

Eficiência uso da inseminação artificial em búfalos

Artificial Insemination efficiency in buffalo

Pietro Sampaio Baruselli¹, Nelcio Antônio Tonizza Carvalho², José Octavio Jacomini³

¹Departamento de Reprodução Animal, FMVZ-USP; ²Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Registro – APTA, Vale do Ribeira, SP; ³Universidade Estadual de Uberlândia, MG.

E-mail: barusell@usp.br

Resumo

O uso da Inseminação Artificial (IA) em búfalos pode ser limitado por fatores relacionados à dificuldade de identificação do estro e à determinação do melhor momento para a realização desta biotecnologia. Neste contexto, estudos foram conduzidos para a elaboração de protocolos que permitam o uso da IA sem a necessidade de detecção do estro, ou seja, em tempo fixo (IATF). O conhecimento da dinâmica folicular nessa espécie possibilitou o desenvolvimento de protocolos para controlar as fases folicular e luteínica do ciclo estral e, por fim, a ovulação. Foi verificado que a emergência da onda de crescimento folicular pode ser sincronizada pelos tratamentos com GnRH ou com progesterona/progestágeno (P4) associados ao estradiol (E2). O tratamento com dispositivos/implantes de P4 e com PGF_{2α} controlam a fase luteínica. Ao final do protocolo, sob baixos níveis de progesterona, realiza-se a indução da ovulação com GnRH, ou hCG, ou LH ou E2. Em búfalas inseminadas em tempo fixo o protocolo GnRH/PGF_{2α}/GnRH (conhecido como Ovsynch) tem apresentado resultados satisfatórios (~50% de taxa de prenhez) em animais ciclando durante a estação reprodutiva (outono e inverno). A utilização de P4 associado ao E2, PGF_{2α}, eCG e GnRH possibilita a realização da IATF com aceitáveis taxas de concepção (~50% de taxa de prenhez) em búfalas em anestro sincronizadas fora da estação reprodutiva (primavera e verão). A combinação destes tratamentos de sincronização da ovulação permite o uso da inseminação artificial durante todo o ano, possibilitando o melhoramento genético e a distribuição da concepção e dos partos conforme a demanda do mercado.

Palavras-chave: inseminação artificial, sincronização da ovulação, progesterona, búfalo.

Keywords: *artificial insemination, ovulation synchronization, progesterone, buffalo*

Introdução

Um dos principais fatores que prejudicam o desempenho da IA nos rebanhos é a baixa eficiência de detecção do estro. O manejo correto para detecção do estro requer contínuas observações do rebanho por profissionais qualificados (mínimo de 2 observações diárias com uma hora de duração durante todos os dias da estação reprodutiva). Rebanhos com ineficiência na detecção do estro apresentam diminuição no desempenho reprodutivo, com conseqüente aumento do período de serviço e do intervalo entre partos. Devido a esses entraves, muitos criadores não utilizam essa importante biotecnologia para o melhoramento genético de seus rebanhos.

Para facilitar o manejo e aumentar a eficiência da IA foram desenvolvidos protocolos que dispensam a necessidade de detecção do estro. O objetivo destes protocolos é sincronizar a fase luteínica, o crescimento folicular e a ovulação, permitindo o uso da inseminação artificial em tempo fixo (IATF), mesmo em animais que não estão apresentando sinais de estro ou de ciclicidade. O uso destes protocolos tem colaborado para a difusão da técnica de IA em diversos rebanhos no Brasil e no mundo, possibilitado o melhoramento genético, com conseqüente aumento nas produções de carne e de leite.

Em bubalinos, desde o final da década de noventa, foram realizadas pesquisas com o objetivo de avaliar a eficácia de diferentes protocolos de sincronização da ovulação para IATF (Baruselli, 1999; Baruselli *et al.*, 1999b, 2000). Os dados são indicativos de que é possível obter resultados satisfatórios com o emprego dessa tecnologia. No entanto, verificou-se que a estacionalidade reprodutiva interfere na eficiência dos protocolos de IATF. Durante a estação reprodutiva (outono e inverno), em rebanhos com alta taxa de ciclicidade, nota-se que as búfalas respondem adequadamente ao protocolo Ovsynch. Entretanto, fora da estação reprodutiva (primavera e verão), a maioria das búfalas manifestam prolongados períodos de anestro e não respondem adequadamente ao tratamento com GnRH. Nesse período, verificou-se que os animais respondem somente a tratamentos distintos (progesterona, estradiol, PGF, eCG e GnRH). Dessa forma, torna-se importante conhecer e diferenciar os protocolos para serem utilizados em búfalas de acordo com a estação reprodutiva e o estado de ciclicidade dos rebanhos.

Assim, o objetivo desta revisão é apresentar e discutir os resultados de pesquisas realizadas pelo nosso grupo sobre a sincronização da ovulação para o emprego da IATF, com a proposta de fornecer informações que

possibilitem a utilização adequada e o aumento do uso da inseminação artificial em rebanhos comerciais de búfalos.

