

Avaliação da liberação de LH e da concentração de progesterona em protocolos Ovsynch e Heatsynch em bubalinos (*Bubalus bubalis*)

Rodolfo Cassimiro de Araújo BERBER¹

Ciro Moraes BARROS²

Guilherme Paula NOGUEIRA³

Pietro Sampaio BARUSELLI⁴

Correspondência para:

Rodolfo Cassimiro de Araújo Berber
Instituto Universitário Norte-Matogrossense,
Universidade Federal de Mato Grosso
Campus Sinop
Av. Brasília 1200 Setor Industrial, 78550-
000 - Sinop - MT. e-mail: berber@ufmt.br

Recebido para publicação: 27/09/2005

Aprovado para publicação: 13/06/2007

1 - Instituto Universitário Norte-Matogrossense da Universidade Federal de Mato Grosso, Sinop-MT

2 - Departamento de Farmacologia do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP

3 - Departamento de Apoio, Produção e Saúde da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista, Araçatuba-SP

4 - Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo-SP

Resumo

O objetivo desse estudo foi avaliar a liberação de LH durante os protocolos de sincronização da ovulação em bubalinos. Para tanto, quinze búfalas múltiparas receberam 25 mg de Lecirelina no Dia 0, e 150 mg de D-Cloprostenol no Dia 7. No Dia 8, foi aplicado benzoato de estradiol nas búfalas do Grupo 1 (0,5 mg, n = 5) e do Grupo 2 (1,0 mg, n = 5). No Dia 9, os animais receberam 25mg de Lecirelina (Controle, n = 5). Para mensuração das concentrações plasmáticas de LH foram colhidas amostras de sangue da veia jugular no Dia 7, e em seguida em intervalos de 3 horas até completar 72 horas após a aplicação de PGF_{2α}. Para avaliação da liberação de LH foram comparados os momentos de ocorrência do pico LH em relação à PGF_{2α}, as durações, as amplitudes e a área sob o pico de pré-ovulatório de LH. As búfalas dos Grupos Controle, 1 e 2 apresentaram picos pré-ovulatórios de LH em 51 ± 0,0 horas, 47,3 ± 2,7 horas e 47,0 ± 3,8 horas após a aplicação da PGF_{2α}, respectivamente (P > 0,05). A duração do pico de LH foi menor no Controle (7,8 ± 1,5 horas) do que nos Grupos 1 e 2 (10,5 ± 1,5 horas vs. 10,8 ± 2,4 horas, respectivamente; P < 0,05). A amplitude média dos picos pré-ovulatórios de LH foram de 4,5 ± 0,4 ng/mL, 4,0 ± 0,4 ng/mL e 4,3 ± 0,8 ng/mL para os Grupos Controle, 1 e 2, respectivamente (P > 0,05). A área sob o pico de LH no Controle (4,8 ± 0,7) foi menor do que as áreas dos Grupos 1 e 2 (8,8 ± 2,5 vs. 8,7 ± 2,2, respectivamente; P < 0,05). Em resumo, a aplicação de benzoato de estradiol proporcionou maior duração e área do pico pré-ovulatório de LH do que a administração de GnRH em protocolos Ovsynch em bubalinos.

Introdução

A eficiência de protocolos de sincronização da ovulação em bubalinos tem sido estudada por vários pesquisadores.^{1,2} Dentre os diversos protocolos de sincronização da onda folicular para realização da inseminação artificial em tempo fixo, o protocolo Ovsynch proporciona taxa de concepção em torno de 50% dos

animais tratados.^{1,3,4}

A aplicação de agonista de GnRH resulta na liberação de um pico de LH que promove a ovulação de folículo dominante.⁵ Com a ovulação, há emergência de uma nova onda de crescimento folicular¹ e um aumento nas concentrações de progesterona devido à formação de corpo lúteo. No Dia 7 do protocolo Ovsynch, preconiza-se a administração de PGF_{2α} para promover a

Palavras-chave:

LH. Sincronização da ovulação.
Heatsynch.
Ovsynch.
Búfalos.

luteólise.⁶ Uma segunda dose de GnRH é aplicada 48 horas após a administração de PGF_{2a} para melhorar a sincronização da ovulação e permitir que seja realizada a inseminação artificial em tempo fixo.²

