

**Uso da radiotelemetria para detecção do estro em fêmeas búfalas:
luteólise durante duas fases do ciclo estral, ultra-sonografia da
ovulação e perfis hormonais**

**The use of radiotelemetry for the detection of the oestrus in female
buffalo: luteolysis during two phases of the oestrous cycle,
ultrasonography of ovulation and hormonal profiles**

PORTO-FILHO, R.M.¹, BARUSELLI, P.S.², MADUREIRA, E.H.²

RESUMO

Doze novilhas búfalas foram sincronizadas com prostaglandina (PGF_{2α}) e mantidas sob detecção do estro através da radiotelemetria. Os animais foram divididos em dois grupos, dependendo do período do ciclo estral no qual o tratamento com PGF_{2α} foi realizado (antes e depois do D-10; D-0=estro), e mantidos com duas fêmeas búfalas androgênizadas. As ovulações foram verificadas por exames ultra-sonográficos (realizados a intervalos de 6 horas após o início do estro). Níveis de progesterona (P4) foram determinados no dia da aplicação da PGF_{2α}, no D-0 e no D-5. Os níveis de estradiol e LH foram detectados em 4 novilhas submetidas a coletas de sangue a intervalos de uma hora, iniciando 24 horas depois aplicação de PGF_{2α} e seguindo até a constatação da ovulação. O sistema de radiotelemetria apresentou eficiência de 90% (n=45/50) na detecção do estro. Somente 5 búfalas não foram detectadas em estro mas apresentaram ovulação. A duração do estro (11,8 ± 5,6h), o intervalo entre o início (30,0 ± 4,9h) e o final (17,9 ± 4,1h) do estro e a ovulação, o número de montas (24,6 ± 18,2), a duração de cada monta (3,6 ± 0,7seg.) e a duração total das montas durante o estro (94,2 ± 80,7seg.), não diferiram (P>0,05) entre os tratamentos com PGF_{2α}. Entretanto, o intervalo entre PGF_{2α}-início do estro (40,7 ± 10,9h vs. 56,7 ± 12,8h) e PGF_{2α}-ovulação (70,0 ± 11,3h vs. 85,6 ± 12,5h), foi menor (P<0,05) para animais tratados antes do D-10. A detecção da primeira monta (início do estro) e o total de montas apresentou distribuição homogênea durante o dia (24 horas). O diâmetro máximo do folículo ovulatório foi 13,7 ± 0,12mm, com taxa de crescimento de 1,6 ± 0,8mm/dia, não diferiram entre os grupos (P>0,05). Os níveis de P4 foram 3,82 ± 1,46ng/ml, 0,26 ± 0,09ng/ml e 1,38 ± 0,16ng/ml, respectivamente para o dia do tratamento com PGF_{2α}, D-0 e D-5. Búfalas tratadas antes do D-10 apresentaram níveis de P4 menores no dia da aplicação da PGF_{2α} (2,79 ±

¹ Curso de Medicina Veterinária do Centro Regional Universitário de Espírito Santo do Pinhal - UNIPINHAL, São Paulo, Brasil.

² Department of Animal Reproduction, Medicine college of Veterinary São Paulo University, São Paulo, Brasil.

Correspondence and reprint request: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Cidade Universitária, São Paulo, Brasil, 05340-000; e-mail: rporto@rantac.com.br / barusell@usp.br

0,98ng/ml vs. $4,85 \pm 1,26$ ng/ml; $P < 0,05$). Todos os animais (100%) apresentaram níveis de P4 menores que 1,0ng/ml no dia do estro. Os intervalos entre aplicação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e a concentração máxima (pico) de LH, entre o início do estro e o pico de LH e entre o pico de LH e a ovulação foram $45,6 \pm 10,8$ h, $3,6 \pm 3,4$ h e $25,6 \pm 2,6$ h, respectivamente. O pico de LH foi $45,8 \pm 11,9$ ng/ml, variando entre 35,8ng/ml até 62,4ng/ml. A concentração máxima de estradiol foi $8,9 \pm 1,7$ pg/ml, variando entre 7,2pg/ml até 10,9pg/ml.

Palavras chaves: Telemetria, búfalos, prostaglandina, sincronização, estro.

ABSTRACT

Twelve buffalo heifers were synchronized with prostaglandin ($\text{PGF}_{2\alpha}$) and were kept under detection of oestrus through radiotelemetry. The animals were divided in two groups depending on the period of the oestrous cycle when the treatment with $\text{PGF}_{2\alpha}$ was performed (before and after D-10; D-0 = oestrus), and were put in the presence of two testosterone-primed-buffalo female. The ovulations were followed by ultrasonography (every 6 hours after the beginning of the oestrus). Levels of progesterone (P4) were determined on day of application of $\text{PGF}_{2\alpha}$, in D-0 and D-5. The levels of oestradiol and luteinising hormone (LH) were detected in four heifers submitted to blood collection every hour, beginning 24 hours after the application of $\text{PGF}_{2\alpha}$ until ovulation. The system of radiotelemetry showed efficiency of 90% ($n=45/50$) in the detection of oestrus. Only five female were not detected in oestrus, but presented normal ovulation. The duration of oestrus ($11,8 \pm 5,6$ h), the interval between beginning ($30,0 \pm 4,9$ h) and end ($17,9 \pm 4,1$ h) of oestrus and ovulation, the number of mounts ($24,6 \pm 18,2$), the duration of each mount ($3,6 \pm 0,7$ seg.) and the duration of mounts per oestrus ($94,2 \pm 80,7$ seg.), not differed ($P > 0,05$) between the treatments with $\text{PGF}_{2\alpha}$. However, the interval between $\text{PGF}_{2\alpha}$ -beginning of oestrus ($40,7 \pm 10,9$ h vs. $56,7 \pm 12,8$ h) and $\text{PGF}_{2\alpha}$ -ovulation ($70,0 \pm 11,3$ h vs. $85,6 \pm 12,5$ h), was lower ($P < 0,05$) for animals treated before D-10. The detection of the first mount (beginning of oestrus) and the total of mounts showed homogeneous distribution during the day. The maximum diameter of the ovulatory follicle was $13,7 \pm 0,12$ mm, with growth rate of $1,6 \pm 0,8$ mm/day, not differing between groups ($P > 0,05$). The levels of P4 were $3,82 \pm 1,46$ ng/ml, $0,26 \pm 0,09$ ng/ml and $1,38 \pm 0,16$ ng/ml, respectively to the day of treatment with $\text{PGF}_{2\alpha}$, D-0 and D-5. Buffaloes treated before D-10 showed lower levels of P4 on day of application of $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($2,79 \pm 0,98$ ng/ml vs. $4,85 \pm 1,26$ ng/ml; $P < 0,05$). All animals (100%) showed levels of P4 lower than 1,0ng/ml during the day of oestrus. Intervals between injection of $\text{PGF}_{2\alpha}$ and the maximum concentration (peak) of LH, between the beginning of oestrus and the peak of LH and between the peak of LH and ovulation were $45,6 \pm 10,8$ h, $3,6 \pm 3,4$ h and $25,6 \pm 2,6$ h, respectively. The peak of LH was $45,8 \pm 11,9$ ng/ml, varying between 35,8ng/ml to 62,4ng/ml. The maximum concentration (peak) of oestradiol was $8,9 \pm 1,7$ pg/ml, varying between 7,2pg/ml to 10,9pg/ml.

Key words: Telemetry, buffaloes, prostaglandins, synchronization, oestrus.

