

Indução do melhor momento para o início do protocolo Ovsynch por meio da pré-sincronização do ciclo estral com prostaglandina em búfalas (*Bubalus bubalis*)

Induction of the best moment to the Ovsynch protocol beginning through the presynchronization by prostaglandin in buffalo cows ("Bubalus bubalis")

GUERRA, R.D.^{1*}; RIBEIRO FILHO, A. L.²; OBA, E.; PORTELA, A. P. M.; ALMEIDA, A. K.; FONSECA, A. T.

1-Escola de Medicina Veterinária – UFBA

2-Médico Veterinário –Prof. Adjunto do Departamento de Patologia. e Clínica - EMEV- UFBA

*Endereço para correspondência: rguerra1@terra.com.br

RESUMO

Este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a eficiência do protocolo Ovsynch na espécie bubalina, utilizando a nafarelina como análogo do GnRH e induzir o melhor momento para o início deste protocolo por meio da pré-sincronização do ciclo estral com prostaglandina. Além disso, avaliou-se a influência de fatores como estação do ano, escore de condição corporal, peso corporal, status uterino e ovariano, concentração de progesterona sérica no início do protocolo e repasse com o touro após as inseminações. Oitenta e três búfalas da raça Murrah foram divididas aleatoriamente em dois grupos, sendo um grupo trabalhado durante a estação reprodutiva favorável (n=42) e o outro durante a estação reprodutiva desfavorável (n=41). Dentro de cada estação, os grupos foram subdivididos em dois, sendo um submetido ao protocolo Ovsynch e o segundo submetido ao protocolo denominado Presynch. Não houve diferença estatística entre as taxas de prenhez referentes às inseminações artificiais (TPIA) nos diferentes tratamentos e estações do ano, porém houve diferença sobre a taxa de prenhez acumulada (TPA: IA + repasse do touro). O escore de condição corporal não apresentou influência na TPIA. Já a TPA, para os animais com ECC $\geq 2,5$ (66,13%), foi estatisticamente superior à TPA do ECC $< 2,5$ (28,57%). Foi observada correlação positiva entre o peso e a TPIA (+0,35; P=0,001), assim como aconteceu na TPA (+0,47; P=0,0001). O tamanho dos ovários esquerdo e direito influenciou positivamente a TPIA e TPA nos dois tratamentos com o P sempre $< 0,001$.

Palavras-chave: búfalas, inseminação artificial, protocolo Ovsynch.

SUMMARY

The objective of this experiment was to evaluate the efficiency of the Ovsynch protocol in water buffalo cows, by the utilization of nafarelin like GnRH analogous and by the induction of the best moment to the protocol beginning through the presynchronization of the estrous cycle with prostaglandin. Reproductive season, body condition score (BCS), body weight, uterine tonus, size of the ovaries, serum progesterone level at the beginning of the protocol and the review with the bulls after the inseminations were also evaluated. Eighty three Murrah buffalo cows were randomly divided in two groups. One group were evaluated in the favorable reproduction season (n=42) and the other for the unfavorable reproduction season (n=41). For each season, the groups were subdivided in two, which one was treated with the Ovsynch protocol and the other group for Presynch protocol. There was no statistical difference for artificial insemination pregnancy rates (AIPR) among the protocols and reproductive season. However, there was a difference in the accumulated pregnancy rates (APR) after the reviews with the bull. The BCS did not show influence in the AIPR, while the APR of the buffalos with BCS ≥ 2.5 (66.13%) was superior (P=0.003) than the APR animals with BCS < 2.5 (28.57). A positive correlation was observed between the body weight and AIPR (+0.35; p=0.001) and the body weight and APR (+0.47; 0.0001). Ovaries size showed influence on AIPR and APR for both treatments.

Key-words: Artificial insemination, water buffalo, ovsynch protocol.

INTRODUÇÃO

O ciclo reprodutivo representa uma série de fenômenos, tais como: puberdade, maturidade sexual, ciclo estral, estação de monta, atividade sexual pós-parto, idade, entre outros. Estes componentes são regulados por uma série de fatores ambientais, genéticos, fisiológicos, hormonais, comportamentais e psicológicos (MADAN, 1988).

Em bovinos, durante um ciclo estral há emergência de duas ou três ondas de crescimento folicular. Cada onda é caracterizada pelas fases de recrutamento, seleção, dominância e atresia folicular. O folículo dominante da última onda escapa à atresia e secreta quantidades crescentes de estradiol (E_2), que induz mudanças no comportamento associadas ao estro e induz o pico do Hormônio Luteinizante (LH). Este hormônio provoca maturação do folículo dominante e subsequente ovulação. O folículo ovulado dá origem ao corpo lúteo (CL), que secreta quantidades crescentes de progesterona (P_4). Entre o 16º-17º dia do processo, inicia-se a luteólise, havendo regressão do CL e conseqüente queda das concentrações plasmáticas de P_4 . Enquanto a atresia de folículo dominante ocorre na presença de concentrações elevadas de P_4 , típicas da fase de diestro, a diferenciação e o crescimento final do folículo ovulatório ocorrem, após a luteólise, sob baixas concentrações de P_4 . Não ocorrendo a fertilização do ovócito ovulado, o ciclo se repetirá (BINELLI, 2000).

Taneja et al. (1996) realizaram estudo da dinâmica folicular em búfalas e observaram que esses animais, assim como os bovinos, se caracterizam pela presença de ondas de crescimento folicular iniciadas em momentos diferentes do ciclo estral. Neste estudo, foram observados dois diferentes padrões de números de ondas de crescimento folicular em sete ciclos estrais

monitorados, em cinco búfalas. Esses padrões incluíram tanto uma quanto duas ondas de crescimento folicular por ciclo. Baruselli et al. (1997), trabalhando com 30 búfalas, durante a estação reprodutiva, encontraram ciclos estrais com três padrões de ondas de crescimento folicular. Foram observados ciclos com uma, duas e três ondas de crescimento folicular.

Somada à influência de fatores climáticos, a discreta manifestação estral corrobora com a baixa eficiência reprodutiva alcançada pelos rebanhos bubalinos. Para Singh et al. (2000), Baruselli (1996, 2000^a, 2000^b), Baruselli et al. (1997), Taneja et al. (1996) e Ohashi (2001), o controle artificial do ciclo estral proporciona um significativo crescimento na capacidade reprodutiva desta espécie, especialmente por diminuir a necessidade na observação de estros para inseminação artificial.

