfalas e verificaram que a rBST proporcionou aumento na taxa de

recuperação de embriões e, apesar de não significativo, nos números de folículos - com capacidade de responder ao tratamento superovulatório (≥ 3 mm) - e de estruturas embrionárias recuperadas. Apesar do aumento na quantidade de estruturas embrionárias recuperadas ($5,1 \pm 6,8$ vs. $1,6 \pm 1,7$, para os grupos rBST e controle respectivamente), os resultados obtidos foram inferiores àqueles encontrados na literatura para a espécie bovina (Boland *et al.*, 1991).

Carvalho *et al.* (2004b) verificaram a hipótese de que o transporte de oócitos em fêmeas bubalinas superovuladas pode ser mais rápido do que o verificado por Karaivanov *et al.* (1987), que trabalharam com búfalas após o cio natural. Nesse estudo, 16 búfalas foram superovuladas e, abatidas 2 e 5 dias após a primeira inseminação artificial. Os ovidutos foram lavados para a colheita das estruturas embrionárias. Foi verificado que, tanto as colheitas realizadas com 2 quanto as realizadas com 5 dias após a primeira inseminação artificial resultaram em baixa taxa de recuperação de estruturas embrionárias. Os autores não confirmaram a hipótese com a metodologia aplicada no estudo em questão.

Aspiração folicular e fecundação *in vitro*

Os benefícios da FIV para o melhoramento genético podem ser alcançados se os oócitos utilizados forem obtidos de animais vivos e com alto potencial genético (Visintin *et al.*, 1997). A recuperação de oócitos por punção transvaginal (Ovum pick-up - OPU) permite a colheita de grande número de oócitos de doadoras conhecidas (Gasparrini, 2002). A OPU tem sido aplicada em búfalos (Boni *et al.*, 1997; Galli *et al.*, 1998), mas, os resultados obtidos apresentam baixa eficiência (Gasparrini, 2002).

Nosso grupo de pesquisa, em associação com o Prof. Dr. Giuseppe Campanille da Università Degli Studi di Napoli Federico II, conduziu um experimento para estudar a OPU em novilhas bubalinas. Foram utilizadas onze fêmeas da raça Murrah (*Bubalus bubalis*), de aproximadamente 28 meses de idade, com peso vivo de 380 a 450 Kg. Todos os animais foram mantidos no Departamento de Reprodução Animal da FMVZ-USP em São Paulo.

Foram realizadas sessões semanais de OPU e os oócitos recuperados foram quantificados e classificados. Os resultados estão apresentados na Tab. 2.

Tabela 2. Folículos aspirados semanalmente - pela técnica de punção transvaginal - de novilhas bubalinas. São Paulo, 2002

Número de novilhas	11
Número de sessões de aspiração	10
Número de folículos aspirados/animal/sessão	9,1
Número de oócitos recuperados/animal/sessão	3,5
Taxa de recuperação (oócitos recuperados/folículos aspirados)	38,4%
Número de oócitos recuperados de acordo com a qualidade: Grau A	16 (4,2%)
B	89 (23,2%)
C	160 (41,6%)
D	68 (17,7%)
E	51 (13,3%)
Total:	384 (100%)

O número médio de folículos aspirados e oócitos recuperados por novilha/sessão foi de 9,1 e 3,5, respectivamente. Esses resultados foram superiores aos verificados por Boni *et al.* (1997; 4,2 e 1,3, respectivamente) e Tavares *et al.* (1997; 3,0 e 1,3, respectivamente). Apenas 27,3% dos oócitos recuperados foram considerados de boa qualidade para serem utilizados na FIV (Graus A e B). Esse resultado foi similar aos obtidos por Boni *et al.* (1997), que trabalharam com 6 fêmeas bubalinas em anestro e obtiveram 31,3% de oócitos desejáveis para a produção *in vitro* de embriões bubalinos.

Em 10 sessões de aspiração, foram obtidos 46 corpúsculos de Call-Exner (4,6/sessão). De acordo com Danell (1987), esses corpúsculos podem ser descritos como uma cavidade preenchida por fluido e rodeada por um anel contendo 1 ou 2 camadas de células da granulosa. Segundo o autor, é comum obter essas estruturas em sessões de aspiração folicular de fêmeas bubalinas.