INTRODUÇÃO

A espécie bubalina vem se tornando fonte viável de produção de proteína de origem animal. Na atualidade, o búfalo é comprovadamente um animal que apresenta boas aptidões e fácil adaptação em diferentes regiões do mundo (4). A população bubalina mundial é estimada em aproximadamente 170 milhões de cabeças, das quais 100 milhões encontram-se no Continente Indiano (18). No Brasil, estima-se rebanho de aproximadamente 1,3 milhões de animais que apresentaram, nos últimos 40 anos, crescimento populacional de 1905% (18), demonstrando a adaptabilidade da espécie às nossas condições e as possibilidades futuras da bubalinocultura como atividade emergente no País.

Entretanto, para que os índices produtivos sejam satisfatórios, os animais devem apresentar boa eficiência reprodutiva (4). Dentre os fatores que interferem na eficiência reprodutiva da espécie, a detecção do estro é o que mais se destaca, devido à discricção da sintomatologia e à necessidade de pessoal capacitado para executar esta tarefa (4, 29, 33, 5, 50). Assim, o uso de biotecnologias reprodutivas, como a inseminação artificial e a transferência de embriões, torna-se limitado devido às citadas dificuldades e às características comportamentais da espécie (27).

Com o intuito de aumentar a produtividade de carne e de leite, programas de melhoria genética – que utilizem biotecnologias – devem ser implementados nos rebanhos bubalinos brasileiros. Porém, as dificuldades no entendimento das características reprodutivas peculiares à espécie, e a variabilidade dos resultados encontrados na literatura, forçam os pesquisadores a incrementar os estudos sobre tais animais. Assim, o objetivo deste trabalho é obter maior compreensão dos fenômenos reprodutivos, comportamentais e fisiológicos, característicos da espécie bubalina.

MATERIAL E MÉTODOS

Local do Experimento

O experimento foi realizado no Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, localizado no Campus de Pirassununga-SP (latitude 21^o 59' Sul, longitude 47^o 26' Oeste), Sudeste do Brasil, no período de abril a julho de 1998. As temperaturas máxima e mínima no período de realização do experimento foram, em média, de 24,7 ± 2,1°C e 11,1 ± 2,7°C, respectivamente, e a temperatura média foi de 17,1 ± 1,7°C. A umidade relativa do ar foi, em média, de 80,8 ± 6,3%.³

³ Dados fornecidos pelo Laboratório de Solos do Departamento de Ciências Agrárias da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo

Animais

Foram utilizadas doze novilhas búfalas da raça Mediterrâneo com idades entre 24 e 30 meses, alimentadas a pasto, apenas com suplementação mineral, porém mantidas em boa condição corporal. Foram utilizadas duas fêmeas androgenizadas para auxiliar na detecção do estro.

Instalação do Sistema de Radiotelemetria

Durante a segunda quinzena de abril de 1998, todos os animais passaram por exame clínico reprodutivo completo, inclusive avaliação ultrassonográfica, para detecção de possíveis patologias que pudessem interferir no desenvolvimento da pesquisa. Nesse mesmo período foi aplicado proprionato de testosterona⁴ nas duas fêmeas utilizadas para auxiliar na detecção do estro. Concomitantemente, foram instalados todos os equipamentos referentes ao sistema de radiotelemetria, o qual baseia-se na detecção do comportamento básico de uma fêmea em estro que é a aceitação de monta.

Cada fêmea teve um sensor fixado (colado) na região posterior (garupa) junto com uma bolsa a prova d'água que, através da pressão exercida pela monta, envia um sinal de radio captado por uma antena fixada no pasto. A antena consegue captar os sinais emitidos pelos sensores em uma área de 400mts de diâmetro. Os sinais são enviados para uma central de armazenamento (*buffer*) conectada a um computador, no qual, as informações captadas são analisadas por um software específico identificando a data (dia, mês e ano), o momento (hora e minuto) e a duração de cada monta. Neste experimento o sistema foi regulado para determinar o início de estro quando ocorressem no mínimo duas montas no período de uma (01) hora, com duração \geq a 2 segundos. O final do estro foi determinado pela ocorrência de intervalo \geq que 4 horas entre uma monta e outra. A eficiência e a acurácia do sistema de radiotelemetria foi confirmada pela detecção do folículo ovulatório através de exames ultrassonográficos e pela concentração plasmática de progesterona.

Classificação dos Estros

Os estros foram classificados como sendo de alta (\geq 1,5 montas/hora) ou baixa intensidade ($<$ 1,5 monta/hora) e como sendo de curta ($<$ 7 horas) ou longa duração (\geq 7 horas; 17).

Os estros foram divididos conforme o período do dia, segundo sua manifestação (início do estro), em manhã (6:01h a 12:00h), tarde (12:01h a 18:00h), noite (18:01h a 00:00h) e madrugada (00:01h a 6:00h). As fêmeas que não apresentaram comportamento de monta durante os horários de observação visual tradicional (entre 6:00h e 8:00h e entre 17:00h e 19:00h), também foram analisadas.

⁴ Durateston®

As montas foram divididas quanto ao momento de manifestação, de acordo com o período do dia, em manhã (6:01h a 12:00h), tarde (12:01h a 18:00h), noite (18:01h a 00:00h) e madrugada (00:01h a 6:00h) e também foram divididas durante as 24 horas do dia.

Exames Ultra-Sonográficos

Os exames ultra-sonográficos foram realizados pela técnica transretal, com o auxílio de sonda linear de 5.0mhz⁵. Um primeiro exame foi conduzido 12 horas após o início do estro. Após a realização deste primeiro exame, os animais foram avaliados a intervalos de 6 horas. Durante os exames ultra-sonográficos, os folículos foram medidos para o acompanhamento da dinâmica de crescimento folicular durante o período estral e a determinação do diâmetro máximo do folículo ovulatório. O desaparecimento dos folículos anteriormente identificados ($\geq 1,0\text{cm}$) foi indicativo de ovulação. O horário da ovulação foi estabelecido como a hora intermediária entre o penúltimo e o último exame, no qual foi diagnosticada a ovulação.

Aplicação da Prostaglandina

Com a finalidade de sincronizar todos os animais, foi realizada simultaneamente uma primeira aplicação de prostaglandina⁶ de 15mg/IM (2,0ml). Em seguida, as novilhas foram divididas em dois grupos de tratamento com prostaglandina (antes do D-10: D-6 a D-9, e depois do D-10: D-11 a D-14; D-0 = estro). Os grupos foram alternados entre si, sendo que aquelas novilhas que receberam a aplicação antes do D-10, passaram a recebê-la depois do D-10, e vice-versa.

Coleta de Sangue e Análise Hormonal

Para análise da progesterona, o sangue foi colhido nos dias 0 (estro), 5 e no dia da aplicação da prostaglandina (antes e depois do D-10). O sangue foi colhido por punção da veia jugular com agulha 40/16 descartável, em tubos de 10ml com anticoagulante (EDTA). Os testes para detecção dos níveis plasmáticos de progesterona foram realizados por radioimunoensaio em fase sólida⁷.

Para detectar os perfis de LH e estradiol durante a fase estral, foram selecionados 4 animais mantidos em colheita de sangue 24 horas após a aplicação de prostaglandina, com intervalo de 1 hora entre as colheitas, até que fosse verificada a ovulação por ultra-sonografia. As colheitas foram feitas por punção da veia jugular utilizando tubos a vácuo de 10ml⁸ com anticoagulante (EDTA). As dosagens para LH e estradiol foram realizadas na Universidade de Bologna-Itália.

⁵ Aloka SSD500 micrus®

⁶ Prosolvin® - Iuprostitol

⁷ Coat-a-Count®-Progesterone Diagnosis Products Co.