A metodologia da sincronização de estro se baseia na descoberta de que a progesterona inibe a maturação dos folículos ovarianos de "Graaf". Dessa forma, a sincronização do ciclo estral nos bovinos é dependente do controle da duração funcional do corpo lúteo. A sincronização do estro, envolvendo progestágenos, estrogênios, prostaglandinas e suas combinações, pode alcançar bons índices quando utilizada em espécies que apresentam manifestação estral, porém, ainda não atingem o grau de sincronia desejado, uma vez que o estro é manifestado por um período de cinco dias ou mais. Essa situação leva o produtor a utilizar esse procedimento em conjunto com a detecção de estro por um curto espaço de tempo, aumentando os trabalhos e os custos, tornando a inseminação programada uma técnica inviável (RIBEIRO FILHO, 2001; PURSLEY et al., 1995).

Em todo o mundo existem relatos que indicam baixa taxa de serviço,

notadamente, em razão de comprometimentos na eficiência na detecção de estro, como um dos principais impedimentos para expansão da IA. Esse comprometimento é maior em rebanhos bubalinos, em virtude da particularidade do comportamento reprodutivo (baixa incidência de comportamento homossexual). Assim, programas que visam empregar a inseminação em tempo fixo, sem a necessidade de detecção de estro, colaboram sobremaneira para o aumento do emprego dessa biotecnologia. Esses protocolos preconizam sincronizar a onda de crescimento folicular, a fase luteínica e sua regressão e o momento da ovulação, permitindo o emprego da IA em tempo fixo (BARUSELLI et al., 2003).

Mais do que as manifestações comportamentais de estro, o evento decisivo para uma vaca tornar-se gestante ou não após a monta natural ou inseminação artificial é a ovulação. A sincronização do estro e, em especial, da ovulação, concentradas em um curto espaço de tempo, com fertilidade comparável à observada no ciclo estral natural, viabilizaria o uso da inseminação em um horário predefinido (RIBEIRO FILHO, 2001). Essa técnica otimiza o emprego da IA em campo, facilitando o manejo do rebanho, além de propiciar uma grande economia de mão-de-obra. Permite, também agrupar e programar as inseminações, otimizando os trabalhos em dias determinados (BARUSELLI, 2000^a).

O GnRH é um decapeptídeo produzido por neurônios no hipotálamo e secretado no sistema porta hipotálamo-hipofisário. Ao chegar na hipófise, ele estimula a liberação do FSH e do LH, responsáveis pelo desenvolvimento folicular, ovulação e formação de corpo lúteo. Baseados nos efeitos conhecidos do GnRH e da PGF₂α sobre a dinâmica do ciclo estral de vacas lactantes, Pursley et al. (1995) e Wiltbank et al. (1996) desenvolveram um sistema que sincroniza a ovulação em um intervalo reduzido de tempo de oito horas, possibilitando assim a inseminação

artificial em tempo fixo e sem a observação da manifestação clínica de estro. Esse protocolo é conhecido como "Ovsynch" e vem sendo utilizado por vários pesquisadores, em todo mundo, para realização da inseminação artificial em tempo fixo em bovinos de corte, leite e bubalinos.

Para Thatcher et al. (2001, 2002), o protocolo Ovsynch tem alcançado extremo sucesso na inseminação artificial em tempo fixo de fêmeas bovinas, sem a necessidade de observação de estros. Contudo seu sucesso depende do estágio do ciclo estral em que o animal se encontra no momento do início do protocolo. Para esses autores, melhores resultados são obtidos quando o início se dá no quinto dia do ciclo estral (início do diestro).

O Presynch é um programa em que uma sincronização de estro é realizada previamente ao início do protocolo Ovsynch. Essa pré-sincronização é realizada com a administração de duas doses de PGF₂α intervaladas de 14 dias, iniciando-se o Ovsynch 12 dias após a segunda dose de PGF₂α. Segundo Thatcher et al. (2001, 2002), aquele programa eleva a taxa de prenhez do protocolo Ovsynch em 12 %. O incremento na taxa de prenhez se deve à manipulação do ciclo estral, de forma que o protocolo Ovsynch é iniciado em momento favorável do ciclo estral, mais especificamente, na fase inicial do diestro.

Na espécie bubalina, vários autores já relataram o sucesso do protocolo Ovsynch para IA em tempo fixo utilizando análogos do GnRH e da PGF₂α (Neglia et al., 2003; Baruselli, 2000^a, 2000^b; Baruselli et al., 2003; Berber et al., 2002). Dos diversos análogos do GnRH utilizados nos protocolos de IA em tempo fixo na espécie bubalina, a Nafarelina parece ter particular relevância por ser uma droga de menor custo quando comparada às demais substâncias já testadas e administradas para os mesmos fins.

Levando em conta essas informações, este estudo foi realizado com o objetivo de

avaliar a eficiência do protocolo Ovsynch na espécie bubalina, utilizando a nafarelina como análogo do GnRH, induzir o melhor momento do ciclo estral para o início desse protocolo por meio da pré-sincronização com prostaglandina e verificar a influência de fatores que podem interferir na eficiência reprodutiva desta espécie, ao se utilizar o protocolo, como: estação do ano, escore corporal, peso corporal, status uterino e ovariano, além da importância do repasse com o touro após as inseminações.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os animais

O lote experimental foi constituído de 83 búfalas, todas da raça Murrah. Novilhas, fêmeas primíparas e pluríparas de diversas faixas etárias foram submetidas a exames ginecológicos via palpação retal, sendo selecionados somente os animais sem alterações clínicas. Todas estavam vazias e sem bezerro ao pé no momento inicial do experimento. Foram identificadas por meio de brincos auriculares para evitar a duplicidade de fêmeas.

O experimento foi realizado na Fazenda Miranda, localizada no Município de Camaçari, região litorânea do estado da Bahia, a 60 quilômetros ao norte de Salvador. O tipo climático da região é tropical chuvoso, com temperatura média de 37° C e a concentração de chuvas com maiores índices de precipitação entre os meses de novembro a março, com índice pluviométrico médio de 1.450 mm/ano.

Nesta propriedade os animais eram criados exclusivamente a pasto nativo ou implantado de *Brachiaria decumbens* e *Panicum maximum*, procedendo-se a rotação, de acordo com a disponibilidade de forragens.

