

O estado atual da biotecnologia reprodutiva em bubalinos: perspectiva de aplicação comercial¹

Actualities in reproductive biotechnology in buffalo: perspectives of commercial application

Pietro Sampaio Baruselli^{2,4}, Lindsay Unno Gimenes², Nélcio Antonio Tonizza de Carvalho³, Manoel Francisco de Sá Filho², Márcio Leão Ferraz² e Renato Campanarut Barnabe²

²Departamento de Reprodução Animal, FMVZ-USP, CEP 05508-000, São Paulo, SP, Brasil.

³Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Registro – APTA – Vale do Ribeira, SP, Brasil.

⁴Correspondência: barusell@usp.br

Resumo

Na presente revisão são relatadas as principais biotécnicas atualmente empregadas na reprodução de bubalinos. A inseminação artificial em tempo fixo tem sido utilizada nesta espécie tanto na estação reprodutiva favorável, quanto na desfavorável, com obtenção de satisfatórias taxas de prenhez. Outras técnicas - como a múltipla ovulação e transferência de embriões, aspiração folicular (OPU) e produção de embriões *in vitro* - têm se mostrado factíveis em bubalinos, embora ainda com baixa eficiência e pouca aplicação comercial. Novos estudos necessitam ser conduzidos para incrementar a aplicação comercial dessas biotécnicas, aumentando a eficiência, reduzindo os custos e permitindo a difusão em larga escala de germoplasma superior, tanto de origem paterna quanto de origem materna.

Palavras-chave: búfalos, inseminação artificial, MOET, OPU-PIV.

Abstract

In the present review, the main reproductive biotechnologies applied in buffalo species are described. Fixed time artificial insemination has been successfully used in this species during the reproductive season and in the out breeding season. Other techniques – as multiple ovulation and embryo transfer, ovum pick-up and in vitro embryo production – have been shown feasible in buffalo, although low efficiency and commercial application are verified. Further studies must be conducted to permit commercial application of these biotechniques. This way the costs can be reduced and superior germoplasm can be spread in large scale.

Keywords: buffalo, artificial insemination, MOET, OPU-IVP.

Introdução

A criação de bubalinos tem demonstrado ser um mercado emergente, contribuindo de maneira significativa na economia mundial. Este fato pode ser verificado pelo intenso crescimento nas taxas de produção de carne e leite registrados nos últimos 10 anos pela Food and Agriculture Organization - FAO (12,4 e 28,3%, respectivamente; FAO, 2005).

Grande parte deste progresso na cadeia produtiva deve-se ao melhoramento genético, via processos de seleção e emprego de biotecnologias da reprodução. No últimos 20 anos vários grupos de pesquisa avançaram nos estudos que possibilitaram o desenvolvimento de diversas técnicas com aplicação comercial.

A presente revisão tem como objetivo de apresentar e discutir os achados mais recentes sobre o emprego de modernas biotécnicas reprodutivas em bubalinos.

Particularidades da fisiologia reprodutiva de bubalinos

Antes da programação de qualquer evento reprodutivo em bubalinos, é necessário o conhecimento prévio da característica reprodutiva estacional 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, 1994a). Pode-se dizer que os búfalos são poliétricos estacionais de dias curtos, semelhantemente aos ovinos e caprinos, apresentando aumento da atividade reprodutiva nos meses de outono e do inverno.

Os estudos de dinâmica folicular em bubalinos demonstram que esta espécie apresenta desenvolvimento ovariano semelhante aos bovinos (Baruselli *et al.*, 1997). Embora a ocorrência de duas ondas foliculares seja a mais relatada em fêmeas bubalinas (Manik *et al.*, 1994; Baruselli *et al.*, 1997; Ali *et al.*, 2003), também foi observado o padrão de uma (Baruselli *et al.*, 1997) ou três ondas (Manik *et al.*, 1994; Baruselli *et al.*, 1997).

O número de folículos recrutados por onda de crescimento folicular é menos em bubalinos que em bovinos (Baruselli *et al.*, 1997). Danell (1987) observou, pela histologia ovariana, que existe uma população de

¹Palestra apresentada no XVII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 31 de maio a 2 de junho de 2007, Curitiba/PR.

12.636 e 10.132 folículos primordiais em novilhas búfalas cíclicas e não cíclicas, respectivamente, número é bastante reduzido quando comparado aos 50.000 folículos primordiais em novilhas bovinas. O número de folículos > 1 mm também difere entre as duas espécies, pois os bovinos possuem aproximadamente 90 folículos, enquanto que os búfalos apresentam apenas 46,3. Constatou-se diferenças no número de folículos atrésicos entre as duas espécies, notando atresia em 2/3 dos folículos em desenvolvimento nos bubalinos e 50% nos bovinos.