⁸ Vacutainer-Becton Dickinson and Company, USA

As concentrações plasmáticas de LH foram determinadas pelo método de anticorpo duplo heterólogo. Esta técnica utiliza anti-soro de coelho para LH bovino (NIH-LH-B10) em diluição final de 1:200.000. O ponto de balanço foi de 540pg/tubo, e a sensibilidade (90%, B/B₀) de 55pg/tubo. Os coeficientes de variação intra-ensaio e inter-ensaio foram 9,7% e 13,8%, respectivamente. As concentrações de estradiol foram determinadas pela técnica de radioimunoensaio específico (40, 8, 41).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado (31) com dois tratamentos, correspondendo à aplicação de prostaglandina na fase inicial (antes do D-10) e final (depois do D-10) do ciclo estral. As variáveis contínuas foram analisadas pelo programa computacional Statistical Analysis System⁹ (38), sendo anteriormente verificada a normalidade dos resíduos pelo Teste de SHAPIRO-WILK¹⁰. Os dados (variável dependente) que não atenderam a estas premissas foram submetidos à transformação logarítmica [Log(X+1)] ou pela raiz quadrada [RQ(X+1/2)]. Os dados originais ou transformados, quando este último procedimento foi necessário, foram submetidos à análise de variância pelo teste "T"¹¹, utilizando a probabilidade corrigida para variâncias não homogêneas quando esta premissa não foi satisfeita. Os dados de frequência (resposta binária) foram analisados pelo teste de χ^2 ¹². Adotou-se um nível de significância de 5% para todos os testes realizados.

RESULTADOS

Em 50 estros induzidos com prostaglandina em diferentes fases do ciclo estral, a técnica de radiotelemetria apresentou eficiência de 90%, (n=45) com 100% de acurácia. Esta técnica não detectou 5 estros os quais, aparentemente, não apresentaram nenhuma manifestação de monta.

Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos (antes e depois do D-10) quanto a: duração do estro, intervalo de tempo entre o início e o final do estro e a ovulação, número de montas, duração de cada monta e duração total das montas nos estros detectados por radiotelemetria (Tab.1).

A duração do estro foi de $11,0 \pm 5,3$ h para búfalas tratadas antes do D-10, e de $13,7 \pm 5,9$ h para aquelas tratadas depois do D-10 (P > 0,05). A duração média do estro, independentemente do dia do tratamento, foi de $11,8 \pm 5,6$ h. Foi observada grande variação com relação à duração dos estros (1h a 25h) mesmo dentro de um mesmo grupo de tratamento.

De todos os estros detectados pelo sistema de radiotelemetria, 57,8% foram classificados como de alta intensidade e longa duração, e 17,8% alta intensidade, porém curta duração (Tab.2). Tais resultados são indicativos de

⁹ SAS Institute Inc., 1985

¹⁰ Proc Univariate do SAS

¹¹ Proc Test do SAS

¹² Proc Freq do SAS

que 75,6% dos estros foram de alta intensidade. Apenas 2,2% dos estros foram de baixa intensidade e curta duração, e 22,2% de baixa intensidade e longa duração. Dentro desse contexto, apenas 8,9% dos estros (n = 4/45) ocorreram em horários nos quais passariam despercebidos em esquemas de detecção de estro tradicionais (observação visual; entre 6:00h e 8:00h e entre 17:00 e 19:00h).

A detecção da primeira monta apresentou distribuição homogênea de acordo com o período do dia, porém 35,7% dos estros induzidos depois do D-10 foram detectados no período da tarde.

TABELA 1 - Detecção do estro em búfalas, induzido com prostaglandina em diferentes fases do ciclo estral (antes e depois do D-10), por radiotelemetria, e detecção da ovulação por ultra-sonografia, Pirassununga - 1998

	Antes do D-10	Depois do D-10	Média
Duração do estro (h)	11,0 ± 5,3(31)*	13,7 ± 5,9 (14) *	11,8 ± 5,6 (45)*
Início do estro-ovulação (h)	29,3 ± 4,9 (31)	31,6 ± 4,4 (13) ***	30,0 ± 4,9 (44)
Final do estro-ovulação (h)	17,7 ± 3,7 (30) **	18,4 ± 5,1 (13) ***	17,9 ± 4,1 (43)
Número de montas por estro	23,0 ± 15,6 (31)	28,2 ± 23,2 (14)	24,6 ± 18,2 (45)
Duração da monta (seg.)	3,7 ± 0,7 (31)	3,5 ± 0,8 (14)	3,6 ± 0,7 (45)
Duração total das montas(seg.)	89,9 ± 75,3 (31)	103,7 ± 93,0 (14)	94,2 ± 80,7 (45)

() Os números entre parênteses representam o número de estros observados.

* Em cinco estros não foram detectados comportamento de monta, dois antes do D-10 e três depois do D-10.

** Um dos valores observados foi retirado da análise estatística por caracterizar-se como um dado discrepante.

***Uma ovulação não foi detectada.

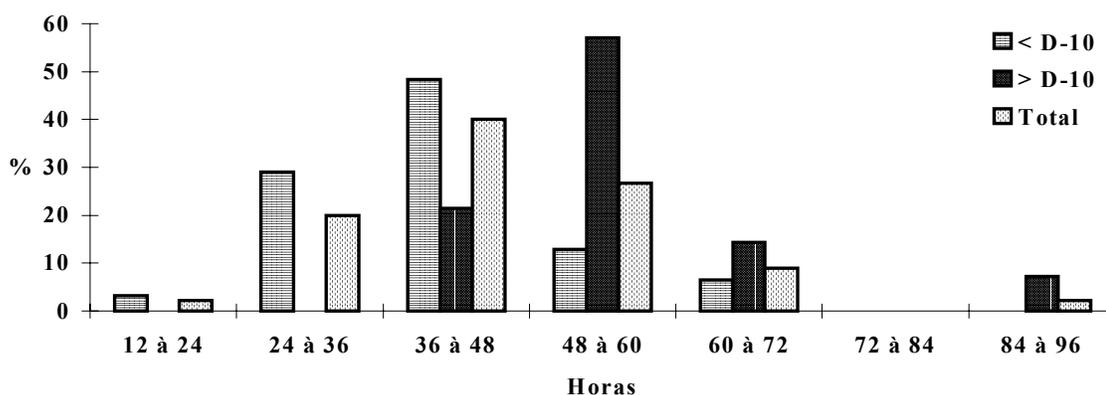
TABELA 2 - Distribuição dos estros em búfalas, detectados por radiotelemetria, quanto à intensidade e à duração, Pirassununga – 1998.

Classificação	Distribuição
Baixa intensidade e curta duração	2,2% (1/45) *
Baixa intensidade e longa duração	22,2% (10/45)
Alta intensidade e curta duração	17,8% (8/45)
Alta intensidade e longa duração	57,8% (26/45)
TOTAL	100% (45/45)

*Em cinco estros não foi detectado comportamento de monta.

Nas fêmeas tratadas antes do D-10, a maioria dos estros iniciou entre 24 e 48 horas (77,4%) e nas fêmeas tratadas depois do D-10, a maioria dos estros iniciou-se entre 36 e 60 horas (78,5%; Gráf.1). O intervalo para a detecção da ovulação após a aplicação da prostaglandina nos estros induzidos antes do D-10 concentrou-se entre 48 e 84 horas (87,9%) e, naqueles induzidos depois do D-10, a maior concentração ocorreu entre 60 e 96 horas (87,4%).