O experimento

Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos, sendo um grupo trabalhado durante a estação reprodutiva favorável (n=42) e o outro durante a estação reprodutiva desfavorável (n=41). Dentro de cada estação, os grupos foram subdivididos em dois, um submetido ao protocolo Ovsynch (Pursley et al., 1995) e o segundo grupo submetido ao esquema Presynch, sugerido por Thatcher et al. (2001,2002), com duas doses de PGF₂α sendo administradas previamente, ao protocolo Ovsynch.

Estação reprodutiva favorável (outono e inverno)

O grupo trabalhado durante esta estação, constituído de 42 búfalas, foi subdividido em dois grupos (T1 e T2). No T1 (n=22), trabalhou-se com o esquema sugerido por Thatcher et al. (2001), "Presynch". Foram aplicadas duas doses de PGF₂α, sendo a primeira aplicada 26 dias previamente ao início do Ovsynch e a segunda dose 12 dias antes do início do protocolo, que teve início no dia 0 (D0), como pode ser observado na Figura 1.

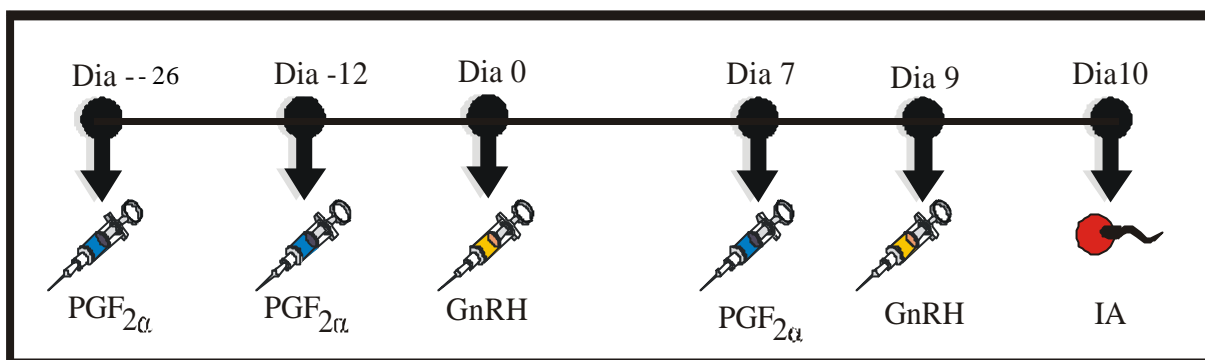


Figura 1. Presynch (T1) segundo Thatcher et al. (2001)

No segundo grupo (T2; n=22), o protocolo utilizado foi o Ovsynch, segundo Pursley et al. (1995). Aplicou-se uma dose de GnRH no D0 (Dia 0), sete dias após foi administrada uma dose de PGF_{2α} (D7) e,

finalmente, uma última aplicação de GnRH no D9. As inseminações artificiais em ambos os grupos foram realizadas 16 horas após a segunda aplicação de GnRH (Figura 2).

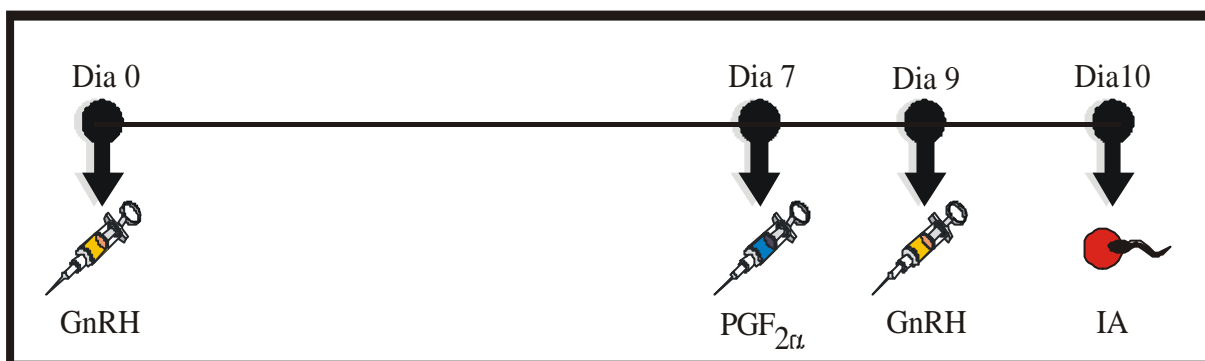


Figura 2. Protocolo Ovsynch (T2) segundo Pursley et al. (1995)

Estação reprodutiva desfavorável (primavera e verão)

Neste momento do experimento o grupo trabalhado era constituído de 41 búfalas. Assim como aconteceu durante a fase experimental da estação reprodutiva favorável, os animais foram subdivididos em dois grupos (T1=20 e T2=21) e, a fim de se comparar a influência da estação do ano sobre a eficiência reprodutiva da espécie, os mesmos protocolos aplicados durante a estação reprodutiva favorável foram utilizados nesta estação.

Drogas e doses

Nos dois grupos experimentais, o análogo da prostaglandina utilizado foi o D-

Cloprostenol Sódico (Ciosin – Shering Plough Coopers), sempre na dose de 0,530 µg (2,0 ml) por via intramuscular profunda. O análogo do GnRH utilizado foi a Nafarelina, na dose de 10 µg (2ml), também por via intramuscular profunda. As administrações hormonais foram realizadas sempre às 16 horas, procedendo-se as inseminações artificiais 16 horas após a segunda dose de nafarelina nos dois protocolos.

Manejo, estocagem do sêmen e inseminações artificiais

O manejo e estocagem do sêmen utilizado nas inseminações seguiram a metodologia descrita por Senger (1986). As amostras foram descongeladas em recipiente térmico apropriado. As palhetas foram submetidas

ao descongelamento por tempo não inferior a 30 segundos ou maior que um minuto e temperatura entre 37° e 39° C. As inseminações foram realizadas por meio de técnica de inseminação intra-cornual, metade da dose do sêmen foi depositada primeiramente no corno uterino esquerdo e a outra metade no corno direito (Senger, 1988). Somente um inseminador procedeu as inseminações, sendo utilizado sêmen de apenas um touro da raça Murrah. A partida de sêmen foi avaliada segundo o Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal – CBRA (Henry et al., 1996), alcançando-se os requisitos básicos nas características físicas e morfológicas. Os animais dos dois grupos foram submetidos a repasse com touro entre o 18° e o 25° dia, após as inseminações. Não foi realizado nenhum tipo de controle das coberturas no repasse.