Sabe-se que a quantidade e a qualidade dos oócitos recuperados por sessão de aspiração é determinante para a produção embrionária e a viabilidade técnica e comercial da OPU-FIV na espécie bubalina (Ohashi, *et al.*, 2003). No entanto, as fêmeas bubalinas, quando comparadas às bovinas, apresentam número reduzido de folículos recrutados por onda de crescimento folicular, com alto grau de atresia (Danell, 1987; Le Van Ty *et al.*, 1989).

Em estudos realizados com a aplicação de Somatotropina Recombinate Bovina (rBST), foi verificado

aumento na população de pequenos folículos antrais e melhora na qualidade dos oócitos de fêmeas bovinas por efeito direto e/ou indireto através do fator-I de crescimento semelhante à insulina (IGF-I – Gong *et al.*, 1996; Pavlok *et al.*, 1996; Deaver e Bryan, 1999; Lucy, 2000).

Dessa forma, a relação entre o hormônio rBST, os folículos e a qualidade dos oócitos, foi utilizada como base para a elaboração de técnicas objetivando aumentar a população folicular, a qualidade oocitária e a taxa de recuperação de oócitos obtidos por OPU em fêmeas bubalinas

Sá Filho *et al.* (2005b) realizou estudo com 10 novilhas bubalinas (*Bubalus bubalis*) selecionadas de acordo com o peso corporal ($\geq 350\text{Kg}$), o diâmetro médio do ovário ($\geq 2\text{cm}$) e a população folicular (≥ 8 folículos/ovário), entre os meses de junho e agosto de 2004. As fêmeas foram divididas homogeneamente em dois Grupos (Controle e rBST). Os animais do Grupo rBST receberam sucessivas aplicações de 500mg de rBST (Lactotropin®, Elanco), com o início quatro dias anteriores à primeira sessão de aspiração e, posteriormente, a cada 14 dias, até o final do experimento. O Grupo controle não recebeu tratamento adicional. As fêmeas foram submetidas à sessões de aspiração folicular por punção transvaginal a cada três ou quatro dias (duas vezes/semana), durante cinco semanas (total de 10 sessões). O número de folículos $> 3\text{mm}$, de folículos aspirados e a taxa de recuperação de oócitos (número de oócitos recuperados/número folículos aspirados) foram avaliados anteriormente às sessões de aspiração. Os resultados estão apresentados na Tab. 3.

Tabela 3. Efeito do tratamento com rBST no número de folículos aspirados, na taxa de recuperação de oócitos e na qualidade oocitária em fêmeas bubalinas. Jaboticabal - SP, 2004.

Parâmetros	Controle	rBST
Número de folículos aspirados	$6,8 \pm 0,3^a$	$9,1 \pm 0,6^b$
Número de oócitos recuperados	$4,1 \pm 0,5^c$	$5,2 \pm 0,5^d$
Taxa de recuperação de oócitos (%)	$57,7 \pm 4,9$	$54,5 \pm 3,9$
Porcentagem de oócitos de qualidade A, B e C	$76,2 \pm 3,1$	$77,3 \pm 3,0$

$a \neq b = P < 0,05$ e $c \neq d = 0,07$

Fonte: Sá Filho *et al.*, 2005b.

O tratamento com rBST proporcionou aumento nos números de folículos aspirados ($P < 0,05$) e de oócitos recuperados ($P = 0,07$).

Posteriormente (Sá Filho *et al.*, 2005a), 247 oócitos viáveis foram maturados *in vitro*. Destes, 45,3% (112/247) clivaram e, foram produzidos 57 embriões (23,1%; 57/247). Os embriões foram inovulados em tempo fixo (TETF) em fêmeas previamente sincronizadas (GnRH/PGF_{2α}/GnRH). A taxa de aproveitamento das fêmeas para a TETF foi de 80% (32/40). Após a TETF, cada fêmea recebeu uma aplicação de GnRH (Gestran Plus®) e, 30 dias após, foi realizado o diagnóstico de gestação por ultra-sonografia. Verificou-se taxa de prenhez de 14,3% (1/7) para as fêmeas inovuladas com embriões frescos e de 8,0% (2/25) para as que receberam embriões vitrificados. A obtenção das primeiras prenhez de embriões bubalinos produzidos *in vitro* - fresco e vitrificados - nas Américas, demonstra que é possível estabelecer um protocolo de OPU-FIV viável para a espécie.