A fase do ciclo estral na qual foi aplicada a prostaglandina interferiu ($P < 0,05$) no intervalo entre a manifestação do estro e a ocorrência da ovulação (Tab.3). As novilhas tratadas antes do D-10 manifestaram estro e ovulação $40,7 \pm 10,9h$ e $70,0 \pm 11,3h$, respectivamente. Já as novilhas tratadas após o D-10 apresentaram intervalo entre a aplicação da



prostaglandina e o estro de $56,7 \pm 12,8h$, e entre a aplicação de prostaglandina e a ovulação, de $85,6 \pm 12,5h$. Os intervalos médios para o aparecimento do estro e a detecção da ovulação após a aplicação da prostaglandina, independentemente do dia do tratamento, foram $45,7 \pm 13,6h$ e $75,1 \pm 13,7h$, respectivamente.

GRÁFICO 1-Distribuição das frequências observadas para o início do estro em búfalas, detectado por radiotelemetria, após a aplicação de prostaglandina em diferentes fases do ciclo estral (antes e depois do D-10). Pirassununga, 1998.

TABELA 3 - Intervalos entre aplicação de prostaglandina (antes e depois do D-10) e o início do estro, detectado por radiotelemetria, e a ovulação, detectada por ultra-sonografia, em búfalas, Pirassununga – 1998.

	Antes do D-10	Depois do D-10	Média
PG-estro (h)	40,7 ± 10,9 (31) ^a *	56,7 ± 12,8 (14) * ^b	45,7 ± 13,6
PG-ovulação (h)	70,0 ± 11,3 (33) ^a	85,6 ± 12,5 (16) ** ^b	75,1 ± 13,7

(a ≠ b; P < 0,05)

() Os números entre parênteses representam o número de estros observados.

* Em cinco estros não foi detectado comportamento de monta, dois antes do D-10 e três depois do D-10.

** Uma das ovulações não foi detectada.

O sistema de radiotelemetria detectou 1108 eventos de monta, sendo que o número médio de montas por estro foi de 24,6 ± 18,2. A duração de cada monta foi, em média, de 3,6 ± 0,7 segundos, com duração total das montas por estro de 94,2 ± 80,7 segundos. Os tratamentos com prostaglandina não ofereceram diferença significativa para duração individual e total das montas (P > 0,05). Foi observada variação de 8 a 373 segundos para a duração total das montas por estro. A duração individual das montas variou de 2 a 5,5 segundos.

A distribuição das montas durante as 24 horas do dia não apresentou diferença significativa (P > 0,05; Tab.4). Fêmeas tratadas com prostaglandina antes do D-10 apresentaram distribuição nas montas de 27,1% (n=193/713), 22,6% (n=161/713), 23,8% (n= 170/713) e 26,5% (n=189/713) nos períodos da manhã, tarde, noite e madrugada, respectivamente. As fêmeas tratadas depois do D-10 apresentaram 23,5% (n=93/395), 19,2% (n=76/395), 26,3% (n=104/395) e 30,9% (n=122/395) nos mesmos períodos, respectivamente. A distribuição das montas durante as 24 horas do dia foi uniforme, sendo observado apenas pequeno aumento entre 04:00 e 08:00 horas e entre 22:00 e 02:00 horas (Gráf.2).

TABELA 4 - Distribuição (%) total das montas detectadas por radiotelemetria em búfalas com o estro induzido com prostaglandina em diferentes fases do ciclo estral (antes e depois do D-10), Pirassununga - 1998

Montas	Antes do D-10	Depois do D-10	TOTAL
Manhã (6:01 às 12:00h)	27,8% (193/713)	23,5% (93/395)	25,8% (286/1108)
Tarde (12:01 às 18:00h)	22,6% (161/713)	19,2% (76/395)	21,4% (237/1108)
Noite (18:01 às 00:00h)	23,8% (170/713)	26,3% (104/395)	24,7% (274/1108)
Madrugada (00:01 às 6:00h)	26,5% (189/713)	30,9% (122/395)	28,1% (311/1108)
TOTAL	100% (713/713)	100% (395/395)	100% (1108/1108)

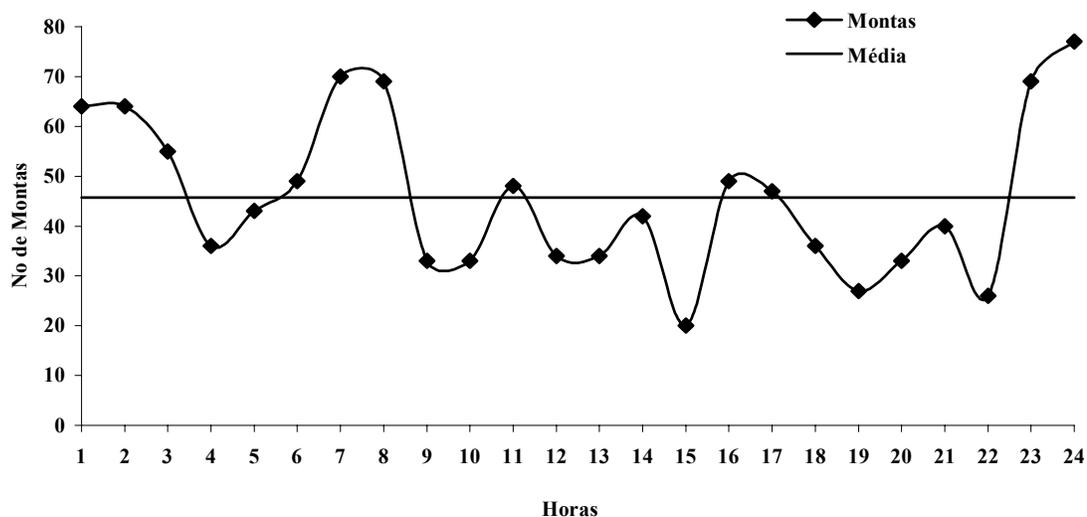


GRÁFICO 2-Distribuição total das montas/hora detectadas pelo sistema de radiotelemetria, durante 24 horas. Pirassununga, 1998.

O diâmetro máximo do folículo ovulatório foi, em média, de $13,7 \pm 1,2\text{mm}$. O diâmetro máximo do folículo ovulatório para as fêmeas tratadas antes e depois do D-10 foi $13,7 \pm 1,4\text{mm}$ e $13,5 \pm 0,7\text{mm}$ ($P > 0,05$), respectivamente. Não foram observadas qualquer relação significativa entre o diâmetro máximo do folículo ovulatório a intensidade e a duração do estro ($P > 0,05$). A taxa de crescimento do folículo ovulatório foi de $1,6 \pm 0,8\text{mm}/\text{dia}$, em média.

O tratamento com prostaglandina proporcionou 100% de luteólise, visto que todas as fêmeas apresentaram concentração sérica menor que $1,0\text{ng}/\text{ml}$ de progesterona na fase de estro. As concentrações plasmáticas de progesterona referentes às diferentes fases do ciclo estral foram, em

média, de $3,82 \pm 1,46$ ng/ml, $0,26 \pm 0,09$ ng/ml e $1,38 \pm 0,16$ ng/ml, respectivamente para o dia da aplicação da prostaglandina, para o dia do estro (D-0) e para o quinto dia do ciclo estral (D-5). Quando a prostaglandina foi aplicada antes do D-10, os níveis séricos de progesterona foram de $2,79 \pm 0,98$ ng/ml, inferiores àqueles dos animais tratados depois do D-10 ($4,85 \pm 1,26$ ng/ml; $P < 0,05$). No dia do estro e no D-5, as concentrações de progesterona foram $0,20 \pm 0,08$ ng/ml e $1,50 \pm 0,40$ ng/ml para animais tratados antes do D-10, e de $0,33 \pm 0,14$ ng/ml e $1,27 \pm 0,44$ ng/ml para aqueles tratados depois do D-10 ($P > 0,05$; Tab.5).