Diagnóstico de gestação

O diagnóstico de gestação foi realizado por um único técnico, por meio da técnica de palpação retal, 60 e 90 dias após a inseminação. O desempenho reprodutivo foi avaliado por meio da taxa de prenhez, ou seja, quantidade de búfalas gestantes em relação ao número de animais tratados. Como não foi realizado nenhum tipo de controle das coberturas durante o repasse com o touro, a identificação da idade do feto durante o diagnóstico de gestação auxiliou a determinação da origem de cada prenhez, podendo ser consequência da inseminação artificial ou do repasse com touro.

Progesterona sérica

Através de punção na jugular, utilizando-se agulhas e tubos de 8 ml sem anticoagulante para coleta de sangue à vácuo, foi coletada uma amostra de sangue de cada animal nos diferentes grupos experimentais. A coleta coincidiu com a primeira aplicação de cada tratamento. A coleta e preparação das amostras sanguíneas seguiram as normas do “National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)”. As amostras foram quantificadas em suas concentrações sanguíneas de progesterona (P4) através de procedimento de radioimunoensaio, utilizando-se Kits comerciais P4 fase sólida (Coat A - Count Diagnostics Products Corporation-), no laboratório de Endocrinologia do Depto. de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ - UNESP - Campus de Botucatu-SP. Todas as amostras foram processadas em um único ensaio (progesterona). Para a progesterona, o coeficiente de variação foi 4,25% e a concentração mínima detectável 0,01 ng/mL.

Delineamento Experimental

Os tratamentos foram comparados valendo-se de um delineamento inteiramente casualizado, em que os grupos experimentais (Presynch e Ovsynch) foram considerados tratamentos e os animais tratados foram os números de repetições de cada tratamento, segundo o seguinte esquema:

FONTE DE VARIAÇÃO	GRAUS DE LIBERDADE
Total	82 [(tratamentos x repetições) - 1]
Tratamentos	1 (tratamentos - 1)
Erro	81

Com esse delineamento foram analisadas as seguintes variáveis: ECC, peso,

concentração sérica de P₄, tamanho dos ovários.

Procedeu-se um estudo de dispersão de frequências, para comparação e verificação da homogeneidade dos tratamentos em relação à categoria animal (Presynch x Ovsynch), bem como a TPIA e a TPA (protocolos de sincronização, estação do ano, ECC, categoria animal, tônus uterino e tamanho de ovário) entre os diferentes grupos experimentais.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As médias de ECC para os diferentes grupos foram de $2,50 \pm 0,39$ e $2,70 \pm 0,54$ para o T1 e T2, respectivamente. Em relação ao peso dos animais nos diferentes grupos, as médias foram de $455,54 \pm 54,30$ kg para o T1 e $435,28 \pm 67,96$ kg para o T2. Essas médias não representaram diferença estatística entre os grupos, sendo para o ECC o $P=0,66$ e para o peso dos animais o $P=0,1429$. No que concerne às concentrações séricas de progesterona, os dois grupos apresentaram médias inferiores a 1 ng/mL, sendo as médias $0,2270 \pm 0,6368$ e $0,4600 \pm 0,8131$ ng/mL, para o T1 e T2, respectivamente.

Não foi observada diferença estatística também nos itens categoria animal e tamanho de ovários. As porcentagens de novilhas e vacas nos diferentes tratamentos foram de 15% de novilhas e 85% de vacas para o T1 e 13,95% de novilhas e 86,05% de vacas para o T2, sendo para essa característica o $P=0,89$. O tamanho médio de ovário esquerdo no T1 foi de $1,43 \pm 0,50$ cm e $1,42 \pm 0,50$ cm no T2, com o $P=0,95$. Quanto ao ovário direito, o tamanho médio foi de $1,40 \pm 0,50$ cm e $1,35 \pm 0,48$ cm para o T1 e T2, respectivamente, com o $P=0,63$.

Os dados concernentes às taxas de prenhez referente às inseminações (TPIA) e à taxa de prenhez acumulada (TPA) entre os grupos experimentais encontram-se na Tabela 1. No grupo submetido à sincronização de estro com $\text{PGF}_2\alpha$ (T1), previamente ao protocolo Ovsynch, a TPIA e TPA foram, respectivamente, 30,00% e 55,00%, ao passo que, para o T2, esses mesmos valores foram 25,58% e 58,10 %, respectivamente.

Tabela 1. Taxa de prenhez pela IA (TPIA) e taxa de prenhez acumulada (TPA) das búfalas, nos diferentes tratamentos.

TRATAMENTOS	Nº de animais	TPIA	TPA
		Nº (%)	Nº (%)
T1-Presynch	40	12 (30,00)	22 (55,00)
T2-Ovsynch	43	11 (25,58)	25 (58,10)
TOTAL	83	23 (27,71)	47 (56,63)

TPIA não diferem entre si ($P=0,653$) pelo teste de χ^2 .
TPA não diferem entre si ($P=0,773$) pelo teste de χ^2 .

Como pode ser observado na tabela acima, a pré-sincronização (T1) não elevou a taxa de prenhez de búfalas tratadas com o protocolo Ovsynch (T2), uma vez que não houve diferença significativa entre os grupos experimentais em relação a TPIA. Esses resultados diferem dos encontrados por Thatcher et al. (2001), uma vez que, segundo esses autores, a pré-sincronização de fêmeas bovinas com $\text{PGF}_2\alpha$, objetivando induzir um momento ideal

para o início do protocolo Ovsynch, elevou a taxa de prenhez em 12%, passando dos 36%, normalmente alcançados no Ovsynch, para 48% com o auxílio da pré-sincronização. Segundo esses autores, a pré-sincronização, com duas injeções de prostaglandinas intervaladas de 14 dias, possibilitaria que ao início do protocolo Ovsynch, 12 dias após a segunda dose de prostaglandina, aproximadamente 90% dos animais tratados estivessem em fase do

ciclo estral favorável ao sucesso do protocolo, o que segundo os autores corresponde ao início do diestro. Nesse momento, a vaca possui um folículo dominante saudável, que ovula em resposta à administração do GnRH, graças ao pico de LH induzido pelo mesmo. O aumento do FSH, também em resposta ao GnRH, induz o crescimento de uma nova onda folicular em aproximadamente dois dias, em que um folículo é selecionado, tornando-se o folículo dominante. Sete dias após a aplicação do GnRH (dia 12 do ciclo), a injeção de $\text{PGF}_2\alpha$ provoca a regressão, tanto do CL original presente no dia cinco do ciclo, quanto do novo CL induzido pela administração da primeira dose de GnRH. O decréscimo dos níveis de P_4 , provocado pela regressão dos corpos lúteos, induz a aceleração do processo de maturação do folículo dominante presente e uma nova dose de GnRH é administrada dois dias após a $\text{PGF}_2\alpha$, o que induzirá a ovulação entre 24 e 32 horas.