Sincronização da ovulação para IATF durante a estação reprodutiva favorável

Nosso grupo avaliou a eficiência da associação de GnRH e PGF_{2α} na sincronização da ovulação para IATF em búfalas (Baruselli *et al.*, 1999a, b). Para avaliar a eficiência desse protocolo foi necessário estudar previamente a resposta folicular aos tratamentos, levando em consideração estudos prévios da folliculogênese na espécie (Baruselli, 1997; Baruselli *et al.*, 1997). Portanto, o objetivo da primeira parte dos nossos experimentos foi acompanhar a resposta das búfalas ao protocolo Ovsynch por meio do estudo da dinâmica folicular (Baruselli *et al.*, 1999a). Neste estudo, as búfalas receberam 10 (n = 16) ou 20 µg (n = 17) de Buserilina (GnRH) durante o período pós-parto (média de 60 dias). Sete dias mais tarde, os animais receberam PGF_{2α}. Dois dias após a administração de PGF_{2α}, as búfalas receberam 10µg de GnRH e foram inseminadas 16h mais tarde. Foi observado que 60,6% dos animais ovularam após o 1º GnRH, 33,0 ± 8,3 horas após o tratamento. As búfalas que ovularam apresentaram maior diâmetro do folículo dominante no momento do tratamento, comparado com às que não ovularam (9,5 ± 1,7 vs. 6,7 ± 2,4 mm, P < 0,01). A 1ª dose de GnRH (10 vs. 20 µg) não interferiu na taxa e no momento da ovulação (P > 0,05).

No momento da aplicação de PGF_{2α}, as búfalas apresentaram folículos de 10,3 ± 2,0 mm, sugerindo sincronização da emergência da onda de crescimento folicular. Neste momento, os animais que ovularam ao 1º GnRH (n = 20) apresentaram maiores concentrações plasmáticas de progesterona (P4) que aqueles que não ovularam (2,56 ± 1,02 vs. 1,26 ± 0,82 ng/ml; P < 0,05). Esses dados sugerem que as búfalas que ovularam após o 1º GnRH formaram um novo corpo lúteo (CL). Foi observado que 100% dos animais apresentaram concentrações de P4 abaixo de 1ng/ml 48h após o tratamento com PGF_{2α}, indicando alta eficiência luteolítica.

Os animais que não ovularam ao 1º GnRH apresentaram intervalo mais curto entre o 2º GnRH e a ovulação, quando comparados àqueles que ovularam (22,2 ± 10,4 vs. 33,9 ± 4,9 h; P < 0,05), provavelmente devido à menor sincronização da onda de crescimento folicular. Esses dados sugerem que búfalas que apresentam folículos dominantes com diâmetro superior (normalmente encontrado em búfalas ciclando) respondem melhor ao 1º GnRH e sincronizam mais eficientemente a ovulação.

O objetivo da segunda parte dos experimentos foi determinar a taxa de prenhez (TP) à IATF em búfalas tratadas para a sincronização da ovulação com GnRH/PGF_{2α}/GnRH durante as estações reprodutiva favorável e desfavorável (Baruselli *et al.*, 1999b). Para isso, foram sincronizadas e inseminadas em tempo fixo 1053 búfalas em lactação. O efeito do escore de condição corporal (ECC; escala de 1 a 5), do número de partos, do período pós-parto e da estação reprodutiva na TP foram analisados.

Búfalas com ECC ≤ 3,0 apresentaram TP de 31,4% (n = 223), inferiores (P < 0,05) às fêmeas com ECC 3,5 (52,9%; n = 546) e ECC 4,0 (57,1%; n = 198). Outros estudos demonstram forte influência do ECC na taxa de concepção de búfalas submetidas à IA tradicional (Bhalaru *et al.*, 1987; Baruselli *et al.*, 2001b). Rasby *et al.* (1992) relataram que a restrição alimentar tem influencia negativa na liberação de LH e que animais em anestro apresentam diminuição no diâmetro do folículo dominante com conseqüente redução na taxa de ovulação ao tratamento com GnRH. Outros estudos também demonstram efeito negativo do baixo ECC na ciclicidade ovariana em bovinos de corte (D'Occhio *et al.*, 1990; Viscarra *et al.*, 1998). De acordo com DeRouen *et al.* (1994) o ECC é utilizado como indicador do estatus energético e do potencial reprodutivo no período pós-parto. Assim, os resultados apresentados sugerem que búfalas com ECC ≥ 3,5 apresentam maiores taxas de prenhez quando sincronizadas com GnRH/PGF_{2α}/GnRH para IATF.

Taxas de prenhez reduzidas foram verificadas em primíparas comparadas às múltiparas [35,5% (49/138) vs. 51,0% (423/829); P < 0,05]. Provavelmente, a diminuição na TP em primíparas ocorreu devido ao aumento no número de animais em anestro pós parto, uma vez que essa categoria apresenta maior exigência nutricional. O adequado manejo nutricional de primíparas pode colaborar para o aumento da ciclicidade e da TP à IATF. No entanto, caso todas as búfalas do rebanho estejam sob o mesmo manejo nutricional, especialmente no caso de búfalas mantidas a pasto, as múltiparas apresentam melhor resposta à sincronização e prenhez à IATF.

Búfalas inseminadas com pós-parto inferior a 60 dias apresentaram a mesma TP (50,9%; 170/334) que búfalas inseminadas entre 60 e 99 dias (48,2%; 158/328) e com mais de 100 dias (47,2%; 144/305). Estes resultados são indicativos de que é possível obter satisfatório desempenho reprodutivo utilizando protocolos de IATF entre 40 e 60 dias pós parto, conferindo às búfalas inseminadas intervalos entre partos próximo a 12 meses.