Com a diminuição das concentrações de progesterona após a aplicação de PGF_{2a} é possível induzir a ovulação do folículo dominante com benzoato de estradiol.^{4,7} A utilização de benzoato de estradiol (Heatsynch) pode ser uma alternativa de protocolo de sincronização com menor custo do que o método Ovsynch tradicional.⁸ No entanto, a eficiência na indução do pico pré-ovulatório de LH após a aplicação de benzoato de estradiol ainda não está estabelecida em bubalinos. Desse modo, o objetivo desse estudo foi avaliar o padrão secretório de LH após a segunda aplicação de GnRH do protocolo Ovsynch ou após a administração de benzoato de estradiol no protocolo Heatsynch.

Material e Método

Animais e local do experimento

O experimento foi realizado durante o mês de junho (estação reprodutiva da espécie). Foram utilizadas 15 búfalas múltiparas da raça Mediterrâneo, em boa condição corporal (3,5 – escala de 1 a 5)⁹, com período pós-parto > 40 dias pertencentes ao setor de Bubalinocultura da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo. Durante o experimento, os animais foram mantidos a pasto (*Brachiaria decumbens*) e receberam suplementação mineral comercial *ad libitum*; as ordenhas eram realizadas todos os dias pela manhã (produção média/animal = 10 litros de leite) na presença dos bezerros, para facilitar a retirada do leite.

Delineamento Experimental

Exames ultra-sonográficos ovarianos foram realizados em todos os animais para verificação do *status* folicular e para proporcionar a divisão dos animais em três grupos homogêneos, de acordo com os diâmetros foliculares verificados no início do

experimento. Os quinze animais receberam 25 mg de Lecirelina (Gestran-Plus[®], Tecnopec, Brasil) no Dia 0, e de 150 mg de D-cloprostenol (Preloban[®], Intervet, Brasil) no Dia 7. No Dia 8, os animais do Grupo 1 receberam 0,5 mg de benzoato de estradiol, e os animais do Grupo 2 receberam 1,0 mg de benzoato de estradiol (Estrogin[®], Farmavet Produtos Veterinários Ltda., Brasil). No Dia 9, os animais do Grupo Controle receberam outra dose de 25mg de Lecirelina (Figura 1).

Exames ultra-sonográficos

Os exames ultra-sonográficos ovarianos foram realizados com aparelho do modelo Scanner 480 (*Pie Medical, Maastricht, Holanda*), com transdutores lineares de 5 e 7,5MHz. Os exames foram realizados no momento da primeira aplicação de GnRH, para verificar a presença de folículos > 8,0 mm. Outras duas avaliações ultra-sonográficas foram realizadas: no momento da administração da PGF_{2a} e na última aplicação hormonal - GnRH_{2a} ou benzoato de estradiol. Após a terceira aplicação hormonal, foram realizados exames ultra-sonográficos em intervalos de 6 horas, durante 48 horas para o Grupo Controle, ou 66 horas para os Grupos 1 e 2 para precisar o momento da ovulação e determinar a taxa de ovulação dos folículos (Figura 1). O desaparecimento dos folículos previamente identificados indicou a ocorrência da ovulação.¹⁰ Foi considerada ovulação sincronizada aquela ocorrida no intervalo de 12 horas - entre 24 e 36 horas após a segunda aplicação de GnRH, ou entre 36 e 48 horas após a administração de benzoato de estradiol.

Colheitas de sangue e mensuração das concentrações de LH e progesterona

Para a mensuração das concentrações plasmáticas de LH foram colhidas amostras de sangue no momento em que os animais receberam a aplicação de PGF_{2a}. Após o Dia 8, as colheitas de sangue foram realizadas em intervalos de 3 horas, até completar 72 horas após a aplicação da PGF_{2a} (Figura 1).