TABELA 5 -Concentrações plasmáticas de progesterona (ng/ml) em búfalas com o estro induzido com prostaglandina em diferentes fases do ciclo estral (antes e depois do D-10), em diferentes dias do ciclo estral, Pirassununga – 1998.

	Antes do D-10	Depois do D-10	Média
Dia da Aplicação	$2,79 \pm 0,98^a$	$4,85 \pm 1,26^b$	$3,82 \pm 1,46$
D-0	$0,20 \pm 0,08^a$	$0,33 \pm 0,14^a$	$0,26 \pm 0,09$
D-5	$1,50 \pm 0,40^a$	$1,27 \pm 0,44^a$	$1,38 \pm 0,16$

(a \neq b; $P < 0,05$)

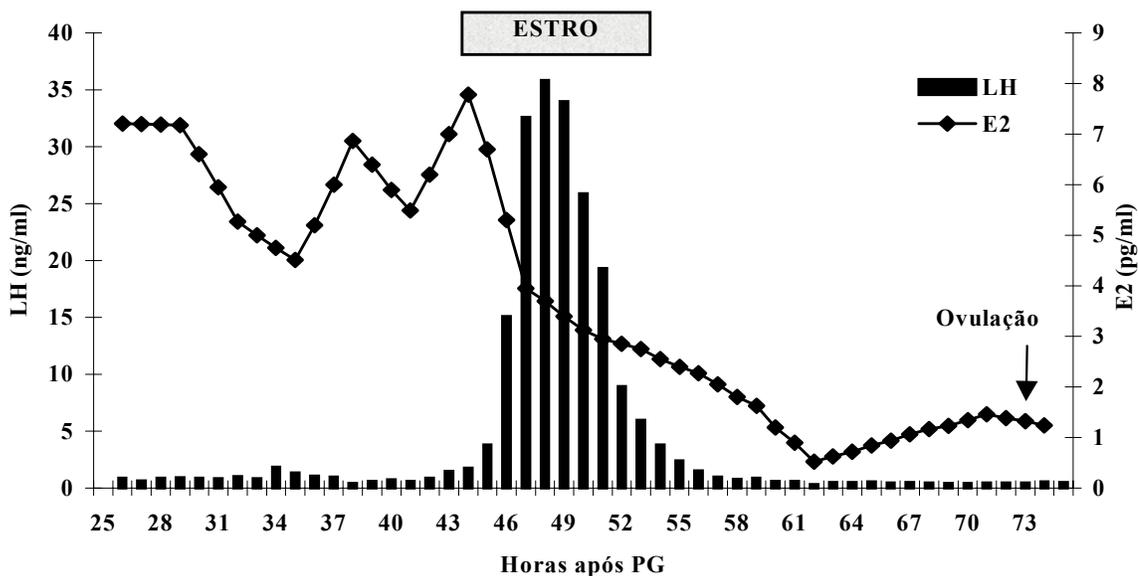
O intervalo entre o início do estro e a concentração máxima (pico) de LH foi, em média, de $3,6 \pm 3,4$ h. A concentração máxima de LH foi, em média, de $45,8 \pm 11,9$ ng/ml (n=4), apresentando valor máximo de 62,4ng/ml e mínimo de 35,8ng/ml. O intervalo entre a aplicação de prostaglandina e o pico na concentração sérica de LH foi de $45,6 \pm 10,8$ h, e o intervalo entre a concentração máxima de LH e a ovulação foi, em média, de $25,6 \pm 2,6$ h. A concentração sérica máxima de estradiol encontrada nos quatro animais selecionados foi de $8,9 \pm 1,7$ pg/ml (n=4), variando de 7,2pg/ml a 10,9pg/ml. O Gráf.3 apresenta esquematicamente os valores de LH e estradiol encontrados em uma novilha (nº280) que ficou em esquema de colheita de sangue à intervalos de uma hora e manifestou comportamento de monta.

DISCUSSÃO

O uso da radiotelemetria mostrou-se bastante eficiente na detecção de estros em fêmeas bubalinas sendo encontrada eficiência de 90% e acurácia de 100%. A maioria dos dados da literatura apresenta eficiência semelhante em bovinos (corte ou leite), variando de 73% a 91,7% (45, 49). Mas valores inferiores também são relatados (32) quando comparados a observação visual à radiotelemetria (53,1% vs. 65,1%; 32). A alta acurácia na detecção de estros com esse sistema (100%) também foi observada por outros autores (49). A alta eficiência e acurácia da radiotelemetria podem

ocorrer porque o sistema funciona durante as 24 horas do dia, evitando perdas na detecção de estros que se manifestam no período noturno e, conseqüentemente, passam despercebidos no sistema tradicional diurno de observação visual.

GRÁFICO 3- Concentrações plasmáticas de LH e estradiol em uma novilha



(nº280) em estro comportamental. Pirassununga, 1998.

Em 10% dos estros, as fêmeas não demonstraram qualquer comportamento de monta, sendo tais casos caracterizados como estros silenciosos. Este percentual encontrado foi inferior aos achados da literatura, que registra porcentagens variando de 16,3% (42) a 62,5% (39) de incidência de estros silenciosos na espécie bubalina.

No presente experimento, a duração do estro foi de $11,8 \pm 5,6$ h, consideravelmente inferior àquelas de estros relatados por outros autores, que se valeram da observação visual (30, 22, 39, 27). Também foram citados valores próximos aos deste experimento ($14,7 \pm 7,3$ h; 4), visto que esse autor realizou o experimento no mesmo período do ano e em condições semelhantes de manejo, além de realizar quatro observações diárias de estro. A utilização do sistema eletrônico de detecção de estro, por apresentar maior precisão, acurácia e a capacidade de operar durante 24 horas, pode ter contribuído para as diferenças na duração do estro.

A duração do estro não foi influenciada pelo dia do tratamento com prostaglandina (antes e depois do D-10), demonstrando que a fase do ciclo estral na qual é aplicado o agente luteolítico não origina qualquer alteração na duração do estro.

A classificação dos estros quanto à intensidade e à duração, no presente experimento, demonstrou que a grande maioria deles apresentou alta intensidade (75,6%) e longa duração (80%), com mais da metade (57,8%) demonstrando ambas as características. Estes resultados foram superiores aos relatados em bovinos leiteiros (17), com porcentagens

semelhantes entre estros com alta intensidade e curta duração (34,3%), e entre estros com baixa intensidade e longa duração (33,2%). No presente experimento, caso fosse utilizado esquema tradicional de detecção de estro (manhã e tarde), apenas 8,9% dos estros não seriam detectados, confirmando resultados anteriores (3), onde se verificou que apenas 3,5% dos estros não seriam detectados nestes períodos. Estes resultados confirmam que, apesar de as búfalas apresentarem algumas particularidades nas manifestações do estro, a maioria delas apresenta características evidentes desta fase, demonstrando que é perfeitamente possível detectar estros na espécie bubalina.

De maneira geral, a detecção da primeira monta (início do estro) apresentou-se bem distribuída durante os períodos do dia. No entanto, fêmeas que receberam aplicação de prostaglandina depois do D-10 apresentaram maior concentração de início dos estros no período da tarde (12:01 às 18:00h; 35,7%). Resultados semelhantes foram encontrados (34) porém, para a maioria dos autores, os estros iniciam-se, na maioria das vezes, no período da manhã (10, 1, 3) ou no período noturno (30, 19).