Berber et al. (2002) compararam a eficiência de dois protocolos Ovsynch em búfalas. No primeiro (n=15), foi utilizado o protocolo de acordo com Pursley et al. (1995). No segundo (n=15), a última dose de GnRH foi substituída por uma aplicação do Hormônio Luteinizante (LH) para sincronizar a ovulação. Das 30 búfalas trabalhadas no experimento, 86,6% ovularam após a primeira dose de GnRH. Nos animais em que se empregou uma segunda dose de GnRH, a taxa de ovulação foi de 93,3%, enquanto os animais que tiveram a segunda dose substituída pelo LH apresentaram 93,3%. Esses resultados mostram que não houve diferença estatística entre os dois tratamentos ($P>0,05$). Neste mesmo trabalho, outras 305 búfalas, com escore de condição corporal 3,5, foram submetidas aos mesmos protocolos e apresentaram resposta favorável aos protocolos para essa espécie. A taxa de concepção para o grupo do Ovsynch foi de 56,5% (87/154), ao passo que o grupo que utilizou LH em

lugar do último GnRH apresentou taxa de concepção de 64,2% (97/151).

Vasconcelos et al. (1999), trabalharam com 156 vacas submetidas ao protocolo Ovsynch, previamente descrito por Pursley et al. (1995). Esses animais foram divididos em quatro grupos, de acordo com o dia do ciclo estral em que se encontravam no momento do início do protocolo. Dias 1-4, n=31; dias 5-9, n=47; dias 10-16, n=52 e dias 17-21, n=26. A porcentagem de vacas que ovularam após a primeira dose de GnRH foi de 64% e variou ($P<0,01$) de acordo com o dia do ciclo estral, com baixa taxa de ovulação nos dias 1-4 (23%) e alta taxa de ovulação nos dias 5-9 (96%). A sincronização total após a segunda dose de GnRH não variou significativamente pelo estágio do ciclo estral, ao começo do tratamento, mas variou de acordo com a resposta à primeira dose de GnRH ($P=0,01$ - 92% para as que ovularam vs 79% para as que não ovularam). A taxa de sincronização após a segunda dose de GnRH foi de 87%, com 6% dos animais ovulando antes do segundo GnRH, sendo que 7% não tiveram ovulação detectada até 48 horas após a segunda dose de GnRH. Todas as vacas que ovularam antes do segundo GnRH começaram o protocolo em fase tardia do ciclo estral (dias 13-22) e não ovularam com a primeira dose do GnRH. Vacas que começaram o protocolo no início do ciclo (dias 1-10) tiveram as maiores taxas de sincronização (91%). Em contrapartida, vacas que começaram o protocolo na segunda metade do ciclo estral obtiveram menores índices de sincronização (80%). Ainda no experimento de Vasconcelos et al. (1999), o estágio do ciclo estral no começo do protocolo influenciou ($P<0,05$) a concentração sérica de progesterona na 1ª dose de GnRH e na $\text{PGF}_2\alpha$, mas não afetaram a 2ª aplicação de GnRH. Vacas que se encontravam em momento tardio do ciclo estral (dias 10 a 21) tenderam a apresentar baixos níveis de P_4 (<1 ng/mL) no momento da $\text{PGF}_2\alpha$, em relação àquelas que estavam no momento inicial do ciclo

estral ($P > 0,05$). As concentrações séricas de progesterona encontradas por esses autores para cada fase do início do tratamento foram as seguintes: dia 1-4, $0,2 \pm 0,0$ ng/mL; dia 5-9, $2,0 \pm 0,2$ ng/mL; dia 10-16, $3,0 \pm 0,2$ ng/mL e dia 17-21, $1,6 \pm 0,6$ ng/mL.

No presente experimento, todos os animais estavam com concentração sérica de P_4 inferior a 1 ng/mL no momento da aplicação do primeiro GnRH (D 0), sendo a média para o T1 (Presynch) $0,23 \pm 0,63686$ ng/mL e $0,47 \pm 0,8131$ ng/mL para o T2 (Ovsynch).

Quereshi et al. (2000) relatam que a concentração de progesterona no leite permanece > 1 ng/mL (1,0 a 30,69 ng/mL) para búfalas prenhes. A concentração de progesterona sérica também deve ser > 1 ng/mL durante a prenhez. Para búfalas cíclicas, essa concentração deve variar de 0,4 a 4,0 ng/mL, enquanto, para animais em anestro, a concentração de P_4 sérica permanece < 1 ng/mL. Baruselli (2000^a) observou semelhante taxa de ovulação, à primeira aplicação de GnRH, para búfalas com concentração de progesterona sérica $<$ ou > 1 ng/mL (66,6% e 55,5 %, respectivamente). Animais que ovulam na 1^a aplicação de GnRH tendem a apresentar maiores taxa de prenhez ao final do protocolo.

Não foi observada diferença estatística na TPA nos diferentes tratamentos. O repasse

com o touro elevou a taxa de prenhez em ambos os tratamentos, porém esse incremento não foi significativo. Segundo Baruselli (2000^a), o Ovsynch sincroniza o retorno ao estro dos animais que não emprenharam. Esse autor observou que 56% dos estros de retorno ocorreram entre 18 e 25 dias após as inseminações, com média de 21,1 dias. No presente experimento, a taxa de TPA geral encontrada foi de 43,37%, enquanto a obtida por Baruselli (2000^a), usando uma segunda inseminação com observação do retorno ao estro, foi de 75,00%, mostrando ser uma importante ferramenta para garantir maiores índices de prenhez no rebanho. Não houve, contudo, diferença ($P=0,77$) quando comparada a incrementação na TPA entre T1 e T2.