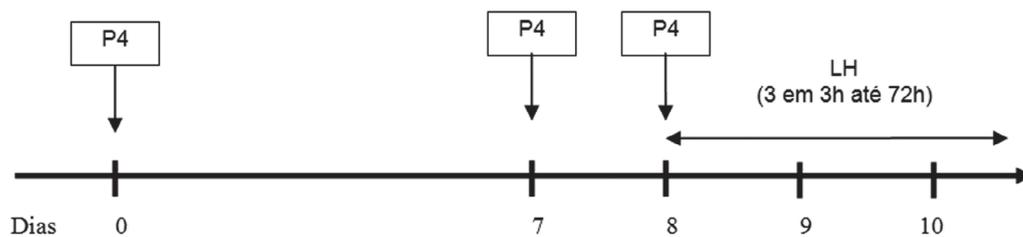


Figura 1 - Esquema das colheitas de sangue para a mensuração plasmática de LH e progesterona durante os protocolos de sincronização da ovulação em bubalinos (n = 15)

Para dosagem das concentrações plasmáticas de progesterona foram colhidas amostras de sangue nos Dias 0, 7 e 8 do tratamento (Figura 1).

As amostras de sangue foram colhidas da veia jugular, com o auxílio de tubos de ensaio Vacutainer® (Becton Dickinson, USA) com anticoagulante (heparina sódica). Para obtenção do plasma, os tubos foram centrifugados a 2900 X g por minuto durante 20 minutos. Após a centrifugação, a fração plasmática foi imediatamente transferida para tubos plásticos previamente identificados, e o conjunto foi congelado a -20°C para posteriores dosagens hormonais.

As concentrações de LH das amostras foram determinadas pela técnica de radioimunoensaio de duplo anticorpo utilizado para bovinos - adaptação da técnica

utilizada por Bolt e Rollings¹¹. Para a classificação do pico de LH adotou-se o critério utilizado por Fitzgerald et al.¹². O coeficiente de variação intra-ensaio foi de 6,8% (controle alto) e 14,8% (controle baixo). Para a validação do ensaio, amostras contendo altas concentrações de LH bubalino foram diluídas progressivamente para verificação do paralelismo. Optou-se por testar duas formas de diluição: a) PBS gel e; b) em soro bubalino contendo baixas concentrações de LH. Nos dois casos, as curvas de diluição acompanharam paralelamente a curva padrão (Figura 2). Para mensuração da concentração de progesterona foi adotado o método de radioimunoensaio (Coat-A-Count) recomendado pela *Diagnostic Product Corporation*, (DPC, Los Angeles, CA, USA). O coeficiente de variação intra-ensaio foi 1,8%.

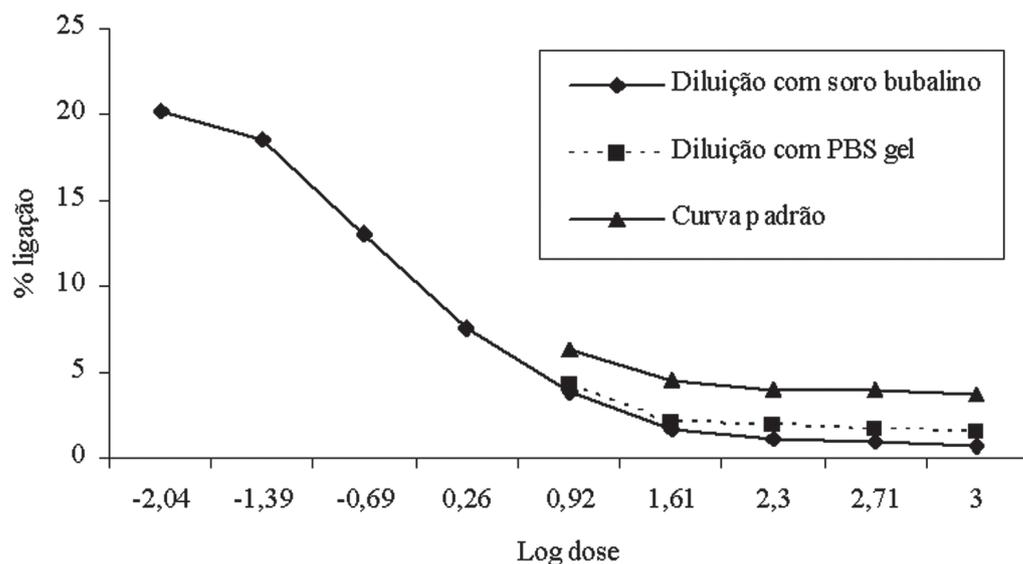


Figura 2 – Paralelismo da curva do ensaio padrão com a curva de diluição com soro bubalino ou PBS gel para dosagem das concentrações plasmáticas de LH em bubalinos. São Paulo - 2003