O intervalo médio de $30,0 \pm 4,9$ h entre o início do estro e a ovulação foi semelhante ao valor de $33,8 \pm 5,6$ h encontrado na literatura (23). Porém, intervalo significativamente superior também é relatado (54,6h; 39). Apesar da variação entre o início do estro e a ocorrência da ovulação ter sido bastante ampla (19,5 a 40h), não foi encontrada diferença significativa entre os grupos de tratamentos com prostaglandina antes e depois do D-10 ($29,3 \pm 4,9$ h vs. $31,6 \pm 4,4$ h). Também foi observada grande concentração das ovulações entre 24 e 36h após o início do estro (75%), o que não foi relatado por qualquer autor da literatura consultada. Provavelmente, quando o folículo atinge um diâmetro máximo adequado, ele desencadeia todo o processo ovulatório, independente do período de tempo que ele demorou para atingir o diâmetro máximo, proporcionando grande concentração de ovulações em um intervalo de tempo mais concentrado.

O intervalo médio entre o final do estro e a ovulação foi de $17,9 \pm 4,1$ h, superior aos valores citados por vários autores (23, 35), que observaram intervalos de $13,9 \pm 3,4$ h e $14,76 \pm 0,36$ h, respectivamente. Não foi encontrada diferença significativa para o intervalo entre o final do estro e a ovulação em novilhas tratadas antes e depois do D-10 ($17,7 \pm 3,7$ h vs. $18,4 \pm 5,1$ h).

Observou-se que os bubalinos respondem bem ao tratamento com prostaglandina visto que, 90% dos animais manifestaram estro. Estes resultados estão de acordo com aqueles demonstrados na literatura (20, 16, 14, 9, 15), na qual são descritos valores acima de 87% de manifestações de estro após a aplicação de prostaglandina. A fase do ciclo estral na qual foi aplicada a prostaglandina interferiu no intervalo entre a aplicação e a manifestação do estro e a ovulação. Quando a aplicação foi feita antes do D-10, as novilhas apresentaram estro e ovulação precocemente ($40,7 \pm 10,9$ h vs. $70,0 \pm 11,3$ h, respectivamente). Já as novilhas tratadas depois do D-10 apresentaram maior intervalo para a manifestação do estro ($56,7 \pm 12,8$ h) e para a ocorrência da ovulação ($85,6 \pm 12,5$ h). Tais diferenças também foram

observadas por pesquisadores que estudaram bovinos de corte ou de leite (44, 48, 24, 28, 43). No momento da luteólise, o folículo que se encontra antes da metade da fase estática de desenvolvimento será o ovulatório. Em contrapartida, o folículo que se encontra após a metade da fase estática de desenvolvimento não será o ovulatório. Neste caso, o folículo dominante da próxima onda será o ovulatório, resultando em intervalo maior entre o tratamento e a manifestação do estro e a ocorrência da ovulação (13).

Não foi observada diferença significativa, entre os tratamentos com prostaglandina (antes e depois do D-10), para o número de montas por estro. Em bovinos, houve grande diferença entre fêmeas de corte e leiteiras, com variação de $27 \pm 2,9$ a $50,1 \pm 6,4$ montas por estro em vacas de corte, e de $8,5 \pm 6,6$ a $11,2 \pm 0,93$ em fêmeas leiteiras (45, 47, 17, 51, 32, 36). É importante salientar que, na espécie bovina, o comportamento homossexual entre as fêmeas é bastante evidente e influencia o número de montas por estro (45).

Para bovinos, a duração individual das montas foi semelhante à encontrada no presente experimento, com variação de $2,5 \pm 0,04$ segundos até $3,5 \pm 0,3$ segundos (43, 49, 36). Porém, em novilhas de corte foi citada uma duração individual das montas de $8,0 \pm 0,6$ segundos (45), valor superior ao encontrado neste experimento. A duração total das montas durante o estro encontrada na literatura foi de 24,1 e 29 segundos (47, 49), inferiores aos valores encontrados no presente experimento. Provavelmente decorre do baixo número de montas por estro (10,1 e 11,2) citado pelos autores em bovinos leiteiros.

A distribuição das montas durante as 24 horas do dia demonstrou uniformidade, não apresentando diferenças significativas entre os quatro períodos do dia ou entre os tratamentos com prostaglandina. Os mesmos resultados foram observados em bovinos leiteiros (17). Essa homogeneidade na distribuição das montas difere das observações da literatura, que demonstram que os búfalos apresentam comportamento reprodutivo mais intenso no período noturno. Talvez o clima mais ameno da região na qual foi realizado o experimento e a época do ano (outono/inverno) possam ter interferido nos resultados.

O diâmetro máximo do folículo ovulatório ($13,7 \pm 1,2\text{mm}$), e a taxa de crescimento diária, não foram influenciados pelo tratamento com prostaglandina. Esse resultado é inferior ao relatado na literatura em fêmeas que apresentaram duas ondas de desenvolvimento folicular (46, 6). Entretanto, está próximo dos achados em fêmeas com três ondas de desenvolvimento folicular (26, 6). A taxa de crescimento do folículo ovulatório foi, em média, de $1,6 \pm 0,8\text{mm/dia}$, bem próximo ao valor observado em fêmeas que apresentaram três ondas de desenvolvimento folicular (6).

As concentrações plasmáticas de progesterona no dia do estro foram semelhantes aos relatados por vários pesquisadores. Apesar de alguns deles citarem valores menores do que $0,1\text{ng/ml}$ no dia do estro (37, 12), concentrações plasmáticas menores que $0,5\text{ng/ml}$ já podem ser consideradas como fase folicular, e aquelas maiores que $1,0\text{ng/ml}$ indicam fase luteínica (11). Na fase de diestro, as concentrações encontradas no

presente experimento foram superiores as relatadas na literatura (12, 21, 25). Estas diferenças podem estar relacionadas à fase do diestro na qual foram colhidas as amostras e, conseqüentemente, à funcionalidade do corpo lúteo. Porém, uma variação na concentração de progesterona de 5 a 12ng/ml durante a fase luteínica, próxima à observada no presente experimento, também é relatada (39).

A concentração máxima de LH ocorreu em média $45,6 \pm 10,8$ h após a administração da prostaglandina nos quatro animais escolhidos para a realização das coletas de sangue. O intervalo entre a concentração máxima de LH e a ovulação foi, em média, de $25,6 \pm 2,6$ h. Na literatura consultada, não foi encontrado dados semelhantes em relação ao intervalo entre a aplicação de prostaglandina e a concentração sérica máxima de LH na espécie bubalina. Em bovinos, foi observado diferença significativa entre o início do tratamento – nas fases inicial ou final do ciclo estral - e a concentração máxima de LH, acompanhando as diferenças relatadas entre os tratamentos e o início do estro e a ovulação (43). No entanto, o intervalo entre concentração máxima de LH e a ovulação encontrada neste experimento é semelhante aos achados na literatura por outros pesquisadores (22), que verificaram intervalo de $27,7 \pm 0,5$ h para que ocorresse a ovulação após a detecção da concentração máxima de LH, e ao intervalo de $24,4 \pm 7,9$ h (7) após a aplicação exógena de LH. A concentração sérica máxima de LH foi, em média, de $45,8 \pm 11,9$ ng/ml, variando de 35,8ng/ml a 62,4ng/ml. Estes valores são semelhantes aos achados de literatura que verificaram variação de 20 a 52ng/ml (2), porém são bem inferiores à variação de 61 a 126ng/ml observada por outros autores (22). Também foi relatado um pico máximo de LH com concentração plasmática de $11,65 \pm 0,25$ ng/ml (25), bem inferior aos valores citados pela literatura e àqueles encontrados neste experimento.