O intervalo interovulatório pode variar de 21 a 25 dias, dependendo do número de ondas de crescimento folicular, sendo mais longo em animais com 3 ondas (Manik *et al.*, 1994; Baruselli *et al.*, 1997). A duração da fase lútea comporta-se da mesma maneira, sendo maior em animais que apresentam maior número de ondas de crescimento folicular, sendo relatados intervalos de 10 a 13 dias (Baruselli *et al.*, 1997). Pode-se verificar que estes períodos são semelhantes aos de bovinos.

Entretanto, em relação aos bovinos, são detectadas diferenças nos diâmetros máximos alcançados por onda de crescimento folicular. Em bubalinos, esses diâmetros variam de 11,1 a 15,5 mm dependendo do número de ondas de crescimento folicular (Manik *et al.*, 1994; Baruselli *et al.*, 1997). Em bovinos os diâmetros máximos variam em função do grupo genético (zebuínos vs. taurinos), sendo menores em *Bos indicus* (10 a 12 mm; Bo *et al.*, 1993; Figueiredo *et al.*, 1997; Rhodes *et al.*, 1995) do que em *Bos taurus* (15 a 20 mm; Ginther *et al.*, 1989; Kastelic *et al.*, 1990; Bo *et al.*, 1993).

Em um recente estudo desenvolvido por nosso grupo de pesquisa (Gimenes, 2006), verificou-se que também há diferenças entre bubalinos e bovinos com relação aos diâmetros atingidos no momento da seleção folicular. Na divergência folicular (2,6 dias após a ovulação), os diâmetros do folículo dominante e maior subordinado são 7,2mm e 6,4mm, em bubalinos. Estes diâmetros mostram-se maiores do que os descritos para *Bos indicus* [FD: 5,4 a 6,2 mm (Sartorelli *et al.*, 2005; Castilho *et al.*, 2006; Gimenes, 2006); FS: 5,4 a 5,8 mm (Sartorelli *et al.*, 2005; Castilho *et al.*, 2006; Gimenes, 2006)], porém menores do que os reportados para *Bos taurus* (FD: 8,5 mm e FS: 7,2 mm; Ginther *et al.*, 1996).

Entretanto, após a divergência, os folículos ainda não são responsivos a indução de ovulação. Em novilhas bubalinas a aquisição de capacidade ovulatória ocorre a partir de 8,5mm de diâmetro, quando 50% dos animais torna-se responsivo ao LH exógeno, contudo não há aumento nas taxas de ovulação quando diâmetros superiores são alcançados (56% de ovulação com diâmetros superiores a 10 mm; Gimenes, 2006).

Inseminação artificial

Dentre as principais biotécnicas empregadas nas espécies domésticas, pode-se citar a inseminação artificial (IA) como importante ferramenta para difusão de material genético superior de origem paterna. Entretanto, o uso desta técnica de maneira convencional, ou seja, pela observação de cios, se depara com duas dificuldades relevantes na espécie bubalina. A primeira está relacionada ao próprio comportamento estral, que em bubalinos é discreto, dificultando a detecção do estro. A segunda, diretamente ligada ao primeiro fator, é a baixa taxa de serviço obtida em fêmeas bubalinas inseminadas artificialmente, levando ao comprometimento da eficiência reprodutiva do rebanho e ao insucesso da técnica. Também, é importante ressaltar que bubalinos criados em regiões distantes do equador são sazonais, manifestando atividade reprodutiva durante os meses de outono e inverno.

Desta maneira, foram desenvolvidos protocolos hormonais que permitissem a utilização da IA sem a necessidade da detecção de cio. Nesta revisão serão comentados os dois principais protocolos de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) que estão sendo empregados na espécie, tanto na estação reprodutiva favorável quanto na estação reprodutiva desfavorável.

Nos últimos anos nossa equipe de pesquisa desenvolveu experimentos a fim de avaliar a eficiência do protocolo Ovsynch em bubalinos (D0: GnRH; D7: PGF2 α ; D9: GnRH; IATF 16 horas após a 2ª aplicação de GnRH; Baruselli *et al.*, 1999a, b; 2002). Como resultados, verificou-se que este protocolo proporciona taxas de prenhez satisfatórias (em média de 50%) durante a estação reprodutiva favorável de bubalinos, desde que as fêmeas estejam ciclando e com condição corporal $\geq 3,0$ (escala de 1 a 5).