Análise estatística

As taxas de ovulação e a porcentagem de ovulação sincronizada após a terceira aplicação hormonal foram analisadas pelo teste de qui-quadrado. Os diâmetros foliculares, a concentração plasmática de progesterona, os momentos e as durações dos picos de LH, as médias das áreas sob o pico de LH e os momentos da ovulação foram avaliados por análise de variância. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey. A dispersão do momento da ovulação foi analisada pelo teste de Bartlett. Para calcular a área sob o pico de LH de cada animal utilizou-se o programa computacional Graphpad, versão 3.00 para Windows. Foi admitido o nível de 5% de significância para os testes realizados.

Resultados

Os resultados da dinâmica folicular indicaram que houve resposta ovariana aos tratamentos hormonais propostos. De maneira geral, os três grupos tratados continham o mesmo número de búfalas com folículos > 9,0mm de diâmetro no início do tratamento. Desse modo, os diâmetros foliculares no Dia 0 não diferiram entre os grupos ($P > 0,05$; Tabela 1). Na última aplicação hormonal, os animais possuíam diâmetros foliculares de $11,6 \pm 0,9$ mm para o Controle, $11,2 \pm 1,8$ mm para o Grupo 1

e $11,1 \pm 1,7$ mm para o Grupo 2 ($P > 0,05$).

Observou-se maior variação ($P < 0,01$) no intervalo entre a aplicação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e a ovulação no Grupo 1 - 42 a 84 horas - do que nos Grupos Controle e 2 - 72 a 80 horas e 66 a 78 horas, respectivamente (Tabela 1). Ainda, observou-se que os animais do Grupo 1 apresentaram menor porcentagem de ovulações sincronizadas do que aqueles dos Grupos Controle e 2 ($P < 0,01$; Tabela 1).

No Dia 0, as búfalas ($n = 15$) apresentaram concentrações plasmáticas de progesterona de $3,02 \pm 1,20$ ng/mL, $3,41 \pm 1,78$ ng/mL e $2,83 \pm 1,24$ ng/mL para os Grupos Controle, 1 e 2, respectivamente. No Dia 7, essas concentrações eram de $3,36 \pm 1,61$ ng/mL, $4,10 \pm 1,41$ ng/mL e $2,63 \pm 1,55$ ng/mL para os animais dos Grupos Grupos Controle, 1 e 2, respectivamente. No Dia 8 (24 horas após a aplicação de $\text{PGF}_{2\alpha}$), todos os animais apresentaram luteólise (redução das concentrações de progesterona para valores inferiores a 1ng/mL). Nesse dia, as concentrações plasmáticas de progesterona foram de $0,43 \pm 0,19$ ng/mL, $0,44 \pm 0,27$ ng/mL e $0,53 \pm 0,20$ ng/mL para os Grupos Controle, 1 e 2, respectivamente.

Ao mensurar as concentrações plasmáticas de LH observou-se que todos os tratamentos induziram pico de LH. Dos 15 animais tratados, apenas um (6,6%)

Tabela 1 – Avaliação da dinâmica folicular durante os protocolos Ovsynch e Heatsynch em bubalinos ($n = 15$) - São Paulo - 2003

Parâmetros	Controle	Grupo 1	Grupo 2
1ª aplicação hormonal			
Diâmetro do maior folículo no Dia 0 (mm)	$8,5 \pm 2,7$	$9,0 \pm 2,1$	$8,9 \pm 2,0$
2ª aplicação hormonal			
Diâmetro médio do maior folículo (mm)	$10,4 \pm 2,2$	$10,8 \pm 2,0$	$11,3 \pm 2,1$
3ª aplicação hormonal			
Diâmetro do maior folículo no Dia 8 (mm)	---	$11,2 \pm 1,8$	$11,1 \pm 1,7$
Diâmetro do maior folículo no Dia 9 (mm)	$11,6 \pm 0,9$	$11,3 \pm 1,1$	$11,0 \pm 0,7$
Intervalo entre a aplicação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e a ovulação (horas)	76,0	67,5	70,0
Desvio padrão do intervalo entre a aplicação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e a ovulação (horas)	3,0 ^a	12,3 ^b	4,2 ^a
Taxa de ovulação (%)	80,0 (4/5)	60,0 (3/5)	80,0 (4/5)
Ovulações sincronizadas (%)**	80,0 (4/5) ^c	40,0 (2/5) ^d	80,0 (4/5) ^c

() Razão entre o número de ocorrência e o número total de animais por Grupo

** Ovulações sincronizadas = Ovulações ocorridas em intervalo de 12 horas

a, b Diferença estatística na dispersão da ovulação ($P < 0,01$).

c, d Diferença estatística entre os Grupos ($P < 0,05$).