O intervalo entre o início do estro e a concentração máxima de LH foi de 6,0h em uma novilha (nº 280), e de 1,2h em outra (nº 300), visto que apenas duas das quatro novilhas escolhidas para a obtenção das amostras apresentaram estro. O intervalo entre o início do estro e a concentração máxima de LH foi, em média, de $3,6 \pm 3,4$ h. Apesar do pequeno número de animais, esse intervalo está em conformidade com os dados da literatura (2, 22, 25).

A concentração máxima de estradiol, no presente experimento, foi de $8,9 \pm 1,7$ pg/ml, variando de 7,2pg/ml a 10,9pg/ml. Esse valor é inferior àquele observado em pesquisas anteriores onde verificou-se concentração máxima de estradiol de 38,00pg/ml (25), porém, está próximo da variação de 9 a 13pg/ml (39) e da concentração máxima de $12,9 \pm 0,6$ pg/ml (2). Dependendo da fase do ciclo estral na qual foi administrada o agente luteolítico, foi detectada diferenças quanto ao aparecimento da concentração máxima de estradiol (43), o que não foi observado no presente experimento.

O sistema de radiotelemetria apresentou alta eficiência e acurácia na detecção do estro na espécie bubalina, confirmados através das dosagens de progesterona e pelos exames ultra-sonográficos. A maioria dos estros foi de alta intensidade e longa duração e a distribuição das montas apresentou uniformidade durante o dia. Estas características demonstram a viabilidade

de detecção do estro nesta espécie mesmo sabendo das suas peculiaridades quanto à manifestação comportamental desta fase do ciclo estral. Todos os animais apresentaram concentração plasmática de progesterona menor que 1,0ng/ml na fase de estro, confirmando o efeito luteolítico da prostaglandina na espécie bubalina. A fase do ciclo estral na qual foi aplicada a prostaglandina, interferiu significativamente nos intervalos entre aplicação e manifestação de estro e a ovulação, fato este já comprovado em bovinos mas não na espécie bubalina. Apesar do pequeno número de animais, os valores encontrados para as concentrações plasmáticas de estradiol e LH foram semelhantes aos relatados em literatura. Porém, são necessárias mais pesquisas que utilizem sistemas eletrônicos capazes de detectar com precisão as características comportamentais desta espécie que, aliadas as dosagens hormonais, darão suporte científico na implantação de biotecnologias visando melhoramento genético e, por consequência, aumento de produtividade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGARWAL, S.K.; PURBEY, L.N. Oestrous behaviour and its relation to conception in rural buffaloes. **Indian Veterinary Journal**, v.60, n.8, p.631-6, 1983.
2. AVENELL, J.A.; SAEPUDIN, Y.; FLETCHER, I.C. Concentrations of LH, oestradiol-17 β and progesterone in the peripheral plasma of swamp buffalo cows (*Bubalus bubalis*) around the time of oestrus. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.74, n.2, p.419-24, 1985.
3. BARUSELLI, P.S. **Atividade ovariana e comportamento reprodutivo no período pós-parto em búfalos (*Bubalus bubalis*)**. São Paulo, 1992, 99p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.
4. BARUSELLI, P.S. Sexual behaviour in buffaloes. *IN:WORLD BUFFALO CONGRESS*, 4., São Paulo, 1994. **Proceedings**. p. 158-73.
5. BARUSELLI, P.S.; BARNABE, V.H.; BARNABE, R.C.; VISINTIN, J.A.; SOUZA, A.C.; IKEDA, J.A. Climate fails to affect conception rate of buffalo cows artificially inseminated. *IN:WORLD BUFFALO CONGRESS*, 5., Caserta, 1997a. **Proceedings**. p. 745.
6. BARUSELLI, P.S.; MUCCILOLO, R.G.; VISINTIN, J.A.; VIANA, W.G.; ARRUDA, R.P.; MADUREIRA, E.H.; OLIVEIRA, C.A.; MOLERO-FILHO, J.R. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in buffalo. **Theriogenology**, v.47, n.8, p.1531-47, 1997b.
7. BERBER, R.C.A.; BARUSELLI, P.S.; MADUREIRA, E.H. Sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo com GnRH e LH

- (resultados parciais). **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v. 27, n. 1, p. 216, **suplemento**, 1999.
8. BONO, G.; GAIANI, R.; CHIESA, F. Bovine LH radioimmunoassay. **Archivo de Veterinaria Italiano**, v.31, n.1, 1980.
 9. BROSREKAR, M.R.; PHADNIS, Y.P.; GOKHALE, S.B.; MANGURKAR, B.R. Behavioural responses and conception rates in oestrus synchronized buffaloes. *IN:WORLD BUFFALO CONGRESS*, 4., São Paulo, 1994. **Proceedings**. p. 468-70.
 10. BUTCHAIHAH, V.; TOMAR, N.S.; SINGH, B.P. The behaviour of oestrus cycle in buffaloes. **Indian Veterinary Journal**, v.41, n.2, p.97-102, 1975.
 11. CHAUHAN, F.S.; SHARMA, R.D.; SINGH, G.B. Compatibility between serum progesterone profile and rectal/clinical findings in normal cycling, suboestrus, and after treatment with prostaglandin in suboestrous buffaloes. **Animal Reproduction Science**, v.8, n.1/2, p.137-42, 1985.
 12. CHAUHAN, F.S.; SHARMA, R.D.; SINGH, G.B. Serum progesterone concentrations in normal cycling and suboestrus buffaloes. **Indian Journal of Dairy Sciences**, v.36, n.1, p.28-33, 1983.
 13. DE RENSIS, F.; PETERS, A.R. The control of follicular dynamics by $PGF_{2\alpha}$, GnRH, hCG and oestrus synchronization in cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v.34, n.2, p.49-59, 1999.
 14. DHALIWAL, G.S.; SHARMA, R.D.; BISWAS, R.K. Comparative fertility in buffaloes with observed and timed insemination using two routes of $PGF_{2\alpha}$ administration. **The Veterinary Record**, v.121, n.15, p.475-6, 1987.
 15. DIAZ, J.S.; FRITSCH, M.; RODRIGUES, J.L. Pre-fixed artificial insemination in water buffaloes with synchronized estrus using prostaglandin F_2 alfa and synchromate-B. *IN:WORLD BUFFALO CONGRESS*, 4., São Paulo, 1994. **Proceedings**. p. 588-590.
 16. DIAZ, S.; MIES FILHO, A. Indução do estro com prostaglandina $F_{2\alpha}$ em búfalas em lactação. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.7, n.2, p.11-22, 1983.
 17. DRANSFIELD, M.B.G.; NEBEL, R.L.; PEARSON, R.E.; WARNICK, L.D. Timing of insemination for dairy cows identified in estrus by a radiotelemetric estrus detection system. **Journal of Dairy Science**, v.81, n.7, p.1874-82, 1998.
 18. FAO (Food and Agriculture Organization), FAOSTAT – Agriculture data. <http://apps.fao.org/cgi-bin/nph-db.pl?subset=agriculture/>. 2004.