Entretanto, quando este mesmo protocolo foi empregado em fêmeas na estação reprodutiva desfavorável (primavera e verão), quando apresentam alta incidência de anestro, taxas de prenhez entre 6,9% (Baruselli *et al.*, 1999b) e 28,2% (Baruselli *et al.*, 2002) foram obtidas, indicando baixa eficiência desse protocolo de sincronização. Após inúmeros projetos de pesquisa (Baruselli *et al.*, 2002; 2003b; Moura, 2003; Bartolomeu, 2003; Porto Filho, 2004; Porto Filho *et al.*, 2004; Carvalho *et al.*, 2005; 2007a, b), foi desenvolvido um tratamento hormonal que vem apresentando resultados satisfatórios para animais em anestro estacional, possibilitando o emprego da IA durante todo o ano. Este consiste na inserção de dispositivo intravaginal de progesterona ou implante auricular de norgestomet, associado a 2ml de benzoato de estradiol (BE) em dia aleatório do ciclo estral (D0). Nove dias após a inserção, o dispositivo/ implante é retirado e são administrados PGF2 α , e eCG (400 UI). Após 48 horas da retirada do dispositivo, são administrados GnRH ou hCG (1000 UI) e a IATF é realizada 16 horas após este último tratamento.

Com o emprego desses protocolos de sincronização é possível obter aproximadamente 50% de concepção, tanto na estação reprodutiva favorável (protocolo Ovsynch), quanto na estação reprodutiva

desfavorável (P4 + eCG). Essa tecnologia permite associar o emprego da IA com a desestacionalização dos partos, tão importante para evitar a concentração fisiologia dos partos e a produção de leite, contribuindo para o abastecimento da demanda contínua de leite da indústria láctea de búfalos.

Múltipla ovulação e transferência de embriões

Embora a IATF tenha sofrido um grande progresso e venha sendo aplicada com sucesso em rebanhos nacionais, a exploração de técnicas para multiplicar o material genético materno ainda tem baixa difusão. Isto é atribuído aos insatisfatórios resultados obtidos até o momento, e que, na realidade, refletem a compreensão parcial dos eventos envolvidos na manipulação do ciclo estral e da ovulação desta espécie, embora muito já se tenha elucidado.

Apesar de haver registros do nascimento de búfalos com o emprego da MOET no Brasil e em outros países (Drost *et al.*, 1983; Baruselli, 1994), a utilização dessa técnica na espécie ainda apresenta limitações, ligadas principalmente à baixa taxa de recuperação embrionária (Misra *et al.*, 1990; Ambrose *et al.*, 1991; Baruselli, 1994; Zicarelli *et al.*, 1994a, b; Taneja *et al.*, 1995; Madan *et al.*, 1996; Baruselli *et al.*, 1997; Zicarelli *et al.*, 2000; Baruselli *et al.*, 2002; Carvalho *et al.*, 2002). Búfalos superovulados produzem em média de 1 a 2 embriões viáveis por colheita.

Os avanços proporcionados pela técnica de MOET permitem afirmar que as fêmeas bubalinas respondem ao tratamento superovulatório, embora sejam menos eficientes que as fêmeas bovinas na recuperação de embriões. De acordo com Baruselli *et al.* (2000), somente 34,8% das ovulações de búfalas submetidas à superestimulação do crescimento folicular resultam na colheita de estruturas embrionárias, percentual muito inferior àquele encontrado por Adams (1994), que registra taxas de 63% a 80% em bovinos. Essa disparidade entre as taxas de recuperação de embriões nas duas espécies pode estar relacionada a alguma falha no processo de captação e/ou transporte dos oócitos pelo oviduto.

De acordo com Hunter (1988), os dois principais mecanismos envolvidos no transporte dos gametas femininos são os batimentos ciliares do epitélio do oviduto e as ondas de contração da miosalpinge. Tais mecanismos, assim como o tempo de transporte dos oócitos pelo oviduto, são controlados pelos esteróides ovarianos.

Os baixos resultados da MOET na espécie bubalina podem decorrer das altas concentrações do hormônio estradiol (E₂) durante o tratamento superovulatório, postulam Misra *et al.* (1998). É possível que as fêmeas bubalinas sejam mais sensíveis que as fêmeas bovinas a elevações nas concentrações plasmáticas de 17β-estradiol durante os tratamentos superovulatórios (Beg *et al.*, 1997).