Não foi observada diferença significativa na TPIA na estação reprodutiva desfavorável (24,39%) ou favorável (30,95%). Porém, a TPA, para os animais tratados durante a estação reprodutiva favorável, foi maior ($P=0,006$) do que nos animais tratados na estação reprodutiva desfavorável (Tabela 2). Em trabalho anterior, Baruselli (2000^a), observou que o grupo de animais inseminados fora da estação reprodutiva ($n=64$) apresentou menor ($P < 0,05$) taxa de concepção (7,8%) do que o grupo inseminado durante a estação reprodutiva ($n=261$; 50,2%).

Tabela 2. Taxa de prenhez pela IA (TPIA) e taxa de prenhez acumulada (TPA) das búfalas, nas diferentes estações.

ESTAÇÕES	Nº de animais	TPIA	TPA
		Nº (%)	Nº (%)
Estação reprodutiva favorável	42	13 (30,95)	30 (71,43) a
Estação reprodutiva desfavorável	41	10 (24,39)	17 (41,46) b
TOTAL	83	23 (27,71)	47 (56,63)

TPIA não diferem entre si ($P=0,504$) pelo teste de χ^2 .

TPA diferem entre si ($P=0,006$) pelo teste de χ^2 .

Segundo Zicarelli (1990), bubalinos criados em regiões equatoriais apresentam características de estacionalidade reprodutiva semelhante aos bovinos, ou

seja, são poliétricos anuais. A medida que essas criações se afastam da linha do Equador, os animais passam a ter um comportamento reprodutivo influenciado

positivamente pela diminuição de horas com luz do dia, tendendo a se apresentar como animais estacionais de dias curtos (inverno). Jorge (2003) afirma que em regiões tropicais, onde a variação de luminosidade e temperatura são mínimas, pode-se alcançar uma distribuição dos partos durante todo o ano, por meio de um eficiente manejo alimentar, visto que o problema pode estar diretamente relacionado à oferta de alimentos.

Neglia et al. (2003), em experimento realizado com 111 búfalas em estação do ano desfavorável à reprodução dessa espécie (janeiro), observaram taxa em que 88% dos animais tratados apresentavam

folículo > 1 cm e tônus uterino característico de fase estrogênica. A taxa de prenhez foi de 36%, ao final do experimento, para o protocolo Ovsynch.

Para avaliação da influência do ECC sobre a taxa de prenhez, como não houve diferença estatística entre a TPIA e TPA nos diferentes tratamentos (T1 e T2), os animais foram reavaliados, dividindo-se em dois novos grupos. O primeiro grupo (n=21) corresponde ao grupo com ECC < 2,5, enquanto o segundo (n=62) corresponde aos animais com ECC \geq 2,5. As taxas de prenhez para os dois grupos descritos podem ser observadas na Tabela 3.

Tabela 3. Taxa de prenhez pela IA (TPIA) e taxa de prenhez acumulada (TPA) das búfalas com diferentes escores corporais.

ESCORE CORPORAL	Nº de animais	TPIA	TPA
		Nº (%)	Nº (%)
ECC < 2,5	21	03 (14,29)	06 (28,57) a
ECC \geq 2,5	62	20 (32,26)	41 (66,13) b
TOTAL	83	23 (27,71)	47 (56,63)

TPIA não diferem entre si (P=0,112) pelo teste de χ^2 .

TPA diferem entre si (P=0,003) pelo teste de χ^2 .

Para Thatcher et al (2001), o escore de condição corporal pode ser usado para estipular o relativo estado nutricional para fêmeas bovinas e o seu impacto sobre a frequência de anestros no início de programas reprodutivos. Baruselli (2000^a) verificou interferência (P<0,05) do escore corporal na taxa de concepção de búfalas inseminadas artificialmente. O mesmo autor cita que outros trabalhos também verificaram interferência do escore corporal sobre a taxa de prenhez e concepção de búfalas inseminadas artificialmente, no entanto, sem a sincronização da ovulação e as búfalas devem apresentar ECC \geq 3,5 para obtenção de boa eficiência reprodutiva. Em animais com ECC 3,5, Berber et al. (2002) alcançaram taxa de concepção de 56,5 e 64,2% com protocolo Ovsynch em búfalas. Moreira et al. (2000) realizaram experimento para verificar a influência do

escore corporal sobre as taxas de prenhez de vacas submetidas ao protocolo Ovsynch. Segundo os autores, vacas que tiveram escore corporal <2,5 apresentaram taxa de prenhez de 11,10 a 18,10%, enquanto vacas com o escore corporal >2,5 obtiveram taxa de prenhez de 25,60% a 33,80%.

Em experimento realizado por Baruselli (2000^b), os resultados demonstraram melhores índices reprodutivos (primeiro estro pós-parto, percentual de anestro, número de doses por concepção, período de serviço e taxa de concepção) para búfalas que apresentaram reservas corporais no momento do parto. Os animais que pariram magros (condição \leq 2,5) obtiveram baixos índices reprodutivos. Notou-se também maior eficiência reprodutiva em búfalas que pariram gordas (condição \geq 4,0), no entanto, os animais com escore intermediário (3,0 a 3,5)

apresentaram eficiência reprodutiva satisfatória.

De acordo com Wright et al (1992), a influência do escore da condição corporal (ECC) sobre o controle e liberação dos hormônios ligados à reprodução está ligada a uma disfunção hipotalâmica por deficiente ingestão de nutrientes o que parece ser a causa da inatividade ovariana, cuja duração estará relacionada à severidade da deficiência. Sartunino & Dias (1993) explicam que o ECC é um bom indicativo do funcionamento dos sistemas orgânicos, e apresentando intensa relação com a atividade ovariana luteal cíclica.

Também não foi observada diferença estatística entre as médias de peso dos grupos experimentais T1 e T2 ($455,35 \pm 54,30$ kg e $435,28 \pm 67,96$ kg), o que demonstra a homogeneidade entre os grupos, porém, pode-se observar uma correlação positiva e significativa entre a taxa de prenhez e o peso corporal ao final dos protocolos. Para a TPIA, a correlação foi de +0,47, com o $P=0,0001$. Para a TPA a correlação foi de +0,35, com o $P=0,001$.