As búfalas tratadas durante a estação reprodutiva (outono e inverno) apresentaram maior TP que as tratadas fora da estação reprodutiva [48,8% (472/967) vs. 6,9% (6/86)]. Esse resultado é indicativo de que, mesmo com estimulação hormonal exógena utilizando GnRH e PGF_{2α}, as búfalas continuam apresentando marcante estacionalidade. Essa característica reprodutiva da espécie tem sido demonstrada em vários trabalhos científicos (Zicarelli, 1994, 1997; Baruselli, 1994). Os dados apresentados sugerem que búfalas em anestro estacional não respondem ao protocolo Ovsynch.

As pesquisas supracitadas demonstram que o uso do protocolo Ovsynch para IATF em búfalas possibilita resultados satisfatórios. No entanto, para a obtenção de melhores resultados, as fêmeas devem

apresentar bom ECC, serem preferencialmente múltiparas e estarem ciclando durante a estação reprodutiva favorável (outono e inverno).

Nosso grupo também avaliou a eficiência de outro análogo de GnRH no protocolo Ovsynch (Lecirelina, Gestran Plus[®]; Baruselli *et al.*, 2001a). Animais tratados com Lecirelina foram comparados a animais tratados com Buserelina (Conceptal[®]). Não foi verificada diferença entre os tratamentos [Lecirelina = 50% (69/138) vs. Buserelina = 47% (62/132)], demonstrando a possibilidade de utilização também de Lecirelina em búfalas sincronizadas para IATF.

Na seqüência, nosso grupo avaliou o efeito da substituição do 2º GnRH do protocolo Ovsynch por LH (Berber *et al.*, 2002) ou por hCG (Carvalho *et al.*, 2004). Estes fármacos foram utilizados com o objetivo de aumentar a taxa de ovulação e a eficiência do protocolo, por agirem diretamente no folículo (enquanto o GnRH estimula a hipófise para liberar LH). Assim, em casos de escassez de estoque ou comprometimento na liberação de LH pela hipófise, o GnRH não induziria corretamente o pico de LH e, conseqüentemente, não ocorreria a ovulação. Nesses estudos, conduzidos durante a estação reprodutiva favorável, não foram observadas diferenças nas TP após a IATF de búfalas sincronizadas com LH [GnRH/PGF_{2α}/GnRH = 56,5% (87/154) vs GnRH/PGF_{2α}/LH = 64,2% (97/151)] ou com hCG [GnRH/PGF_{2α}/GnRH = 46,8% (44/94) vs GnRH/PGF_{2α}/hCG = 50,8% (60/118)], não confirmando a hipótese inicial.

Outro estudo avaliou a eficiência do tratamento com dispositivo intravaginal de P4 (1,9g de P4; CIDR-B[®]) associado ao protocolo Ovsynch (Baruselli *et al.*, 2003b). Assumimos a hipótese de que o uso de P4 exógena associada ao protocolo Ovsynch poderia elevar as concentrações plasmáticas de P4 durante o tratamento e, portanto, melhorar a sincronização da ovulação e, conseqüentemente a TP. As búfalas foram divididas em dois grupos: protocolo Ovsynch tradicional (Grupo controle; n = 65) e Ovsynch + P4 (Grupo P4; n = 106). As búfalas no Grupo P4 receberam um CIDR-B[®] no momento da aplicação do 1º GnRH (D0). O CIDR-B[®] foi removido sete dias mais tarde, no momento da aplicação de PGF_{2α} (D7). Os animais de ambos os grupos receberam o 2º GnRH 48h após a aplicação de PGF_{2α} (D9) e foram inseminados 16h mais tarde (D10). A TP foi similar entre os grupos [55,4% (36/65) para o Grupo controle e 57,5% (61/106) para o Grupo P4; P > 0,05]. A adição de P4 intravaginal no protocolo Ovsynch não aumentou a TP em búfalas submetidas à IATF durante a estação reprodutiva favorável e a hipótese inicial não foi confirmada.

Na tentativa de aumentar a TP de búfalas sincronizadas para IATF, realizamos outro estudo com o objetivo de formar um CL acessório após a IATF (Carvalho *et al.* 2007d). A hipótese do estudo foi de que o tratamento com GnRH seis dias após a IATF induz a ovulação do folículo dominante da primeira onda de crescimento folicular, a formação de CL acessório, o aumento na concentração plasmática de P4 e a TP. Para tanto, foram utilizadas 240 búfalas divididas em dois grupos: Grupo Ovsynch (GnRH no D0, PGF_{2α} no D7, GnRH no D9 e IATF no D10; n = 142) e Grupo CL acessório (mesma seqüência do Grupo Ovsynch com a aplicação de mais uma dose de GnRH no D16; n = 98). Foi verificado que o tratamento com GnRH no dia 16 do protocolo proporcionou maior TP [58,2% (57/98) vs. 46,5% (66/142), P < 0,05]. Os resultados são indicativos de que a utilização de GnRH seis dias após a IATF no protocolo Ovsynch aumenta a TP em búfalas.