É oportuna a informação do nascimento de 2 bezerros bubalinos provenientes das duas prenhez de embrião FIV vitrificados. Os bezerros nasceram viáveis e, até o presente momento, apresentam-se saudáveis. O parto da fêmea prenhe de embrião FIV fresco está previsto para o mês de agosto de 2005. Esse trabalho foi conduzido em parceria com o Prof. Joaquim Mansano Garcia da UNESP de Jaboticabal e a Prof. Bianca Gasparrini da Universidade de Nápoles – Itália.

Apesar dos resultados acima mencionados, novos estudos são necessários para o desenvolvimento de estratégias que possibilitem aumentar a eficiência da OPU-FIV na espécie bubalina.

Em resumo, os conhecimentos existentes sobre o emprego de biotecnologias da reprodução em bubalinos permitem avaliar e indicar, aos técnicos e criadores, quais os procedimentos que podem ser empregados com sucesso. De posse desses conhecimentos, o setor produtivo possui ferramentas para incrementar o emprego da inseminação artificial, seja tradicionalmente ou em tempo fixo, com vistas à melhoria genética e produtiva dos rebanhos bubalinos. Múltipla ovulação e transferência de embriões (MOET) e a fecundação *in vitro* (FIV) são importantes e necessárias biotecnologias para acelerar o melhoramento genético na espécie bubalina. A compreensão dos processos fisiológicos que envolvem os hormônios esteróides (estradiol e progesterona), a ovulação, a qualidade dos oócitos, a captação e o transporte dos gametas femininos são de grande importância para melhorar a eficiência da MOET em búfalos. Nesse contexto, para a produção de embriões FIV, os conhecimentos da fisiologia ovariana e do desenvolvimento embrionário são necessários para otimizar a eficiência desta biotecnologia.

Agradecimentos

Aos bubalinocultores, à Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Registro – APTA - Vale do Ribeira e à Associação Brasileira de Criadores de Búfalos (ABCB) pelo apoio, incentivo e confiança em nosso trabalho.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo financiamento de projetos de pesquisa e de capacitação científica na área de reprodução bubalina. À Tecnopec pelo subsídio aos protocolos hormonais.