Quanto à influência das categorias animais (vacas ou novilhas), tanto a TPIA quanto a TPA não apresentaram diferença ($P > 0,05$). Esses resultados contradizem Jorge (2003) e Baruselli (2000^a), que observaram que a ordem de partos interfere na eficiência do método Ovsynch. Búfalas pluríparas, sobretudo acima de 5 partos, tendem a apresentar melhor eficiência que búfalas primíparas e novilhas. Esses autores concluem que se deve, preferencialmente, sincronizar búfalas pluríparas para melhor eficiência desse método. Neste trabalho, as búfalas primíparas apresentaram taxa de concepção de 37,8%, as búfalas com dois partos 47,1%, as com 3 a 5 partos demonstram taxa de 52,3% e as búfalas com o número de partos > 5 apresentaram taxa de concepção de 55,7%. Berber et al. (2002) também encontraram valores de taxa de concepção maiores para búfalas

pluríparas em relação as primíparas ($P < 0,05$).

Ribeiro Filho et al. (2002), trabalhando o protocolo Ovsynch em vacas zebuínas, verificaram que a ordem de parição não influenciou ($P > 0,05$) a taxa de prenhez dentro dos grupos experimentais. A taxa de prenhez encontrada para as vacas primíparas submetidas ao protocolo foi 23,33%, enquanto a pluríparas apresentaram TP de 29,67%.

Segundo Ribeiro Filho (2001), trabalhos relacionados à avaliação de determinadas características do aparelho reprodutor feminino, como: tamanho do corno uterino, tônus uterino, tamanho dos ovários e estruturas ovarianas, por meio de palpação retal, têm sido úteis na predição da fertilidade de novilhas *Bos taurus tauros* e *Bos taurus indicus*. Andersen et al. (1991) correlacionaram favoravelmente essas características com respostas à sincronização, taxa de gestação ao final da estação de monta e data da primeira cria.

Na presente pesquisa, o tônus uterino não influenciou significativamente as taxas de prenhez em nenhum dos grupos experimentais. A contratilidade uterina seguia a classificação de 1 a 3 (UT-1, Tônus contraído; UT-2, Tônus médio e UT-3, Tônus relaxado) e a TPIA e TPA alcançadas por esses grupos foram 30,8%; 26,6%; 33,3% e 69,2%; 56,3%; 33,3%, respectivamente.

Esses resultados diferem dos achados de Ribeiro Filho et al. (2002), que reportaram diferença significativa de taxa de prenhez para vacas zebuínas submetidas ao protocolo de IA em tempo fixo com diferentes tônus uterino. Neste estudo, as vacas foram divididas previamente ao início do tratamento em três grupos: tônus relaxado (UT-1), tônus médio (UT-2) e tônus contraído (UT-3). Observou-se que os animais trabalhados com o protocolo Ovsynch apresentaram taxa de prenhez superior no grupo UT-3 (60,00%), em comparação ao grupo UT-2 e UT-1 (10,94% e 0,0%, respectivamente).

Analisando o tônus uterino de acordo com a escala de 1 a 3, Berber et al. (2002) afirmam que a maioria dos animais trabalhados pelo protocolo Ovsynch apresentam tônus 2 no momento da inseminação artificial. A taxa de concepção encontrada nessa pesquisa foi de 46,0, 63,4 e 54,3% para os tônus uterinos classificados como 1, 2 e 3, respectivamente.

O tamanho dos ovários esquerdos e direitos, classificados como = 1,0 cm ou > 1,0 cm, influenciou significativamente a TPIA e a TPA. Nos ovários esquerdos com tamanho = 1,0 cm, a TPIA correspondeu a 14,58%, ao passo que os ovários esquerdos com tamanho > 1,0 cm apresentaram TPIA de 45,71%, onde o $P=0,002$. Com o repasse com o touro, a TPA para os animais com ovários esquerdos = 1,0 cm foi de 41,67%, e a TPA para as búfalas com ovários esquerdos > 1,0 cm foi de 77,14%. A TPIA dos animais com ovários direitos = 1,0 cm foi de 21,15%, contra os 38,71% obtidos pelos animais com ovários > 1,0 cm. Ainda se tratando dos ovários direitos, os animais que apresentaram tamanho = 1,0 cm alcançaram TPA de 41,67%, número estatisticamente inferior ao da TPA de 77,14%, encontrada para o grupo de búfalas com ovários direitos >1,0 cm.

CONCLUSÃO

A nafarelina mostrou alguma eficiência, utilizando-se o protocolo Ovsynch com a inseminação artificial em tempo fixo 16 horas após a segunda dose de GnRH. A pré-sincronização com prostaglandina não

REFERÊNCIAS

ANDERSEN, K.J. The use of reproductive tract scoring in beef heifers. **Agri-Practice**, v. 12, n. 4, p.19-24, 1991.

significou incremento na eficiência do protocolo Ovsynch. A estação do ano não influenciou os resultados obtidos nos diferentes protocolos. O escore de condição corporal não influenciou estatisticamente as taxas de prenhez da inseminação artificial em tempo fixo em animais com escore corporal menor do que 3,0. O repasse com o touro representou incremento na taxa de prenhez, quando relacionado à estação do ano (71,43 % na estação reprodutiva favorável e 41,46 % na estação reprodutiva desfavorável), ao ECC (28,57 % para ECC < 2,5 e 66,13 % para ECC \geq 2,5), ao tamanho de ovário esquerdo (OE \leq 1,0cm com 41,67 % e OE > 1,0cm com 77,14 %) e ao tamanho de ovário direito (onde OD = 1,0 obteve taxa de 41,67 % e OD > 1,0cm taxa de 77,14 %). A diferença no tônus uterino entre os animais assim como a categoria animal do indivíduo não influenciaram estatisticamente nas taxas de prenhez neste experimento, seja a TPIA ou TPA. O peso corporal representou uma correlação positiva de 0,35 para a TPIA e de 0,47 para a TPA. O tamanho dos ovários direito e esquerdo influenciou significativamente na TPIA e na TPA. Os animais com tamanho de ovário maior que 1,0 cm obtiveram resultados superiores aos animais com ovários menores que 1,0 cm.

AGRADECIMENTOS

À Fapesb pela bolsa de mestrado. À Shering Plough Coopers pelo patrocínio da protaglandina (Ciosin).

BARUSELLI, P.S. Controle farmacológico do ciclo estral e da superovulação em bubalinos. In: BARUSELLI, P.S.; MADUREIRA, E.H. Controle farmacológico do ciclo estral em

ruminantes. São Paulo: FMVZ-USP, 2000. p190-254.