Com o objetivo de reduzir os custos do tratamento de sincronização, foi avaliada a eficiência de meia dose de PGF_{2α} (d-cloprostenol) no protocolo Ovsynch (Baruselli *et al.*, 2003a). A TP não foi influenciada pela dose de PGF_{2α} (P > 0,05), sendo de 48,0% (60/125) para o Grupo ½ dose (75µg) e de 40,9% (56/137) para o Grupo dose recomendada (150µg). Foi observado que 88,6% (n = 35) das búfalas do Grupo ½ dose e 90,0% (n = 30) do Grupo dose recomendada apresentaram luteólise com diminuição na concentração plasmática de P4 para menos de 1ng/ml 48h após o tratamento com PGF_{2α} (P > 0,05).

Sincronização da ovulação para IATF durante a estação reprodutiva desfavorável

Como relatado previamente, o protocolo Ovsynch proporciona baixa taxa de concepção após a IATF em búfalas durante a estação reprodutiva desfavorável (primavera e verão). Nesta estação, as búfalas apresentam alta incidência de anestro, o que aumenta o intervalo parto concepção e, conseqüentemente, afeta negativamente o desempenho reprodutivo. Prévios estudos conduzidos com vacas em anestro pós parto demonstraram que o tratamento com P4 proporciona aumento na pulsatilidade de LH (Rhodes *et al.*, 2002). O tratamento de vacas em anestro com P4 resulta no aumento das concentrações de E2, elevando a pulsatilidade da secreção de LH e o número de receptores para esta gonadotrofina nas células da teca e da granulosa de folículos pré-ovulatórios (Rhodes *et al.*, 2003). Além disso, a elevação nas concentrações plasmáticas de P4 durante o período de anestro é importante para a expressão do estro e para a subseqüente função luteínica (McDougall *et al.*, 1992). Assim, foi hipotizado que a exposição de búfalas em anestro à P4 exógena pode estimular o desenvolvimento e a maturação do folículo dominante por aumentar a liberação de LH e por estimular o desenvolvimento de receptores para essa gonadotrofina, aumentando assim a secreção de E2 e, promovendo a ovulação.

Nesse sentido, nosso grupo realizou estudos para avaliar diferentes tratamentos com progesterona/progestágeno em associação ao E2 para sincronizar a ovulação em búfalas. Para avaliar a resposta folicular à sincronização da ovulação foram utilizados dispositivos intravaginais de P4 e implante auricular de

Norgestomet (progestágeno; Bartolomeu *et al.*, 1999). Um grupo foi tratado com dispositivo intravaginal de P4 (CIDR-B[®]) durante nove dias, associado a 1mg de Benzoato de Estradiol intramuscular (BE; IM). No dia 9, todos os animais receberam PGF_{2α}. O segundo grupo recebeu um implante auricular contendo 3mg de Norgestomet (CRESTAR[®]) durante nove dias. Neste grupo, as búfalas receberam 5mg de Valerato de Estradiol IM (VE) e 3mg de norgestomet IM no momento da inserção do implante. Exames ultrasonográficos foram realizados diariamente para o estudo da dinâmica folicular. Foi observado que apenas 20% das búfalas tratadas com CRESTAR[®] associado à VE+Norgestomet iniciaram nova onda de crescimento folicular. Essa onda teve início somente 8,7 ± 0,3 dias após o o tratamento e apenas uma búfala ovulou (6,7%; 1/15) ao final do protocolo. Provavelmente a quantidade e a propriedade química do E2 administrado na inserção do implante (5mg de VE) podem ter contribuído para inibir a liberação de FSH e de LH, suprimindo a emergência e o crescimento folicular. No grupo CIDR+BE, 93,3% (14/15) das búfalas iniciaram uma nova onda de crescimento folicular 5,5 ± 0,2 dias após o início do tratamento e, 53,3% ovularam ao final do protocolo. Em outro experimento (Bartolomeu, 2003), quando a administração de 5mg de VE foi substituída por 1mg de BE em animais que receberam implante auricular de Norgestomet, a emergência da nova onda de crescimento folicular iniciou 3,0 ± 0,0 dias após o tratamento e nenhuma supressão no crescimento folicular foi observada. Esses dados são sugestivos de que o uso do protocolo com CRESTAR[®] associado à administração de 5mg de VE não é eficiente para a sincronização do estro e da ovulação em búfalas. Assim, a substituição do tipo de estrógeno administrado no início do tratamento (VE por BE) aumenta a eficiência do protocolo de sincronização da ovulação em búfalas.

Estudos têm demonstrado que a taxa de ovulação ao final do tratamento com progestágeno pode apresentar comprometimento de acordo com a profundidade do anestro (Baruselli *et al.*, 2004). Assim, a estimulação com gonadotrofina pode colaborar na melhora da resposta folicular ao protocolo de sincronização.