Referências bibliográficas

- Adams GP.** Control of ovarian follicular wave dynamics in cattle: implications for synchronization & superstimulation. *Theriogenology*, v.41, p.19-24, 1994.
- Anwar M, Ullah N.** Early development and location of embryos in the reproductive tract of Nili Ravi Buffalo (*Bubalus bubalis*): a retrospective analysis. *Theriogenology*, v.49, p.1187-1193, 1998.
- Barile VL, Pacelli C, Galasso A, De Mauro GJ, Francillo M, Cigliano A, Penna L, Pandilli M, Terzano GM, Borghese A.** Inseminazione artificiale nella bufala: Risultati di prove condotte nel lazio. In: Congresso Nazionale Sull'Allevamento del Bufalo, 1, 2001, Eboli, Italia. *Proceedings ... Eboli: 2001*. v.1, p.354-358.
- Barnabe VH, Baruselli PS, Barnabe RC.** Implantação de programas de inseminação artificial. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 11, 1995, Belo Horizonte. *Anais ... Belo Horizonte: CBRA, 1995a*. v.1, p.142-155.
- Barnabe VH, Baruselli PS, Barnabe RC, Visintin JA, Molero-Filho JR, Porto-Filho RM.** Inseminação artificial em bubalinos utilizando dois diferentes diluidores. In: Simpósio Brasileiro de Pesquisa em Medicina Veterinária, 1, 1995, São Paulo. *Anais ... São Paulo: 1995b*. v.1, p.92.
- Bartolomeu CC.** Estudo da dinâmica folicular durante o tratamento com CIDR-B e Crestar visando, a inseminação artificial em tempo fixo em fêmeas bubalinas (*Bubalus bubalis*). 2003. 149f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) -- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.
- Bartolomeu CC, Del Rei AJM, Madureira EH, Souza AJ, Silva AJ, Baruselli PS.** Inseminação artificial em tempo fixo com sincronização da ovulação em bubalinos utilizando-se CIDR-B, Crestar e Ovsynch. *Rev Bras Reprod Anim*, v.25, p.334-336, 2001.
- Baruselli PS.** Dinâmica folicular durante o ciclo estral e resposta superovulatória em fêmeas bubalinas (*Bubalus bubalis*). 1997. 96f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 1997a.
- Baruselli PS.** Folliculogenesis in buffalo. *Bubalus Bubalis*, v.4, suppl.4, p.79-92, 1997b.
- Baruselli PS.** Manejo reprodutivo de bubalinos. São Paulo: SAA/Cordenadoria da Pesquisa Agropecuária/ Instituto de Zootecnia/EEZ-Vale do Ribeira, 1993. 46p.
- Baruselli PS.** Novos avanços na reprodução bubalina. In: Baruselli PS. (Ed.). *A bubalinocultura brasileira: situação atual e perspectivas*. São Paulo: ABCB 1998. p.77-138.
- Baruselli PS.** Sincronização da ovulação com GnRH e prostaglandina $F_{2\alpha}$ para inseminação artificial em tempo fixo em bubalinos. 2002. 99f. Tese (Livre docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.
- Baruselli PS, Barnabe VH, Barnabe RC, Visintin JÁ, Molero-Filho JR, Porto-Filho R.** Condição corporal ao parto e eficiência reprodutiva de fêmeas bubalinas inseminadas artificialmente. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 11, 1995, Belo Horizonte. *Anais ... Belo Horizonte: CBRA, 1995*. v.1, p.380.
- Baruselli PS, Carvalho NAT, Cavalcante AKS, Nichi M, Zicarelli L.** Use of rBST associated to a protocol for multiple ovulation and embryo transfer in buffalo (*Bubalus bubalis*). In: Congresso Nazionale Sull'Allevamento Del Buffalo, 2nd, 2003, Roma. *Proceedings ... Roma: 2003a*. v.1, p.269-273.
- Baruselli PS, Carvalho NAT, Henriquez CHP, Amaral R, Nichi M.** Synchronization of ovulation for timed artificial insemination during the off breeding season in the buffalo. In: Buffalo Symposium of Americas, 1st, 2002, Belém. *Proceedings ... Belém: Embrapa/CPATU, 2002a*. v.1, p.418-420.
- Baruselli PS, Carvalho NAT, Henriquez CEP, Amaral R, Nichi M, Reichert RH.** Use of progesterone associated to "Ovsynch" protocol for timed artificial insemination in buffalo (*Bubalus bubalis*). In: Congresso Nazionale Sull'Allevamento Del Buffalo, 2nd, 2003, Roma. *Proceedings ... Roma: 2003b*. v.1, p.265-268.
- Baruselli PS, Carvalho NAT, Nichi M, Reichert RH.** Reduction of hCG dosage in a protocol for synchronization of ovulation for timed artificial insemination during the off breeding season in buffalo. In: Congresso Nazionale Sull'Allevamento Del Buffalo, 2nd, 2003, Roma. *Proceedings ... Roma: 2003c*. v.1, p.261-264.
- Baruselli PS, Madureira EH, Barnabe VH, Barnabe RC, Berber RCA, Amaral R.** Timed insemination using synchronisation of ovulation in buffalo. In: International Congress on Animal Reproduction, 14th, 2000, Stockholm: *Abstracts ... Stockholm: ICAR, 2000a*. v.2, p.14-18.
- Baruselli PS, Madureira EH, Barnabe VH, Barnabe RC, Visintin JA, Oliveira CA, Amaral R.** Estudo da dinâmica folicular em búfalas submetidas à sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo. *Arq Fac Vet UFRGS*, v.27, p.210, 1999a.
- Baruselli PS, Madureira EH, Visintin JA, Barnabe VH, Barnabe RC, Amaral R.** Inseminação artificial em tempo fixo com sincronização da ovulação em bubalinos. *Rev Bras Reprod Anim*, v.23, p.360-362, 1999b.