*** Para efeito de cálculo foi adotada a média \pm SD

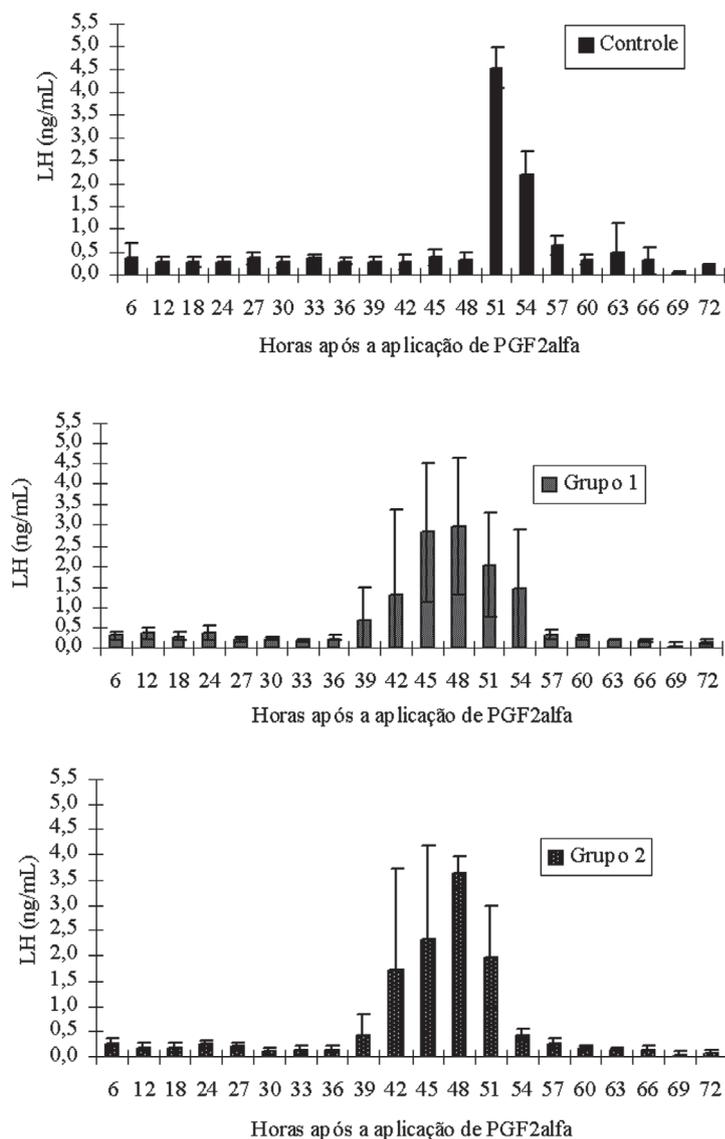


Figura 3 – Concentrações plasmáticas de LH (média + SD) após a aplicação de PGF_{2α} dos protocolos Ovsynch e Heatsynch em bubalinos (n = 5). São Paulo - 2003

Tabela 2 – Concentrações plasmáticas de LH (média + SD) após a aplicação de PGF_{2α} dos protocolos Ovsynch e Heatsynch em bubalinos (n = 15). São Paulo - 2003

Parâmetros	Controle	Grupo 1	Grupo 2
Intervalo entre o pico de LH e a aplicação de PGF _{2α} (horas) *	51,0 ± 0,0	47,3 ± 2,7	47,0 ± 2,3
Amplitude do pico de LH (ng/mL)**	4,5 ± 0,4	4,0 ± 0,4	4,3 ± 0,8
Duração do pico de LH (horas)***	7,8 ± 1,6 ^a	10,5 ± 1,7 ^b	10,8 ± 2,6 ^b
Área do pico de LH (ng/mL/horas)****	4,8 ± 0,7 ^c	8,8 ± 2,5 ^d	8,7 ± 2,2 ^d
Intervalo entre o pico de LH e a ovulação (horas) *****	23,3 ± 4,5	28,0 ± 3,5	27,8 ± 4,5