A gonadotrofina coriônica equina (eCG) possui ação FSH e LH e, a administração deste fármaco estimula o crescimento folicular e a ovulação em bovinos (Soumano e Price, 1997). A inserção do implante auricular de Norgestomet ou do dispositivo intravaginal de P4, combinado à administração de eCG no momento da retirada do implante/dispositivo tem sido utilizada para aumentar as taxas de ovulação e de prenhez em vacas *Bos indicus* com alta incidência de anestro pós-parto (Baruselli *et al.*, 2004). A utilização de 400UI de eCG no momento da remoção do dispositivo de P4 resulta em aumento nas taxas de ovulação e de concepção em vacas sem CL no momento da inserção do dispositivo (Baruselli *et al.*, 2003d). Ainda, foi verificado que o tratamento com eCG aumentou a concentração plasmática de P4 no diestro do ciclo subsequente ao tratamento (Baruselli *et al.*, 2004). Portanto, o tratamento com eCG pode ser uma ferramenta importante para aumentar a TP em protocolos de IATF em búfalas em anestro.

Realizamos estudos para verificar a eficiência da administração de eCG no momento da remoção do dispositivo intravaginal de P4 em búfalas (Porto Filho, 2004). As búfalas receberam um dispositivo de P4 associado a 2mg de BE no D0. No D9, o dispositivo foi removido e uma dose de PGF_{2α} foi administrada. No grupo controle não foi administrado eCG e, no Grupo eCG, foi administrado 500UI por via IM no momento da remoção do dispositivo. A resposta folicular foi monitorada por ultra-sonografia. Foi verificada taxa de ovulação de 44,4% no Grupo controle e 70,0% no Grupo eCG. Esse resultado corrobora os efeitos benéficos da eCG em búfalas sincronizadas durante a estação reprodutiva desfavorável.

Na seqüência, nosso grupo avaliou dois protocolos para sincronização da ovulação para IATF em búfalas (Ovsynch vs. P4+BE+eCG+hCG; Baruselli *et al.*, 2002). Nesse estudo, os animais do Grupo P4+BE+eCG+hCG receberam um dispositivo de P4 (CIDR-B[®]) mais a administração de 2mg BE (D0). O dispositivo foi removido e uma dose de PGF_{2α} mais 500UI de eCG foram administrados no D9. Após dois dias do tratamento (D11) as búfalas receberam 1.500UI de hCG por via IM. As fêmeas foram inseminadas 14h após o tratamento com hCG (D12). A TP foi maior nos animais tratados com P4+EB+eCG+hCG [53,5% (46/86)] comparado aos animais tratados com GnRH/PGF_{2α}/GnRH [28,2% (11/39); P < 0,01]. A baixa TP observada em búfalas sincronizadas com o protocolo Ovsynch durante a estação reprodutiva desfavorável está de acordo com prévios estudos (Baruselli *et al.*, 1999b). A TP das búfalas tratadas com P4+EB+eCG+hCG foi considerada satisfatória, uma vez que os animais receberam uma única inseminação (62h após a remoção do CIDR-B[®]) e o protocolo foi realizado na estação reprodutiva desfavorável.

A utilização desse protocolo pode possibilitar a distribuição mais homogênea dos partos e da produção de leite durante o ano. Contudo, o custo do protocolo é mais elevado do que o do protocolo Ovsynch. Dessa forma, torna-se importante criar alternativas para permitir a redução dos custos sem prejudicar a eficiência do protocolo.

Nosso grupo procurou diminuir os custos do protocolo reduzindo a dose dos fármacos. O primeiro estudo tentou avaliar a eficiência da redução da dose de hCG (Baruselli *et al.*, 2003c). As búfalas receberam um dispositivo de P4 (1g de P4; DIB[®]) associado a 2mg de BE IM (D0). No D9, o dispositivo foi removido e foram administrados PGF_{2α} mais 500UI eCG por via IM. No D11, as búfalas foram divididas em dois grupos que receberam 1.500 (n = 91) ou 1.000 UI de hCG IM (n = 83). As búfalas foram inseminadas 14h após a administração de hCG (D12). A TP foi de 53,8% (49/91) nos animais que receberam 1.500 UI e de 53,0% (44/83) nos tratados com 1.000 UI de hCG (P > 0,05). Em outro experimento foi verificada a resposta folicular desses tratamentos por ultra-sonografia (Porto Filho *et al.*, 2004a) e confirmou-se que a diminuição da dose de

hCG (de 1.500 para 1.000 UI) não comprometeu a taxa de ovulação. Portanto, foi verificado que a redução da dose de hCG é uma ferramenta viável para minimizar os custos do protocolo de IATF durante a estação reprodutiva desfavorável.

Na seqüência, procurou-se reduzir a dose da eCG. Cento e cinco búfalas foram divididas aleatoriamente de dois grupos. Todas as búfalas receberam um dispositivo de P4 (DIB[®]) associado a 2mg de BE (D0). O dispositivo foi removido e foi administrado PGF_{2α} (D9). Neste dia, um grupo de búfalas recebeu por via IM 500 e outro 400 UI de eCG. Após dois dias (D11), todas as búfalas receberam 1.000UI de hCG. As búfalas foram inseminadas 14h após a administração de hCG. Nenhuma diferença foi verificada entre os grupos ($P > 0,05$). A TP foi de 42,6% (23/54) e de 43,1% (22/51), para os animais tratados com 500 e 400 UI de eCG, respectivamente (Porto Filho *et al.*, 2004b). Os resultados corroboram os obtidos em trabalho subsequente no qual foi estudada a dinâmica folicular (Porto Filho *et al.*, 2004a). Foi verificado que a redução de 500 para 400 UI de eCG não influenciou a resposta folicular de búfalas sincronizadas. Dessa forma, o uso de 400UI de eCG para sincronizar a ovulação de búfalas para IATF apresenta eficácia satisfatória. Assim, a redução da dose de eCG também é uma alternativa viável para minimizar os custos do tratamento para IATF.