- Baruselli PS, Madureira EH, Visintin JA, Ohashi OM, Souza JS, Parmeggiani A, Campanile G, Zicarelli L. Follicular dynamics and embryo recovery rate in superovulated buffalo. *Arq Fac Vet UFRGS*, v.27, supl., p.200, 1999c.
- Baruselli PS, Madureira EH, Visintin JA, Porto-Filho R, Carvalho NAT, Campanile G, Zicarelli Z. Failure of oocyte entry into oviduct in superovulated buffalo. In: Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, 25, Maastrich, 2000. *Theriogenology*, v.53, p.491, 2000b. Abstract.
- Baruselli PS, Marques MO, Arruda RP, Carvalho NAT, Oliveira CA. Plasma estradiol and progesterone concentrations in superovulated buffalo in presence of CIDR-B devices. *Theriogenology*, v.57, p.761, 2002b.
- Baruselli PS, Mucciolo RG, Arruda R, Madureira EH, Amaral R, Assumpção MEOA. Embryo recovery rate in superovulated buffalo. *Theriogenology*, v.51, p.401, 1999d.
- Baruselli PS, Mucciolo RG, Visintin JA, Viana WG, Arruda RP, Madureira EH, Oliveira CA, Molero-Filho JR. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*, v.47, p.1531-1547, 1997.
- Baruselli PS, Viana WG, Mucciolo RG, Oliveira CA, Madureira EH. Ovarian activity and sexual behavior during postpartum period in buffaloes. In: World Buffalo Congress, 4th, 1994, São Paulo: *Proceedings ...* São Paulo, 1994. v.3, p.440-442.
- Bellve AR, McDonald MF. Directional flow of fallopian tube secretion in the ewe at onset of the breeding season. *J Reprod Fertil*, v.22, p.147-149, 1970.
- Berber RCA, Baruselli PS, Madureira EH. Sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo com GnRH e LH (resultados parciais). *Arq Fac Vet UFRGS*, v.27, p.216, 1999.
- Bo GA, Adams GP, Caccia M, Martinez M, Pierson RA, Mapletoft RJ. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progesterone and estradiol in cattle. *Anim Reprod Sci*, v.39, p.193-204, 1995.
- Bo GA, Adams GP, Pierson RA, Mapletoft RJ. Effect of progestogen plus estradiol-17 β treatment on superovulatory response in beef cattle. *Theriogenology*, v.45, p.897-910, 1996.
- Bó GA, Adams GP, Pierson RA, Tribulo HE, Caccia M, Mapletoft RJ. Follicular wave dynamics after estradiol – 17 B treatment of heifers with or without a progestogen implant. *Theriogenology*, v.41, p.1555-1569, 1994.
- Boland MP, Goulding D, Roche JF. Alternative gonadotrophins for superovulation in cattle. *Theriogenology*, v.35, p.5-17, 1991.
- Boni R, Roelofsen VM, Pieterse M, Kogut J, Kruipth AM. Follicular dynamics repeatability and predictability of follicular recruitment in cows undergoing repeated follicular puncture. *Theriogenology*, v.48, p.277-89, 1997.
- Carvalho NAT. *Uso do agonista de GnRH deslorelina, associado ao LH, para a superovulação de fêmeas bubalinas (Bubalus bubalis)*. 2001. 68f. Tese (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.
- Carvalho NAT, Carvalho MV, Visintin JA, Vannucci FS, Sá Filho MF, Nichi M, Reichert RH, Baruselli PS. Uso de dispositivos intravaginais de progesterona associados ao hCG ou GnRH para sincronização da ovulação em búfalas na estação reprodutiva desfavorável. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 16, 2005, Goiânia. *Anais ...* Belo Horizonte: CBRA, 2005. CD-ROM.
- Carvalho NAT, Reichert RH, Nichi M, Henriquez CEP, Oliveira CA, Baruselli PS. Use of hCG to timed artificial insemination in buffalo. In: International Congress on Animal Reproduction, 15th, 2004, Porto Seguro. *Abstracts ...* Belo Horizonte: CBRA, 2004a. v.2, p.384.
- Carvalho NAT, Zicarelli L, Cavalcante AKS, Nichi M, Baruselli PS. Embryo recovery rate in buffalo female according to the day of flushing. In: World Buffalo Congress, 7th, 2004, Manila. *Proceedings...* Manila: 2004b. v.2, p.756-757.
- Danell B. *Oestrous behaviour, ovarian morphology and cyclical variation in follicular system and endocrine pattern in water buffalo heifers*. 1987, 124f. Thesis (PhD) - Faculty of Veterinary Medicine, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, 1987.
- Deaver DR, Bryan KA. Effect of exogenous somatotropin (ST) on gonadal function in ruminant and swine. *Dom Anim Endocrinol*, v.17, p.287-297, 1999.
- D'Occhio MJ, Aspden WJ. Endocrine and reproductive responses of male and female cattle to agonists of gonadotrophin-releasing hormone. *J Reprod Fertil Suppl*, n.54, p.101-114, 1999..
- Driancourt MA. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology*, v.54, p.1211-1239, 2000.
- Drost M, Wright Junior JM, Cripe WS, Richter AR. Embryo transfer in water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*, v.20, p.549-585, 1983.
- Drost M, Elsdon RP. Blastocist development in the water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*, v.23, p.191, 1985.
- Food And Agriculture Organization – FAO. FAOSTAT: Agriculture data. Disponível em: <http://faostat.fao.org/faostat/collections?versio=ext&hasbulk=0&subset=Agriculture>. Acesso em: 30/04/2005.
- Galli C, Duchi R, Crotti G, Lazzari G. Embryo production by ovum pick-up in water buffalo. *Theriogenology*,