A partir desta hipótese, Baruselli *et al.* (2002) e Carvalho (2002) buscaram reduzir as concentrações circulantes de E₂ durante os tratamentos superovulatórios, seja pela utilização de progesterona exógena ou bioimplantes de deslorelina, respectivamente. Contudo, em ambos estudos não foi obtido aumento nas taxas de recuperação de estruturas embrionárias.

A fim de correlacionar os achados anatômicos aos funcionais em fêmeas bubalinas e bovinas e as implicações na MOET, nosso grupo de pesquisa desenvolveu uma sequência de diversos experimentos (Carvalho, 2006). Não foi observado efeito do estradiol na recuperação de estruturas embrionárias, e tampouco no padrão de movimentação ciliar da tuba uterina. Ainda, de forma resumida, o trabalho foi indicativo de que fêmeas bubalinas superovuladas apresentaram maior número de folículos anovulatórios, ligação ovário-mesovárica mais rígida e maior espessura da camada muscular do infundíbulo da tuba uterina do que fêmeas bovinas, e que estes fatores poderiam contribuir para a menor taxa de recuperação embrionária em bubalinos.

Outra possível causa pode estar relacionada à qualidade oocitária dos bubalinos, pois nesta espécie as camadas de células da granulosa são ligadas fragilmente aos oócitos, ao contrário do que ocorre na espécie bovina (Gasparrini, 2002). Devido a este fator, o emprego de somatotropina recombinante bovina (rbST) poderia colaborar aumentando a eficiência da MOET em bubalinos, visto que este hormônio 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 – Pavlok *et al.*, 1996; Lucy, 2000). Adicionalmente, o tratamento com rBST estimula a expansão das células do cumulus (Izadyar *et al.*, 1998a, b), o que poderia contribuir para a adesão dos oócitos à fimbria e às células ciliadas da endosalpinge e, essa interação poderia aumentar a taxa de recuperação embrionária em animais superovulados.

Na tentativa de estudar essa hipótese, alguns trabalhos desenvolvidos em bubalinos demonstraram que o emprego de somatotropina recombinante bovina (rbST) promove aumento do número e da proporção de embriões transferíveis (Songsasen *et al.*, 1999) e aumento na taxa de recuperação de embriões e, apesar de não significativo, do número de estruturas embrionárias recuperadas em relação ao grupo não tratado com rBST (Baruselli *et al.*, 2003a).

No entanto, existem relatos de que existe diferença na eficiência reprodutiva de vacas bovinas que receberam bST conforme o aumento da concentração sanguínea de IGF1 em resposta ao tratamento (Thatcher *et al.*, 2006). Vacas secas respondem com alta elevação da concentração sanguínea de IGF1, a qual está correlacionadas com diminuição da fertilidade. Entretanto, vacas em lactação apresentam aumento adequado dos

níveis de IGF1, associados ao aumento da fertilidade. Os autores discutem que a resposta ao tratamento pode estar associada ao metabolismo do animal.

Em recente experimento (Carvalho *et al.*, 2007c), que procurou avaliar o possível efeito positivo de reduzidas doses de bST, testou-se o emprego de meia dose ou dose inteira de rbST em protocolos de superovulação em bubalinos. Porém os resultados parecem ser conflitantes, pois não houve efeito do tratamento com bST (dose inteira ou meia dose), quando comparado ao grupo controle (animais não tratados com bST). Apesar disto, numericamente houve maior número de estruturas totais, embriões transferíveis e congeláveis para o grupo em que se utilizou meia dose de bST.

De modo geral, o problema relacionado à baixa taxa de recuperação de embriões bubalinos permanece ainda desconhecido, comprometendo a eficiência da TE nessa espécie. Entretanto, existem indícios de que o uso de bST e, particularmente, da meia dose deste hormônio, pode apresentar efeito positivo. Novos estudos são necessários para tentar viabilizar o emprego da MOET em bubalinos, para que essa técnica seja amplamente difundida e empregada pelos criadores com a finalidade de acelerar o ganho genético e a produtividade dos rebanhos de búfalos.

Aspiração folicular e produção de embriões *in vitro*

A aspiração folicular transvaginal associada à produção de embriões *in vitro* tem se mostrado promissora, especialmente devido à possibilidade de recuperar oócitos de animais vivos de diferentes status reprodutivos (pré-púberes, em anestro, cíclicos, gestantes). Entretanto, apesar do crescente interesse pela técnica, associado ao potencial de propagação do germoplasma, baixos índices de produção de embriões e produtos a termo foram obtidos até o momento em bubalinos (Gasparrini, 2002). Essa técnica tem sido empregada por diversos grupos de pesquisa (Boni *et al.*, 1994; Galli *et al.*, 1998; Ohashi *et al.*, 1998; Boni *et al.*, 1999; Gasparrini, 2002, Campanile *et al.* 2003). Entretanto, há algumas particularidades em bubalinos que a tornam menos eficiente que em bovinos.