Outro estudo foi conduzido para avaliar a eficiência do dispositivo de P4 (DIB[®]) de segundo uso. A TP foi similar entre o dispositivo novo (51,6%; 64/124) e o dispositivo de segundo uso (52,5; 62/118; $P > 0,05$; Carvalho *et al.* 2007b). Posteriormente, foi avaliada a eficiência do dispositivo de P4 de segundo uso comparado ao dispositivo de terceiro uso (DIB[®]). Nenhuma diferença foi verificada na TP de dispositivos de segundo (56,9 %; 70/123) e de terceiro uso (55,3%; 68/123; Carvalho *et al.*, 2007a). A dinâmica folicular foi avaliada em ambos os experimentos e, nenhuma diferença foi observada no momento e na taxa de ovulação. Estes resultados indicam que o uso do dispositivo de P4 por até três vezes proporciona satisfatória TP em búfalas sincronizadas para IATF, possibilitando também a redução nos custos do protocolo para IATF.

A eficiência de diferentes indutores de ovulação (hCG ou GnRH) na dinâmica folicular (Carvalho *et al.*, 2005) e TP (Carvalho *et al.*, 2007b) foi estudada. O GnRH apresenta preços inferiores ao hCG e pode reduzir os custos do protocolo de sincronização da ovulação. Nestes estudos não foram verificadas diferenças na resposta folicular e na TP entre os grupos. As búfalas tratadas com GnRH ou hCG apresentaram similares taxas de ovulação [76,5% (13/17) vs 81,3% (13/16)] e intervalo entre a remoção do dispositivo e a ovulação [$74,8 \pm 3,6$ h vs $72,9 \pm 3,7$ h]. Além disso, similares TP foram verificadas entre os animais tratados com hCG (52,3%; 68/130) e com GnRH (51,8%; 58/112; $P > 0,05$). Estes resultados indicam que a substituição do hCG pelo GnRH proporciona semelhante TP e pode também colaborar para a redução do custo do protocolo.

Em outro estudo, foi avaliada a eficiência da redução da dose de GnRH (10 vs 20 µg de buserilina) no protocolo com dispositivo de P4 (Carvalho *et al.*, 2007a). A TP não foi influenciada pela dose de GnRH ($P > 0,05$) e foi de 57,3% (67/117) para o grupo que recebeu 10µg e de 55,0% (71/129) no grupo tratado com 20µg de buserilina. Os resultados do presente estudo são indicativos de que a dose de 10mg de buserilina é suficiente para indução da ovulação com satisfatória taxa de concepção, permitindo a redução do custo do protocolo de sincronização da ovulação para IATF na espécie bubalina.

Em outro estudo foi avaliado o efeito do dispositivo intravaginal de P4 e do implante auricular de Norgestomet (CRESTAR associado a 2mg de BE no momento da inserção do implante) na resposta folicular e na TP (Carvalho *et al.*, 2007c). Neste estudo foi verificado que búfalas tratadas com DIB e CRESTAR apresentaram similares diâmetros do folículo dominante na retirada da fonte de P4 ($1,0 \pm 0,1$ vs. $1,0 \pm 0,1$ cm), do folículo ovulatório ($1,3 \pm 0,1$ vs. $1,3 \pm 0,0$ cm), do intervalo entre a administração do GnRH e a ovulação ($29,1 \pm 3,1$ vs. $29,0 \pm 4,4$ h), da taxa de ovulação [77,8% (7/9) vs. 92,3% (12/13)] e da TP [43,7% (14/32) vs. 50,0% (28/56)]. Ambos os tratamentos proporcionaram semelhantes respostas foliculares e TP em búfalas durante a estação reprodutiva desfavorável.

Sincronização da ovulação para IATF durante todo o ano

Atualmente é possível sincronizar a ovulação para IATF de búfalas durante todo o ano com satisfatória eficiência, mesmo em localidades onde os búfalos apresentam evidente estacionalidade reprodutiva. O protocolo conhecido como Ovsynch pode ser utilizado durante as estações de outono e inverno (estação reprodutiva favorável) em búfalas ciclando e, o protocolo com P4+BE+eCG+GnRH pode ser utilizado durante todo o ano e, principalmente, na primavera e verão (estação reprodutiva desfavorável) em búfalas em anestro.