v.49, p. 400, 1998.

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

Geary TW, Whittier JC, Downing ER, Lefever DG, Silcox RW, Holland MD, Nett TM, Niswender GD. Pregnancy rates of postpartum beef cows that were synchronized using Syncromate-B® or the ovsynch protocol. *J Anim Sci*, v.76, p.1523-1527, 1998.

Gong JG, Campbell BK, Bramley TA, Gutierrez CG, Peters AR, Webb R. Suppression the secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone, and ovarian follicle development in heifers continuously infused with a gonadotropin-releasing hormone agonist. *Biol Reprod*, v.56, p.68-74, 1996.

Gordon I. Controlled breeding in cattle. Part 1. Hormone in the regulation of reproduction, oestrus, control, and set time artificial insemination. *Anim Breed Abstr*, v.44, p.265-275, 1976.

Hunter RHF. *The fallopian tubes: their role in fertility and infertility*. Berlin: Springer-Verlag, 1988. p.12-156.

Izadyar F, Colenbrander B, Bevers MM. In vitro maturation of bovine oocytes in the presence of growth hormone accelerates nuclear maturation and promotes subsequent embryonic development. *Mol Reprod Dev*, v.45, p.372-377, 1996.

Izadyar F, Hage WJ, Colenbrander B, Bevers MM. The promotory effect of growth hormone on the developmental competence in vitro matured bovine oocytes is due to improved cytoplasmic maturation. *Mol Reprod Dev*, v.49, p.444-453, 1998a.

Izadyar F, Zeinstra E, Bevers MM. Follicle-stimulating hormone and growth hormone act differently on nuclear maturation while both enhance development competence of in vitro matured bovine oocytes. *Mol Reprod Dev*, v.51, p.339-345, 1998b.

Karaivanov C, Vlahov K, Petrov M, Kacheva D, Stojanova M, Alexiev A, Polihronov O, Danev A. Studies on preimplantation development of buffalo embryos. *Theriogenology*, v. 28, p. 747-753, 1987.

Lane EA, Austin EJ, Roche JF, Crowe MA. The effect of estradiol benzoate on synchrony of estrus and fertility in cattle after removal progesterone-releasing intravaginal device. *Theriogenology*, v.55, p.1807-1818, 2001.

Le Van Ty, Chupin D, Driancourt DA. Ovarian follicular population in buffaloes and cows. *Anim Reprod Sci*, v.19, p.171-8, 1989.

Lucy MC. Regulation of ovarian follicular growth by somatotropin and insulin-like growth factors in cattle. *J Dairy Sci*, v.83, p.1635-1647, 2000.