Primeiramente é importante citar que, devido ao reduzido número de folículos primordiais (Danell, 1987) e antrais (Le Van Ty *et al.*, 1989) na espécie bubalina comparado à espécie bovina, verifica-se, conseqüentemente, menor número de folículos recrutados por onda de crescimento folicular. Sendo assim, proporcionalmente menor número de oócitos são recuperados por sessão de aspiração folicular em bubalinos. Este fato foi verificado por Ohashi *et al.* (1998), que desenvolveram um experimento no qual foram comparadas as características foliculares e oocitárias após o abate de bubalinos e zebuínos criados sob as mesmas condições de manejo e alimentação. Neste trabalho constatou-se que o número de folículos ($4,5 \pm 1,9$ vs. $8,7 \pm 5,9$) e o número de oócitos ($2,2 \pm 1,1$ vs. $4,1 \pm 2,6$) é significativamente menor em bubalinos em relação aos bovinos.

Outro fator determinante nos procedimentos de OPU/ PIV em bubalinos está relacionado à qualidade dos oócitos. Como citado anteriormente nesta revisão, há fragilidade entre as células da granulosa dos oócitos de bubalinos (Gasparrini, 2002). Além disso, verificou-se menor compactação do cumulus nesta espécie em relação aos bovinos (Ohashi *et al.*, 1998) e maior taxa de atresia folicular (Danell, 1987; Le Van Ty *et al.*, 1989).

Em estudo desenvolvido por nosso grupo de pesquisa em parceria com a Università Degli Studi di Napoli Federico II, 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 fêmeas bubalinas em anestro e obtiveram 31,3% de oócitos viáveis para a produção *in vitro* de embriões bubalinos.

Deste modo, e com base nos resultados obtidos na MOET, nosso grupo de pesquisa delineou experimentos incluindo o emprego do bST na OPU, com a finalidade de incrementar a população folicular e a qualidade dos oócitos para a PIV. Sá Filho *et al.* (2005b) avaliou o tratamento com 500 mg de rbST em fêmeas bubalinas, tendo início 4 dias antes da primeira sessão de aspiração folicular e em seguida, a cada 14 dias até o término do experimento. Tanto o grupo controle quanto o tratado foram submetidos a 10 sessões de OPU, realizadas 2 vezes por semana. O tratamento com rbST proporcionou aumento nos números de folículos aspirados ($P < 0,05$) e de oócitos recuperados ($P = 0,07$).

Posteriormente, 247 oócitos viáveis foram maturados *in vitro* (Sá Filho *et al.*, 2005a). 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/PGF2 α /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 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. Foi registrado o nascimento de 2 produtos saudáveis oriundos de embriões PIV vitrificados, entretanto, a transferência a fresco resultou em um natimorto (317 dias de gestação). A obtenção das primeiras prenhez de embriões bubalinos produzidos *in vitro* nas Américas, demonstra que é possível estabelecer um protocolo de OPU-PIV viável para a espécie.

Em outro experimento realizado pelo nosso grupo de pesquisa (Ferraz *et al.*, 2007), foram avaliados os efeitos do intervalo de aspiração folicular (uma vez por semana ou uma vez a cada 14 dias) e do uso de bST

(grupo controle ou tratado com 500 mg de rbST). Os resultados estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Efeito do tratamento com bST e do intervalo de aspiração folicular na recuperação e qualidade dos oócitos e na produção de embriões *in vitro*. Dourado – SP, 2005.