Conclusão

A pecuária mundial necessita de práticas eficientes de manejo e de tecnologias que permitam o aumento na produtividade dos rebanhos, com conseqüente incremento no retorno econômico. Nesse contexto, a utilização da inseminação artificial é de grande importância, particularmente por introduzir eficientemente material genético superior nos rebanhos bubalinos. Contudo, a sazonalidade reprodutiva e a dificuldade de detectar o estro das búfalas limitam a aplicação da IA em larga escala e o sucesso desta tecnologia. A utilização das técnicas que controlam o desenvolvimento folicular e a ovulação tem reduzido os problemas referentes à



deteção do cio. O desenvolvimento folicular pode ser controlado pelo tratamento com GnRH associado à PGF_{2α} sete dias mais tarde, uma outra administração de GnRH 48h após a PGF_{2α} seguida da IATF 16 horas após (protocolo Ovsynch). Este protocolo tem apresentado aceitáveis taxas de prenhez a IATF em búfalas ciclando durante a estação reprodutiva favorável. Além dessa possibilidade, tratamentos com progesterona/progestágeno em associação ao benzoato de estradiol, eCG e GnRH possibilitam a utilização da IATF durante a estação reprodutiva desfavorável, proporcionando o retorno à atividade reprodutiva de búfalas em anestro. Atualmente, existe tecnologia para o emprego da IATF durante o ano todo, garantindo satisfatórias taxas de concepção e distribuição das parições conforme a demanda do mercado.

Agradecimentos

Aos bubalinocultores, à Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Registro – APTA - Vale do Ribeira e à Associação Brasileira de Criadores de Búfalos (ABCB) pelo apoio, incentivo e confiança em nosso trabalho. À FAPESP (Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo) e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo financiamento de projetos de pesquisa e de capacitação científica na área de reprodução bubalina.

Referências

- 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, 2003.
- Bartolomeu CC, Del Rei JA, Madureira EH, Carvalho NAT, Barnabe RC, Baruselli PS.** Sincronização do ciclo estral e da ovulação com utilização de CIDR-B e CRESTAR em bubalinos. *Arq Fac Vet UFRGS*, v.27, p.208, 1999. (Resumo).
- Baruselli PS.** Basic requirements for artificial insemination and embryo transfer in buffaloes. *Buffalo J*, suppl.2, p.53-60, 1994.
- Baruselli PS.** Folliculogenesis in buffalo. *Bubalus bubalis*, v.4, suppl, p.79-92, 1997.
- Baruselli PS.** Inseminação artificial em tempo fixo com sincronização da ovulação em bubalinos. In: Barnabe WH, Tonhati H, Baruselli PS. (Ed.). *Bubalinos: sanidade, reprodução e produção.* Jaboticabal: FUNEP, 1999. p.126-142.
- Baruselli PS, Amaral R, Barufi FB, Valentim R, Marques MO.** Lecirelin and Buserilin (Gonadotrophin releasing hormone agonists) are equally effective for fixed time insemination in buffalo. *Braz J Vet Anim Sci*, v.38, p.142-145, 2001a.
- Baruselli PS, Barnabe VH, Barnabe RC, Visintin JA, Molero-Filho JR, Porto R.** Effect of body condition score at calving on postpartum reproductive performance in buffalo. *Buffalo J*, v.1, p.53-65, 2001b.
- Baruselli PS, Berber RCA, Madureira EH, Carvalho NAT.** Half dose of prostaglandin F_{2α} is effective to induce luteolysis in the synchronization of ovulation protocol for fixed-time artificial insemination in buffalo (*Bubalus bubalis*). *Braz J Vet Anim Sci*, v.40, p.397-402, 2003a.
- Baruselli PS, Carvalho NAT, Henriquez CEP, 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, PA. *Proceedings ...* Belém: BSA, 2002. p.418-420.
- Baruselli PS, Carvalho NAT, Henriquez CEP, Amaral R, Nichi M, Reichert RH.** Use of progesterone associated to “Ovsynch” protocol for timed artificial insemination in buffalo (*Bubalus bubalis*). In: Congresso Nazionale Sull’Allevamento Del Buffalo, 2, 2003, Roma. *Proceedings ...* Roma: CNAB, 2003b. v.1, p.265-268.
- Baruselli PS, Carvalho NAT, Nichi M, Reichert RH.** Reduction of hCG dosage in a protocol for synchronization of ovulation for timed artificial insemination during the off breeding season in buffalo. In: Congresso Nazionale Sull’Allevamento Del Buffalo, 2, 2003, Roma. *Proceedings ...* Roma: CNAB, 2003c. v.1, p.261-264.
- Baruselli PS, Madureira EH, Barnabe VH, Barnabe RC, Berber RCA, Amaral R.** Timed insemination using synchronisation of ovulation in buffalo. In: International Congress on Animal Reproduction, 14, 2000, Stockholm. *Abstracts ...* Stockholm: ICAR, 2000. v.2, p.4-18.
- Baruselli PS, Madureira EH, Barnabe VH, Barnabe RC, Visintin JA, Oliveira CA, Amaral R.** Estudo da dinâmica folicular em búfalas submetidas à sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo. *Arq Fac Vet UFRGS*, v.27, p.210, 1999a. (Resumo).
- Baruselli PS, Madureira EH, Visintin JA, Barnabe VH, Barnabe RC, Amaral R.** Inseminação artificial em tempo fixo com sincronização da ovulação em bubalinos. *Rev Bras Reprod Anim*, v.23, p.360-362, 1999b.
- Baruselli PS, Marques MO, Nasser LFT, Reis EL, Bó GA.** Effect of eCG on pregnancy rates of lactating zebu beef cows treated with CIDR-B devices for timed artificial insemination. *Theriogenology*, v.59, p.214, 2003d. (Abstract).
- Baruselli PS, Mucciolo RG, Visintin JA, Viana WG, Arruda RP, Madureira EH, Oliveira CA, Molero-Filho JR.** Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*,



v.47, p.1531-1547, 1997.