Marques MO, Campos Filho EP, Mantovani AP, Reis EL, Nichi M, Baruselli PS. Adequação da dose de hCG (Vetecor®) para indução da ovulação em protocolos de inseminação artificial em tempo fixo. In: Reunião da Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões, 18, 2004, Barra Bonita. *Anais ... Barra Bonita: Arquivos da UFRGS*, 2004. v.32, p.229.

Misra AK, Joahi BV, Agrawala PL, Kasiraj R, Sivaiah S, Rangareddi NS, Siddiqui MU. Multiple ovulation and embryo transfer in indian buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*, v.33, p.1131-1141, 1990.

Misra AK, Joshi BV, Kasiraj R, Sivaiah S, Rangareddi NS. Improved superovulatory regimen for buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*, v.35, p.245, 1991.

Misra AK, Kasiraj R, Mutha Rao M, Rangareddy NS, Jaiswal RS, Pant HC. Rate of transport and development of preimplantation embryo in the superovulated buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*, v.50, p.637-649, 1998.

Moura AJDR. *Sincronização da ovulação com dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR-B®) associado a estrógeno e prostaglandina F2α em búfalas (Bubalus bubalis) tratadas em estações reprodutivas distintas*. 2003. 129f. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

Obi-Reddy A, Tripathi VN, Raina VS. Effect of climate on the incidence of oestrus and conception rate in Murrah buffaloes. *Indian J Anim Sci*, v.57, p.204-207, 1987.

Odde KG. A review of synchronization of estrus in postpartum cattle. *J Anim Sci*, v.68, p.817-830, 1990.

Ohashi OM, Miranda MS, Sousa JS, Sousa AJO, Cordeiro MS, Biondi FC. Produção *in vitro* de embrião bubalino. *Rev Bras Reprod Anim*, v.27, p.103-109, 2003.

Pavlok A, Koutecká L, Krejčí P, Slavík T, Cerman J, Slaba J, Dorn D. Effect of recombinant bovine somatotropin on follicular growth and quality of oocytes in cattle. *Anim Reprod Sci*, v.41, p.183-192, 1996.

Porto Filho RM. *Sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo (IATF) durante a estação reprodutiva desfavorável em fêmeas bubalinas*. 2004. 99f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

Porto Filho RM, Carvalho NAT, Viel Júnior JO, Vannucci FS, Amaral R, Reichert RH, Baruselli PS. eCG dosage reduction in a protocol for synchronization of ovulation for timed artificial insemination during the off breeding season in buffalo. In: Buffalo Symposium of Americas, 2nd, 2004, Corrientes, *Proceedings ... Corrientes*: 2004. CD-ROM.

Price CA, Carrière PD, Gosselin N, Kohran H, Guilbalt LA. Effects of superovulation on endogenous LH secretion in cattle, and consequences for embryo production. *Theriogenology*, v.51, p.37-46, 1999.