BARUSELLI, P.S. Reprodução de bubalinos. In: SIMPOSIO BRASILEIRO DE BUBALINOCULTURA, 1. 1996, Cruz das Almas – BA. Anais...Crus das Almas: 1996. p. 177-153.

BARUSELLI, P.S. Técnicas de manejo para exploração da bubalinocultura. In: ENCONVET, 5., 2000, Aracajú-SE. Anais...Aracajú –SE., 2000b. p 61-85.

BARUSELLI, P.S.; CARVALHO, N.A.T. Controle do desenvolvimento folicular para emprego de biotecnologia da reprodução em bubalinos (*Bubalus bubalis*). Revista Brasileira de Reprodução Animal, v.27, n.2, p.94-102, 2003.

BARUSELLI, P.S.; MUCCIOLO, R.G.; VISINTIM, 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 (*Bubalus bubalis*). Theriogenology, v.47, p.1531-1547, 1997.

BERBER, R.C.A.; MADUREIRA, E.H.; BARUSELLI, P.S. Comparison of two ovsynch protocols (GnRH versus LH) for mixed timed insemination in buffalo (*Bubalus bubalis*) Theriogenology, v.57, p.1421-1430, 2002.

BINELLI, M. Estratégias anti-luteolíticas para a melhora da sobrevivência embrionária em bovinos. In: BARUSELLI, P.S.; MADUREIRA, E.H. **Controle farmacológico do ciclo estral em ruminantes**. São Paulo: FMVZ-USP, 2000. p.100-114.

JORGE, M.A.. Biotecnologias da reprodução em bubalinos, contribuição ao estudo dos bubalinos: período de 1972-2001. Botucatu: Alcides de Amotim Ramos (ed.), 2003. 578p.

MADAN, M.L. Status of reproduction female buffalo. In: _____. Buffalo production and health: a compendium of latest research information based on Indian studies. New Delhi, India: ICAR Publications, 1988. p.89-100.

MOREIRA, F. C.; RISCO, M. F. A.; PIRES, J. D. ; AMBROSE, M. ; DROST, M.; DELORENZO, W. W. T.Effect of body condition on reproductive efficiency of lactating dairy cows receiving a timed insemination. Theriogenology, v.53, p.1305-1319, 2000.

NEGLIA, G.; GASPARRINI, B.; DI PALO, R.; DE ROSA, C.; ZICARELLI, L.; CAMPANILE, G. Comparison pf pregnancy rates with two estrus sinchronization protocols in Italian mediterranean buffalo cows. Theriogenology, v.60, p.125-133, 2003.

OHASHI, O. M. Inseminação artificial em bubalinos: biotécnicas aplicadas a reprodução animal. São Paulo: Livraria Varela, 2001. 110 p.

PURSLEY, J. R.; MEE, M.O.; WILTBANK, M.C.. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2 α and GnRH. Theriogenology, p.915-923, 1995.

QUERESHI, M.S.; HABIB, G.; NAWAB, G.; SIDDIWQUI, M.M.; AHMAD, N. ; SAMAD, H.A. Milk progesterone profiles in various reproductive states in dairy buffaloes under field conditions. Proc. Natl. Sci. Coun. v.24, p.2:70-75, 2000.

RIBEIRO FILHO, A. de L.; PORTELA, A. P. M.; CHALLHOUB, M.; QUINTELA, A. T.; BITTENCOURT, R. F.; OLIVEIRA, J. V.; GUSMÃO, A. L.; VALE FILHO, V. R. Desempenho reprodutivo de vacas zebus, submetidas à prévia classificação reprodutiva e sincronizadas com diferentes protocolos para inseminação artificial em tempo fixo. Revista Brasileira de Reprodução Animal, Belo Horizonte, v.26, n. 3, p.221-223, 2002.

RIBEIRO FILHO, A..L.. Indução, sincronização e resincronização do estro e da ovulação em vacas zebuínas. 2001. 133p. Tese (Doutorado) - UFMG - Escola de Veterinária. Belo Horizonte.

SENGER, P.L. Influence of corneal insemination on conception rates in dairy cattle. Journal of Animal Science, v. 66, p.3010-3016, 1988.

SENGER, P L. Principles and procedures for storing and using frozen bovine semen. In: MORROW, D.A. Current therapy in theriogenology. 2 ed. Philadelphia: Saunders Company, 1986. p. 197-174.

SINGH, J.; NANDA, A.S.; ADAMS, G.P. The reproductive pattern and efficiency of female buffaloes. Animal Reproduction Science, v. 60-61, p.593-604, 2000.

TANEJA, M.; ALI, A. ; SINGH, G. Ovarium follicular dynamic in water buffalo. Theriogenology, v.46, p.121-130, 1996.

THATCHER, W.W.; MOREIRA, F.; RISCO, C.A. New strategies to increase pregnancy rates. Winconsin. Disponível em: <http://www.naab-css.org/education/Thatcher.html>.

THATCHER, W.W.; MOREIRA, F.; PANCARCI, S.M. Strategies to optimize reproductive efficiency by regulation of ovarian functions. Domestic Animal Endocrinology, v.23, p. 243-254, 2002.
VASCONCELOS, J.L.M.; SILCOX, R.W.; ROSA, G.J.M.; PURSLEY, J.R.; WILTBANK, M.C. Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrous cycle in lactating dairy cows. Theriogenology, v.52, p.1057-1078, 1999.

WILTBANK, M.C.; PURSLEY, J.R.; FRICKE, P.M.; VASCONCELOS, J.; GUENTHER, J.N.; GIBBONS, J.R.; GINTHER, O.J. Development of A.I. and E.T. programs that do not require detection of estrus using recent information on follicular growth. In: ANNUAL CONVENTION PORTLAND, 15, 1996., Oregon. Proceeding... Oregon: American Embryo Transfer Association, 1996. p.23-44.

WRIGHT, I.A.; RHIND, S.M.; WHYTE, T.K. A note of the effects of pattern of food intake and body condition on the duration of the post-partum anoestrous period and LH profiles in beef cows. Animal Production, v.45, p.143-146, 1992.

ZICARELLI, L. Considerazioni sull'allevamento bufalino. Salerno: Regionale Sviluppo Agricolo in Campania, 1990. 70p.