Baruselli PS, Reis EL, Marques MO, Nasser LF, Bo GA. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. *Anim Reprod Sci*, v.82/83, p.479-486, 2004.

Berber RCA, Madureira EH, Baruselli PS. Comparison of two ovsynch protocols (GnRH vs. LH) for fixed timed insemination in buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*, v.57, p.1421-1430, 2002.

Bhalaru SS, Tiwana MS, Singh N. Effect of body condition at calving on subsequent reproductive performance in buffaloes. *Indian J Anim Sci*, v.57, p.33-36, 1987.

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, GO. *Anais ...* Belo Horizonte: CBRA, 2005. (Resumos; CD-ROM)

Carvalho NAT, Nagasaku EM, Vannucci FS, Toledo LM, Alvarez RH, Maio JRG, Verones DAG, Baruselli PS. Resposta folicular e taxa de concepção em búfalas sincronizadas com dispositivo intravaginal de progesterona e GnRH para IATF durante a estação reprodutiva desfavorável. *Acta Sci Vet*, v.35, p.1100, 2007a.

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. *Ital J Anim Sci*, v.6, p.646-648, 2007b.

Carvalho NAT, Nagasaku EM, Vannucci FS, Toledo LM, Baruselli PS. Uso do DIB[®] e do CRESTAR[®] para a sincronização da ovulação e IATF em búfalas leiteiras durante a estação reprodutiva desfavorável. *Acta Sci Vet*, v.35, p.1132, 2007c.

Carvalho NAT, Reichert RH, Nichi M, Henriquez CEP, Oliveira CA, Baruselli PS. Use of hCG to timed artificial insemination in buffalo. In: International Congress on Animal Reproduction, 15, 2004, Porto Seguro. *Abstracts ...* Porto Seguro: ICAR, 2004. p.384

Carvalho NAT, Vannucci FS, Amaral R, Baruselli PS. Use of GnRH to induce an accessory corpus luteum in buffaloes fixed time artificially inseminated. *Ital J Anim Sci*, v.6, p.655-658, 2007.

D'Occhio MJ, Neish A, Broadhurst L. Differences in gonadotrophin secretion postpartum between Zebu and European breed cattle. *Anim Reprod Sci*, v.22, p.311-317, 1990.

DeRouen SM, Franke DE, Morrison DJ, Wiatt WE, Coombs DF, White TW, Humes PE, Greene BB. Parturition body condition and rate influences on reproductive performance of first-calf beef cows. *J Anim Sci*, v.72, p.1119-1125, 1994.

McDougall S, Burke CR, Macmillan KL, Williamson NB. The effect of pretreatment with progesterone on the oestrous response to oestradiol-17 β benzoate in the postpartum dairy cow. *Proc NZ Soc Anim Prod*, v.52, p.157-160, 1992.

Porto Filho RM. *Sincronização da ovulação para a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) durante estação reprodutiva desfavorável em fêmeas bubalinas.* 2004. 100f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, 2004.

Porto Filho RM, Carvalho NAT, Viel Júnior JO, Reichert RH, Nichi M, Baruselli PS. Follicular responses according hCG and eCG dosage in buffalo treated with progesterone vaginal device during the off breeding season. In: International Congress on Animal Reproduction, 15, 2004, Porto Seguro. *Abstracts ...* Porto Seguro: ICAR, 2004a. p.142.

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 Américas, 2, 2004, Corrientes, Argentina. *Proceedings ...* Corrientes: BSA, 2004b. (CD-ROM).

Rasby RJ, Wettemann RP, Harms PG, Lusby KS, Wagner JJ. GnRH in infundibular stalk-median eminence is related to percentage body fat in carcasses of beef cows. *Domest Anim Endocrinol*, v.9, p.71-76, 1992.

Rhodes FM, Burke CR, Clark BA, Day ML, Macmillan, KL. Effect of treatment with progesterone and oestradiol benzoate on ovarian follicular turnover in postpartum anoestrous cows and cows which have resumed oestrous cycles. *Anim Reprod Sci*, v.69, p.139-150, 2002.

Rhodes FM, McDougall S, Burke CR, Verkerk GA, Macmillan KL. Treatment of cows with an extended postpartum anestrus interval. *J Dairy Sci*, v.86, p.1876-1894, 2003.

Soumano K, Price CA. Ovarian follicular teroidogenic acute regulatory protein, low-density lipoprotein receptor, and cytochrome P450 side-chain cleavage messenger ribonucleic acids in cattle undergoing superovulation. *Biol Reprod*, v.56, p.516-522, 1997.

Viscarra JA, Wettermann RP, Spitzer JC, Morrison DG. Body condition at parturition and postpartum weight gain influence luteal activity and concentrations of glucose, insulin and non-esterified fatty acids in plasma of primiparous beef cows. *J Anim Sci*, v.76, p.493-500, 1998.

Zicarelli L. Management in different environmental condition. *Buffalo J*, suppl.2, p.17-38, 1994.

Zicarelli L. News on buffalo cow reproduction. In: World Buffalo Congress, 5, 1997, Caserta, Italy. *Proceedings ...* Caserta: WBC, 1997. v.1, p.124-141.