* Intervalo entre a aplicação de PGF_{2α} e a maior concentração de LH (h)
 ** Maior concentração de LH verificada após a aplicação de PGF_{2α} (ng/mL)
 *** Intervalo entre o início e término do pico de LH (h).
 **** Médias das áreas sob o pico de LH
 ***** Intervalo entre a maior concentração de LH e a ovulação (h)
 a, b Diferença estatística entre os Grupos (P < 0,05).
 c, d Diferença estatística entre os Grupos (P < 0,01).

ovulou 42 horas após a aplicação de PGF_{2a} sem que se detectasse o pico de LH. As búfalas do Grupo Controle, 1 e 2 apresentaram picos de LH em $51,0 \pm 0,0$ horas, $47,3 \pm 3,7$ horas e $47,0 \pm 2,6$ horas após a aplicação da PGF_{2a}, respectivamente (Tabela 2). A duração do pico de LH foi mais curta no Controle ($7,8 \pm 1,6$ horas) do que nos Grupos 1 ($10,5 \pm 1,7$ horas) e 2 ($10,8 \pm 2,6$ horas; $P < 0,05$; Tabela 2, Figura 3).

A amplitude média dos picos de LH não diferiu entre os tratamentos ($P > 0,05$; Figura 3). A média das áreas sob o pico de LH foi menor no Controle do que nos Grupos 1 e 2 ($P < 0,01$; Tabela 2). O intervalo entre o pico de LH e a ovulação nos Grupos Controle, 1 e 2 foram de $23,3 \pm 4,5$ horas, $28,0 \pm 3,5$ horas e $27,8 \pm 4,5$ horas, respectivamente ($P > 0,05$; Tabela 2).

Discussão

De maneira geral, a ovulação do folículo dominante após a primeira aplicação de GnRH do protocolo Ovsynch proporciona o surgimento de uma nova onda de crescimento folicular sincronizada.² No presente experimento, o diâmetro folicular das búfalas no Dia 0 e o aumento das concentrações plasmáticas de progesterona no Dia 7 foram sugestivos da boa resposta ovulatória após a primeira aplicação de GnRH dos protocolos. De acordo com Pursley, Mee e Wiltbank¹³, os folículos com diâmetros $\geq 8,0$ mm têm maior capacidade ovulatória, por apresentarem maior quantidade de receptores para LH nas células da granulosa Bodensteiner et al.⁵

Para Duffy et al.¹⁴, a alta porcentagem de folículos dominantes no dia da aplicação de PGF_{2a} pode garantir boas taxas de ovulação após a segunda aplicação de GnRH. A média dos diâmetros foliculares das búfalas no Dia 7 sugerem que tais animais estariam aptos a ovular após a última aplicação hormonal (GnRH vs. benzoato de estradiol).

Após a aplicação da PGF₂ as concentrações de progesterona diminuíram

para valores < 1 ng/mL. A boa resposta luteolítica ao tratamento com PGF_{2a} em bubalinos tem sido relatada por diferentes estudiosos.^{3,6,15}

A indução do pico de LH com a aplicação de benzoato de estradiol durante o proestro¹⁶ ou 24 horas após a aplicação de PGF_{2a}¹⁷ tem sido relatada na espécie bovina. No presente experimento, 80% (4/5) dos animais do Grupo 1 e 100% (5/5) das búfalas do Grupo 2 apresentaram picos de LH após a aplicação de benzoato de estradiol.

O intervalo entre a PGF_{2a} e o pico de LH relatado por Evans et al.¹⁷ em bovinos tratados com benzoato de estradiol ($53,8 \pm 2,0$ horas) foi semelhante ao encontrado nas búfalas desse experimento. De acordo com os autores citados, esse intervalo é semelhante ao de um ciclo estral padrão. Em relação ao momento do pico de LH do Grupo Controle, os resultados encontrados neste experimento também são semelhantes aos achados em bovinos por Chenault et al.¹⁸ e Yamada et al.¹⁹.