19. JACOMINI, J.O. **Aspectos do ciclo estral e do comportamento sexual de búfalas (*Bubalus bubalis*)**. Belo Horizonte, 1989, 80p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.
20. JAINUDEEN, M.R. Induction of oestrus and ovulation in buffalo (*Bubalus bubalis*) using cloprostenol, a syntetic analogue of prostaglandin F_{2α}. **Kaijian Veterinar**, n.8, p.40-2, 1976.
21. JAINUDEEN, M.R.; SHARIFUDDIN, W.; BASHIR AHMAD, F. Relationship of ovarian contents to plasma progesterone concentration in the swamp buffalo (*Bubalus bubalis*). **The Veterinary Record**, v.113, n.16, p.369-72, 1983.
22. KANAI, Y.; SHIMIZU, H. Changes in plasma concentrations of luteinizing hormone, progesterone and oestradiol-17β during the periovulatory period in cyclic swamp buffaloes. **Animal Reproduction Science**, v.11, n.1, p.17-24, 1986.
23. KANAY, Y.; SHIMIZU, H. Characteristics of the estrous cycle of the swamp buffalo under temperate conditions. **Theriogenology**, v.19, n.4, p.593-601, 1983.
24. KASTELIC, J.P.; KNOFF, L.; GINTHER, O.J. Effect of day of prostaglandin F_{2α} treatment on selection and development of the ovulatory follicle in heifers. **Animal Reproduction Science**, v.23, n.3, p.169-80, 1990.
25. KUMAR, R.; JINDAL, R.; RATTAN, P.J.S. Plasma hormonal profiles during oestrous cycle of murrh buffalo heifers. **Indian Journal of Animal Sciences**, v.61, n.4, p.382-5, 1991.
26. MANIK, R.S.; MADAN, M.L.; SINGLA, S.K. Ovarian follicular dynamics in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) : ultrasonically monitoring individual follicles for wave hypothesis. **Theriogenology**, v.41, n.1, p.246, 1994.
27. MOIOLI, B.M.; NAPOLITANO, F.; PUPPO, S.; BARILE, V.L.; TERZANO, G.M.; BORGHESE, A.; MALFATTI, A.; CATALANO, A.; PILLA, A.M. Patterns of oestrus, time of LH release and ovulation and effects of time of artificial insemination in mediterranean buffalo cows. **Animal Science**, v.66, n.1, p.87-91, 1998.
28. ODDE, K.G. A review of synchronization of estrus in postpartum cattle. **Journal of Animal Science**, v.68, n.3, p.817-30, 1990.
29. OHASHI, O.M. Estrus detection. *IN:SECOND INTERNATIONAL TRAINING COURSE ON BIOTECHNOLOGY OF REPRODUCTION IN BUFFALOES*, São Paulo, 1994. **Proceedings**. p.7-13.

30. PATEL, J.M.; SARMA, P.A. Note on oestrous behaviour during winter in buffaloes. **Indian Journal of Animal Sciences**, v.52, n.6, p.437-8, 1982.
31. PIMENTEL GOMES, F. **Curso de Estatística Experimental**. ESALQ, Piracicaba, SP, 467p., 1985.
32. RAE, D.O.; CHENOWETH, P.J.; GIANGRECO, M.A.; DIXON, P.W.; BENNETT, F.L. Assessment of estrus detection by visual observation and electronic detection methods and characterization of factors associated with estrus and pregnancy in beef heifers. **Theriogenology**, v.51, n.6, p.1121-32, 1999.
33. RAO, A.V.N.; RAO, H.R.M.; VENKATARAMAIAH, P. Heat detection index in murrah buffaloes. **Indian Veterinary Journal**, v.72, n.6, p.658-9, 1995.
34. RAO, N.M.; KODAGALI, S.B. Onset of oestrus, oestrus signs and optimum time of artificial insemination in surti buffaloes. **Indian Journal of Animal Sciences**, v.53, n.5, p.553-5, 1983.
35. RAUT, N.V.; KADU, M.S. Observations on ovulation and its association with fertility in berari (nagpuri) buffaloes. **Indian Veterinary Journal**, v.67, n.2, p.130-2, 1990.
36. ROCHA, J.L.; MADUREIRA, E.H.; BARNABE, R.C. Características do estro e ovulação em novilhas de corte mestiças sincronizadas e em novilhas e vacas nelore com estros naturais, detectadas através do sistema heat-watch. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.23, n.3, p.162-4, 1999.
37. SANWAL, P.C.; VARSHNEY, V.P.; PANDE, J.K.; SHARMA, N.C.; RAHMAN, M. Peripheral plasma levels of progesterone in buffalo during oestrous cycle and early pregnancy. **Indian Journal of Animal Sciences**, v.50, n.6, p.480-2, 1980.
38. SAS Institute Inc. **SAS User's guide: statistics**. Ver. 5 ed., SAS Inst., Cary, NC, 1985.
39. SEREN, E.; PARMEGGIANI, A. Oestrous cycle in italian buffalo. **Bubalus bubalis**, n.4, p.21-28, **supplement**, 1997.
40. SEREN, E.; LEOPOLD, A.; BOLELLI, G. Peripheral plasma levels of oestrogens and progesterone during the bovine oestrous cycle. **Archivo de Veterinaria Italiano**, v.25, n.1, 1974.
41. SEREN, E.; PARMEGGIANI, A.; ZICARELLI, L.; MONTEMURRO, N.; PACELLI, C.; TERZANO, G.M. Periestrous endocrine changes in italian buffaloes. *IN:Prospects of buffalo production in the mediterranean and the middle east*, Cairo, 1992. **Proceedings**. p. 393.

42. SINGH, G.; SINGH, G.B.; SHARMA, S.S.; SHARMA, R.D. Studies on symptoms of buffalo heifers. **Theriogenology**, v.21, n.6, p.849-58, 1984.
43. STEVENSON, J.S.; LAMB, G.C.; KOBAYASHI, Y.; HOFFMAN, D.P. Luteolysis during two stages of the estrous cycle: subsequent endocrine profiles associated with radiotelemetrically detected estrus in heifers. **Journal of Dairy Science**, v.81, n.11, p.2897-983, 1998.
44. STEVENSON, J.S.; SCHMIDT, M.K.; CALL, E.P. Stage of estrous cycle, time of insemination, and seasonal effects on estrus and fertility of holstein heifers after prostaglandin $F_{2\alpha}$. **Journal of Dairy Science**, v.67, n.8, p.1798-805, 1984.
45. STEVENSON, J.S.; SMITH, M.W.; JAEGER, J.R.; CORAH, L.R.; LeFEVER, D.G. Detection of estrus by visual observation and radiotelemetry in peripubertal estrus-synchronized beef heifers. **Journal of Animal Science**, v.74, n.4, p.729-35, 1996.
46. TANEJA, M.; ALI, A.; SINGH, G. Ovarian follicular dynamics in water buffalo. **Theriogenology**, v.46, n.1, p.121-30, 1996.
47. WALKER, W.L.; NEBEL, R.L.; MCGILLIARD, M.L. Time of ovulation relative to mounting activity in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.79, n.9, p.1555-61, 1996.
48. WATTS, T.L.; FUQUAY, J.W. Response and fertility of dairy heifers following injection with prostaglandin $F_{2\alpha}$ during early, middle or late diestrus. **Theriogenology**, v.23, n.4, p.655-61, 1985.
49. XU, Z.Z.; MCKNIGHT, D.J.; VISHWANATH, R.; PITT, C.J.; BURTON, L.J. Estrus detection using radiotelemetry or visual observation and tail painting for dairy cows on pasture. **Journal of Dairy Science**, v.81, n.11, p.2890-6, 1998.
50. ZICARELLI, L.; ESPOSITO, L.; CAMPANILE, G.; DiPALO, R.; ARMSTRONG, D.T. Effects of using vasectomized bulls in artificial insemination practice on the reproductive efficiency of Italian buffalo cows. **Animal Reproduction Science**, v.47, n.3, p.171-80, 1997.