Variável	G-CONT7	G-bST7	G-CONT14	G-bST14
Nº de animais	4	4	4	4
Nº de sessões de aspiração (OPU)	64	64	32	32
Nº folículos aspirados	11.3±0.5 ^c	14.3±0.6 ^b	14.8±0.8 ^b	17.3±1.0 ^a
Nº oócitos totais	7.6±0.4 ^b	9.3±0.4 ^a	9.9±0.6 ^a	10.1±0.7 ^a
Taxa de recuperação (%)	69.3 ^a	73.6 ^a	67.4 ^a	58.5 ^b
Nº oócitos viáveis	5.5±0.4 ^b	6.8±0.4 ^a	7.6±0.5 ^a	6.8±0.6 ^a
Nº de oócitos grau 1	0.6±0.1	0.5±0.1	0.8±0.1	0.6±0.2
Nº de oócitos grau 2	0.4±0.1 ^b	0.9±0.1 ^b	1.4±0.2 ^a	0.8±0.2 ^b
Nº de oócitos grau 3	4.4±0.3	5.4±0.4	5.4±0.5	5.3±0.5
Nº oócitos degenerados	0.9±0.1 ^b	1.2±0.1 ^b	1.1±0.2 ^b	1.7±0.3 ^a
Nº oócitos com expansão do cumulus	0.1±0.0	0.2±0.1	0.1±0.1	0.3±0.1
Nº oócitos atrésicos	1.2±0.1	1.2±0.1	1.1±0.2	1.3±0.2
Nº embriões clivados	2.0±0.2	2.2±0.2	2.4±0.4	1.9±0.3
Taxa de clivagem (%)	33.4	32.7	35.1	26.0
Nº blastocistos no D6	1.0±0.2 ^a	0.5±0.1 ^b	1.2±0.3 ^a	0.4±0.1 ^b
Taxa de blastocistos no D6 (%)	13.7 ^a	13.5 ^a	6.6 ^b	7.3 ^{ab}
Nº blastocistos no D7	1.3±0.2 ^{ab}	0.7±0.1 ^b	1.7±0.4 ^a	0.8±0.2 ^b
Taxa de blastocistos no D7 (%)	18.6 ^a	19.5 ^a	9.6 ^b	13.4 ^{ab}

a ≠ b ≠ c: letras sobrescritas na mesma linha diferem entre si (P<0,05)

Fonte: Ferraz et al., 2007

Em média, a realização de OPU uma vez por semana (sem bST) reduziu o número de folículos aspirados e o número de oócitos totais e viáveis. A despeito disto, a OPU a cada 14 dias associada a 500mg de bST aumentou o número de oócitos degenerados e reduziu o número de blastocistos produzidos nos dias 6 e 7.

Embora os resultados acima mencionados demonstrem que a associação da OPU-PIV seja factível, novos estudos são necessários para o desenvolvimento de estratégias que possibilitem aumentar a eficiência de ambas as técnicas na espécie bubalina, para tentar viabilizar seu emprego comercialmente.

Agradecimentos

Às Instituições que colaboram em parceria – Universidade Estadual Paulista, Università Degli Studi di Napoli Federico II, APTA – UPD Registro. Aos produtores de bubalinos e à Associação Brasileira de Criadores de Búfalos (ABCB). Aos órgãos de fomento – FAPESP, CNPq e CAPES – pelo auxílio financeiro. Às empresas pelo fornecimento dos hormônios para o desenvolvimento de nossas pesquisas