Os relatos sobre a amplitude do pico pré-ovulatório de LH no ciclo estral de bubalinos são controversos. Kumar, Jindal e Rattan²⁰ relataram valores de $11,65 \pm 0,25$ ng/mL. Porto-Filho²¹ reportou amplitude do pico de LH de $45,8 \pm 11,9$ ng/mL - variação de $35,8$ ng/mL a $62,4$ ng/mL - após a aplicação de PGF₂. No presente experimento, as amplitudes médias dos picos de LH não apresentaram valores tão altos. Esse fato pode ter ocorrido pela utilização de anticorpo bovino para a mensuração de LH bubalino nas amostras colhidas. Por outro lado, os valores observados indicam que tratamentos com GnRH ou benzoato de estradiol induziram picos de LH de amplitudes semelhantes.

Segundo Thatcher et al.⁷, a duração do pico de LH após a aplicação de cipionato de estradiol é de aproximadamente 10 horas, superior à duração dos picos induzidos pela aplicação de GnRH em bovinos. Neste estudo esse fato também foi observado. A duração do pico de LH foi mais curta nas búfalas do Controle do que nos

animais dos Grupos 1 e 2. Em adição, as búfalas tratadas com benzoato de estradiol apresentaram duração do pico de LH semelhante ao relatado por Kumar, Jindal e Rattan²⁰ durante o ciclo estral de novilhas bubalinas. Estudando vacas nelore, Barros et al.²² observaram que a taxa de sincronização de protocolos Ovsynch e Heatsynch foram semelhantes (60 a 72 horas após a aplicação de PGF_{2a}). Da mesma forma que em bovinos, as búfalas do Controle e do

Grupo 2 obtiveram a mesma taxa de ovulação e sincronização. Assim, os dados obtidos neste experimento indicam que a aplicação de benzoato de estradiol pode ser uma opção viável nos protocolos de sincronização da ovulação, uma vez que este promove satisfatória indução do pico pré-ovulatório de LH, bem como confere semelhantes taxas de sincronização da ovulação quando comparado ao protocolo Ovsynch.

Evaluation of lh surge and progesterone concentration in ovsynch and heatsynch protocols in buffalo (*Bubalus bubalis*)

Abstract

The objective of this study was to evaluate the LH surge after last hormonal injection of synchronization of ovulation protocols in buffalo. Fifteen multiparous buffaloes received 25 mg of Lecirelin in Day 0, and 150 mg of D-Cloprostenol on Day 7. On Day 8, estradiol benzoate was injected in Group 1 (0.5 mg, n = 5) and Group 2 (1.0 mg, n = 5). On Day 9, five buffaloes received 25 mg of Lecirelin (Control). Blood samples were collected for measure the LH concentrations on Day 7 and then every 3 hours until 72 hours after the PGF_{2a} injection. For evaluation of LH surge were compared the interval between PGF_{2a} injection to LH surge, duration, amplitude and area under the LH peak. The LH surge occurred 51.0 ± 0.0 hours, 47.3 ± 2.7 hours and 47.0 ± 3.8 hours after PGF_{2a} injection for Control, Group 1 and Group 2, respectively (P > 0.05). The duration of LH peak in Control (7.8 ± 1.5 hours) was shorter than Groups 1 and 2 (10.5 ± 1.5 hours vs. 10.8 ± 2.4 hours, respectively; P < 0.05). The amplitudes of LH peak were 4.5 ± 0.4 ng/mL, 4.0 ± 0.4 ng/mL and 4.3 ± 0.8 ng/mL for Control, Group 1 and Group 2, respectively (P > 0.05). The area under LH peak for Control (4.8 ± 0.7) was smaller than the areas of the Groups 1 and 2 (8.8 ± 2.5 vs. 8.7 ± 2.2, respectively; P < 0.05). In summary, the estradiol benzoate injection provided higher duration and area of LH peak than GnRH injection in Ovsynch protocol in buffalo.

Key words:

LH.
Synchronization of ovulation.
Heatsynch.
Ovsynch.
Buffalo.