- Rajamahendran R, Thamotharam M.** Effect of progesterone releasing intravaginal device (PRID) on fertility in post-partum buffalo cow. *Anim Reprod Sci*, v.6, p.111-118, 1983.
- Rao BR, Patel UG, Tamhan SS.** Studies on the reproductive behavior of Surti buffaloes. I. Oestrous cycle. *Indian Vet J*, v.50, p.257-64, 1973.
- Reis EL, Nasser LF, Menegatti JA, Rezende LF, Mantovani AP, Baruselli PS.** Effect of time and dose of eCG treatment in *Bos taurus* x *Bos indicus* recipients treated with progesterone for timed embryo transfer. In: International Congress on Animal Reproduction, 15th, Porto Seguro, 2004. *Abstract ...* Belo Horizonte: CBRA, 2004. v.2, p.395.
- Rocha JL.** Sincronização hormonal da onda folicular e do estro em novilhas de corte mestiças monitoradas por radiotelemetria. 2000. 125f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.
- Sá Filho MF, Carvalho NAT, Gimenes LU, Torres Júnior JF, Ferreira CR, Perecin F, Perini AP, Tetzner TAD, Vantini R, Soria GF, Garcia JM, Tonhati H, Gasparrini B, Baruselli PS.** Prenhez de embriões bubalinos frescos e vitrificados produzidos *in vitro*. In: Reunião da Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões, 19, 2005, Angra dos Reis. *Anais ...* Angra dos Reis: Arquivos da UFRGS, 2005a. No prelo.
- Sá Filho MF, Carvalho NAT, Gimenes LU, Torres Júnior JF, Garcia JM, Tonhati H, Gasparrini B, Baruselli PS.** Efeito do bST na população folicular, na qualidade oocitária e na taxa de recuperação *in vivo* de oócitos em fêmeas bubalinas. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 16, 2005, Goiânia, 2005. *Anais ...* Belo Horizonte: CBRA, 2005b. CD-ROM.
- Saini MS, Galhotra MM, Kaker ML, Razdan MN.** Induction of estrus and ovulation in non-cyclic buffalo (*Bubalus bubalis*) heifers with progesterone releasing intravaginal device and pregnant mare serum gonadotrophin and their gonadotrophin profile. *Theriogenology*, v.26, p.749-755, 1986.
- Shah SNH, Willense AH, Van De Wiel DFM.** Induction of ovulatory oestrus in true anoestrus buffaloes during low breeding season. *Anim Reprod Sci*, v.14, p.233-238, 1987.
- Schallenger E, Wagner HG, Papa R, Hartl P, Tenhumberg H.** Endocrinological evaluation of the induction of superovulation with PMSG in water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*, v.34, p.379-392, 1990.
- Singh G, Singh GB, Sharma RD, Nanda AS.** Experimental treatment of summer anoestrus buffaloes with norgestomet and PRID. *Theriogenology*, v.19, p.323-329, 1983.
- Singh G, Singh GB, Sharma RD, Nanda AS.** Ovulation and fertility after PRID, PRID + GnRH and GnRH in anoestrus buffaloes. *Theriogenology*, v.21, p.859-867, 1984.
- Songsasen N, Yiengvisavakul V, Buntaracha B, Pharee S, Apimeteetumrong M, Sukwongs Y.** Effect of treatment with recombinant bovine somatotropin on responses to superovulatory treatment in swamp buffalo. *Theriogenology*, v.52, p.377-384, 1999.
- Stevenson JS, Hoffman DP, Nichols DA, McKee RM, Krehbiel CL.** Fertility in estrus-cycling and noncycling virgin heifers and suckled beef cows after induced ovulation. *J Anim Sci*, v.75, p.1343-1350, 1997.
- Stock AE, Ellington JE, Fortune JE.** A dominant follicle does not affect follicular recruitment by superovulatory doses of FSH in cattle but can inhibit ovulation. *Theriogenology*, v.45, p.1091-1102, 1996.
- Tavares, L.M.T.; Assumpção, M.E.O.A.; Mello, M.R.B.; D'angelo, M.; Baruselli, P.S.; Queiroz, L.M.V.; Visintin, J.A.** A Twice weekly ultrasound-guided follicular aspirations in buffalo heifers. In: World Buffalo Congress, 5th, 1997, Caserta, Italia. *Proceedings ...* Caserta: 1997. v.1, p.783-786.
- Visintin JA, Assumpção MEOA, Baruselli PS.** Use of biotecnologies in buffalo bred in Brazil. *Bubalus bubalis*, n.4, suppl.4, p.189-204, 1997.
- Wiltbank MC, Gümen A, Sartori R.** Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. *Theriogenology*, v.57, p.21-52, 2002.
- Wishart DF.** Observations on the oestrous cycle of the Friesian heifers. *Vet Rec*, v.90, p.595-597, 1972.
- Zicarelli L.** *Considerazioni sull'allevamento bufalino*. Salerno: Ente Regionale Sviluppo Agricolo in Campania, 1990. 70p.
- Zicarelli L.** News on buffalo cow reproduction. In: World Buffalo Congress, 5th, 1997, Caserta, Italia. *Proceedings ...* Caserta: 1997. v.1, p.124-141.
- Zicarelli L, De Filippo C, Francillo M, Pacelli C, Villa E.** Influence of insemination technique and ovulation time on fertility percentage in synchronized buffaloes. In: World Buffalo Congress, 5th, 1997, Caserta, Italia. *Proceedings ...* Caserta: 1997. v.1, p.732-737.