Referências

- Adams GP.** Control of ovarian follicular wave dynamics in cattle: implications for synchronization & superstimulation. *Theriogenology*, v.41, p.19-24, 1994.
- Ali A, Abdel-Razek AK, Abdel-Ghaffar S, Glatzel PS.** Ovarian follicular dynamics in buffalo cows (*Bubalus bubalis*). *Reprod Dom Anim*, v.38, p.214-218, 2003.
- Ambrose JD, Singla SK, Sailkhani S, Prakash BS, Madan ML.** Superovulation response in buffaloes (*Bubalus bubalis*) to different treatment regimes of follitropin. *Theriogenology*, v.35, p.181, 1991. Resumo.
- 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*). São Paulo, 2003. 120f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2003.
- Baruselli PS.** Basic requirements for artificial insemination and embryo transfer in buffaloes. *Buffalo J*, v.2, suppl.2, p.53-60, 1994.
- 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, 2, 2003, Roma. *Proceedings...* Roma: CNAB, 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*, 1, 2002, Belém. *Proceedings...* Belém: UFPA, 2002. v.1, p.418-420.
- 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*, 2, 2003, Roma. *Proceedings...* Roma: CNAB, 2003b. v.1. p.261-264.
- Baruselli PS, Madureira EH, Barnabe VH.** 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. Resumo.
- 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*, 14, 2000, Stockholm. *Abstracts...* Stockholm: ICAR, 2000. v.2. p.14-18.
- Baruselli PS, Madureira EH, Visintin JA, Barnabe VH, Barnabé 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, Mucciolo, RG, Visintin JA, Viana WG, Arruda RP, Madureira EH, Molero-Filho JR.** Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*, v.47, p.1531-1547, 1997.
- Beg MA, Sanwal PC, Yadav MC.** Ovarian response and endocrine changes in buffalo superovulated at midluteal and late luteal stage of the estrous cycle: a preliminary report. *Theriogenology*, v.47, p.423-432, 1997.
- Bo GA, Martínez M, Nasser LF, Caccia M, Tribulo H, Mapletoft RJ.** Follicular dynamics in *Bos indicus* and *Bos taurus* beef cattle under pasture conditions in Argentina. *In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal*, 10, 1993, Campo Grande. *Proceedings ...* Campo Grande, MS: [s.n.], 1993. v.2, p.221.
- Boni R, Di Palo R, Barbieri V, Zicarelli L.** Ovum pick-up in deep anestrous buffaloes. *In: World Buffalo Congress*, 4, 1994, Caserta. *Proceedings...* Caserta: 1994. v.3. p.480-482.
- Boni R, Roelofsen VM, Pieterse M, Kogut J, Kruip T.** Follicular dynamics repeatability and predictability of follicular recruitment in cows undergoing repeated follicular puncture. *Theriogenology*, v.48, p.277-289, 1997.
- Boni R, Roviello S, Gasparrini B, Langella M, Zicarelli L.** In vitro production of buffalo embryos in chemically defined medium. *Buffalo J*, v.1, p.115-120, 1999.
- Campanile G, Baruselli PS, Carvalho NAT, Di Palo R, Cavalcanti AKS, Neglia G, Vecchio D, Zicarelli L.** Effect of feed restriction on ovarian activity and recovered oocyte in Murrah buffalo heifers. *Bubalus bubalis*, p.275-278, 2003.
- Carvalho NAT.** Avaliação anatomofuncional do sistema genital de fêmeas bubalinas (*Bubalus bubalis*), e suas implicações na múltipla ovulação e transferência de embriões. 2006. 132p. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- Carvalho NAT, Baruselli PS, Zicarelli L, Madureira EH, Visintin JA, D'Occhio.** Control of ovulation with a GnRH agonist after superstimulation of follicular growth in buffalo fertilization and embryo recovery. *Theriogenology*, v.58, p.1641-1650, 2002.
- 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: 2005. CD-ROM.
- Carvalho NAT, Nagasaku EM, Vannucci FS, Toledo LM, Baruselli PS.** Conception rate according intravaginal progesterone device and hCG or GnRH to induce ovulation in buffalo during the off breeding season. *In: World Buffalo Congress*, 8, 2007, Caserta, Italy. *Proceedings ...* Caserta, Italy: WBC, 2007a. Aceito para publicação.
- Carvalho NAT, Nagasaku EM, Vannucci FS, Toledo LM, Baruselli PS.** Use of DIB® and CRESTAR® to artificial insemination in buffalo during the off breeding season. *In: World Buffalo Congress*, 8, 2007, Caserta, Italy. *Proceedings ...* Caserta, Italy: WBC, 2007b. Aceito para publicação.
- Carvalho NAT, Nagasaku EM, Vannucci FS, Toledo LM, Carvalho JBP, Carvalho MIAB, Gimenés LU, Ayres H, Martiz CC, Baruselli PS.** Use of different doses of rBST associated to a protocol for multiple ovulation and embryo transfer in buffalo (*Bubalus bubalis*). *In: World Buffalo Congress*, 8, 2007, Caserta, Italy. *Proceedings ...* Caserta, Italy: WBC, 2007c. Aceito para publicação.
- Castilho C, Garcia JM, Renesto A, Nogueira GP, Brito LFC.** Follicular dynamics and plasma FSH and progesterone concentrations during follicular deviation in the first post-ovulatory wave in Nelore (*Bos indicus*) heifers. *Anim Reprod Sci*, v.98, p.189-196, 2006.
- 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.
- Drost M, Wright Junior JM, Cripe WS, Richter AR.** Embryo transfer in water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*, v.20, p.549-585, 1983.