Referências

- 1 BARUSELLI, P. S. et al. Synchronization of ovulation for fixed timed insemination in buffalo (*Bubalus bubalis*). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, p. 431-442, 2003.
- 2 BERBER, R. C. A.; SILVA, M. A.; CARDOSO, M. J. L. Synchronization of ovulation using Ovsynch protocols in bovine and buffalo. A review. **Bioscience Journal**, v. 18, p. 103-120, 2002.
- 3 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**, v. 57, p. 1421-1430, 2002.

- 4 BERBER, R. C. A. et al. Effect of lactation and body condition score in synchronization of ovulation protocols for fixed timed insemination in buffalo (*Bubalus bubalis*). **The Indian Veterinary Journal**, v. 82, p. 45-47, 2005.
- 5 BODENSTEINER, K. J. et al. Synchronization of emergence of follicular wave in cattle. **Theriogenology**, v. 45, p. 1115-1128, 1996.
- 6 BARUSELLI, P.S. et al. Evaluation of half dose of prostaglandin F2a in synchronization of ovulation

- protocol for fixed timed insemination in buffalo (*Bubalus bubalis*). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, p. 397-402, 2003.
- 7 THATCHER, W. W. et al. Strategies to optimize reproductive efficiency by regulation of ovarian function. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, p. 243-254, 2002.
- 8 FERNANDES, P. et al. Timed artificial insemination in beef cattle using GnRH agonist, PGF₂alpha and estradiol Benzoate (EB). **Theriogenology**, v. 55, p. 521-532, 2001.
- 9 BARUSELLI, P. S. et al. 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: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1995. p.380.
- 10 NASSER, L. F. et al. Ovarian superovulatory response relative to follicular wave emergence in heifers. **Theriogenology**, v. 40, p. 713-724, 1993.
- 11 BOLT, D. J.; ROLLINGS, R. Development and application of a radioimmunoassay for bovine FSH. **Journal of Animal Science**, v. 56, n. 1, p. 146-154, 1983.
- 12 FITZGERALD, B. P. et al. Changes in pattern of luteinizing hormone secretion before and after the first ovulation in the postpartum mare. **Biology of Reproduction**, v. 33, p. 316-323, 1985.
- 13 PURSLEY, J. R.; MEE, M. O.; WILTBANK, M. C. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF₂alpha and GnRH. **Theriogenology**, v. 44, p. 915-923, 1995.
- 14 DUFFY, P. et al. Effect of exogenous LH pulses on the fate of the first dominant follicle in postpartum beef cows nursing calves. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 118, p. 9-17, 2000.
- 15 BRITO, L. F. C. et al. Efficacy of PGF_{2a} to synchronize estrus in water buffalo cows (*Bubalus bubalis*) is dependent upon plasma progesterone concentration, corpus luteum size and ovarian follicular status before treatment. **Animal Reproduction Science**, v. 16, p. 23-35, 2002.
- 16 HANLON, D. W. et al. The effect of estradiol benzoate administration on estrous response and synchronized pregnancy rate in dairy heifers after treatment with exogenous progesterone. **Theriogenology**, v. 45, p. 775-785, 1996.
- 17 EVANS, A. C. O. et al. Effect of oestradiol benzoate given after prostaglandin at two stages of follicle wave development on oestrus synchronization, the LH surge and ovulation in heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 76, p. 13-23, 2003.
- 18 CHENAULT, J. R. et al. LH and FSH response of Holstein heifers to fertirelin acetate, gonadorelin and buserelin. **Theriogenology**, v. 34, p. 81 - 84, 1990.
- 19 YAMADA, K. et al. Influence of GnRH analogue (fertirelin acetate) doses on synchronization of ovulation and fixed-time artificial insemination in lactating dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 74, p. 27-34, 2002.
- 20 KUMAR, R.; JINDAL, R.; RATTAN, P. J. S. Plasma hormonal profiles during oestrous cycle of murrha buffalo heifers. **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 61, n. 4, p. 382-385, 1991.
- 21 PORTO-FILHO, R. M. **Emprego da radiotelemetria na detecção do estro em fêmeas bubalinas**: luteólise durante duas fases do ciclo estral, ultra-sonografia da ovulação e perfis hormonais. 2000. 112 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.
- 22 BARROS, C. M. et al. Synchronization of ovulation in beef cows (*Bos indicus*) using GnRH, PGF_{2a} and estradiol benzoate. **Theriogenology**, v. 53, p. 1121-1134, 2000.
- 23 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.