- Ferraz ML, Gimenes LU, Sá Filho MF, Watanabe YF, Joaquim DC, Accorsi MF, Meirelles FV, Baruselli PS. Effect of OPU interval and bST treatment on embryo production in buffalo. *In: World Buffalo Congress*, 8, 2007, Caserta, Italy. *Proceedings ...* Caserta, Italy: WBC, 2007c. Aceito para publicação.
- Figueiredo RA, Barros CM, Pinheiro OL, Sole JMP. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. *Theriogenology*, v.47, p.1489-1505, 1997.
- Food And Agriculture Organization – FAO. FAOSTAT: Agriculture data. Disponível em: <http://faostat.fao.org/faostat/collections>. 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. Resumo.
- Gasparrini B. *In vitro* embryo production in buffalo species: state of the art. *Theriogenology*, v.57, p.237-256, 2002.
- Gimenes LU. *Estudo da divergência folicular e da capacidade ovulatória em bubalinos (Bubalus bubalis) e zebuínos (Bos indicus)*. São Paulo, 2006. 113f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- Ginther OJ, Knopf L, Kastelic JP. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two or three follicular waves. *J. Reprod. Fert.*, v.87, p.223-230, 1989.
- Ginther OJ, Wiltbank MC, Fricke PM, Gibbons JR, Kot K. Selection of the dominant follicle in cattle. *Bio. Reprod*, v.55, p.1187-1194, 1996.
- Kastelic JP, Bergfelt DR, Ginther OJ. Relationship between ultrasonic assessment of the corpus luteum and plasma progesterone concentration in heifers. *Theriogenology*, v.33, p.1269-1278, 1990.
- Hunter RHF. *The fallopian tubes: their role in fertility and infertility*. Berlin: Springer-Verlag, 1988. p.12-156.
- 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.
- Le Van Ty, Chupin D, Driancourt DA. Ovarian follicular population in buffaloes and cows. *Anim Reprod Sci*, v.19, p.171-178, 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.
- Madan ML, Das SK, Palta P. Application of reproductive technology to buffaloes. *Anim Reprod Sci*, v.42, p.299-306, 1996.
- Manik RS, Madan ML, Singla SK. Ovarian follicular dynamics in water buffaloes (*Bubalus bubalis*): ultrasonically monitoring individual follicles for wave hypothesis. *Theriogenology*, v. 41, p.246, 1994. Resumo.
- Misra AK, Joahi BV, Agrawala PL, Kasiraj R, Sivaian S, Rangareddi NS, Siddiqui MU. Multiple ovulation and embryo transfer in indian buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*, v.33, p.1131-1141, 1990.
- Misra AK, Kasiraj R, Mutha Rao MM, 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 A. J. D. R. Sincronização da ovulação com dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR®) associado a estrógeno e prostaglandina F_{2α} em búfalas (*Bubalus bubalis*) tratadas em estações reprodutivas distintas. 2003. 129 f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.
- Ohashi OM, Souza JS, Vale WG, Silva AOA. The use of assisted reproduction technology (ART) in buffalo and zebu. *In: Follow-up Seminar on Animal Reproduction and Biotechnology for Latin America*, 4, 1998, Belém. *Proceedings...* Belém: UFPA, 1998. v.1, p.71-79.
- 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*, 2, 2004, Corrientes. *Proceedings ...* Corrientes: 2004. CD-ROM.
- Rhodes FM, De'ath G, Entwistle KW. Animal and temporal effects on ovarian follicular dynamics in Brahman heifers. *Anim Reprod Sci*, v.38, p.265-277, 1995.
- 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. *Acta Sci Ve*, v.33, p.431, 2005a. Resumo.

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, MG: CBRA, 2005b. CD-ROM.

Sartorelli ES, Carvalho LM, Bergfelt DR, Ginther OJ, Barros CM. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. *Theriogenology*, v.63, p.2382-2394, 2005.

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.377-84, 1999.

Taneja M, Singh G, Totey SM, Ali A. Follicular dynamics in water buffalo superovulated in presence or absence of a dominant follicle. *Theriogenology*, v.44, p.581-597, 1995.

Thatcher WW, Bilby TR, Bartolome JA, Silvestre F, Staples CR, Santos JE. Strategies for improving fertility in the modern dairy cow. *Theriogenology*, v.65, p.30-44, 2006.

Zicarelli L, Baruselli PS, Campanile G, Di Palo R, Gasparrini B, Neglia G, D'Occhio MJ. Embryo recovery in buffalo with timed ovulation and insemination subsequent to follicle superstimulation. *In: International Congress of Animal Reproduction*, 14, 2000, Stockholm. *Proceedings...* Stockholm: ICAR, 2000.v.2.p.16-19.

Zicarelli L, Boni R, Pacelli C, Esposito L, Spadetta M. Superovulation in italian mediterranean buffaloes using FSH-p with diferent treatments. *In: World Buffalo Congress*, 4, 1994, São Paulo. *Proceedings ...* São Paulo, SP: WBC, 1994a. v.3, p.462-464.

Zicarelli L, Di Palo R, Campanile G, Boni R, Langella M. rBST+FSH-p in superovulatory treatment of italian mediterranean buffaloes. *In: World Buffalo Congress*, 4, 1994, São Paulo, Brazil. *Proceedings ...* São Paulo, SP: WBC, 1994b. v.3, p.459-461.
