

## AVALIAÇÃO DO EMPREGO DO PROTOCOLO OVSYNCH MODIFICADO NA TAXA DE PREENHEZ E MORTALIDADE FETAL EM *BUBALUS BUBALIS*

Romildo Romualdo Weiss<sup>1</sup>  
Fernando Pansera Dalla Costa<sup>1</sup>  
Luciana Ferri Frares<sup>1</sup>  
Luiz Ernandes Kozicki<sup>2</sup>  
Priscilla R Muradás<sup>2</sup>  
Renata A Abreu<sup>2</sup>

### RESUMO

O experimento objetivou, avaliar a utilização do hormônio luteinizante (LH) e da gonadotrofina coriônica humana (hCG), em substituição ao hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) no protocolo ovsynch em fêmeas bubalinas, visando à inseminação artificial em tempo fixo (IATF), verificar a influência do escore da condição corporal (ECC) sobre as taxas de prenhez de cada grupo e avaliar a taxa geral de mortalidade fetal. Empregou-se o protocolo Ovsynch tradicional no Grupo 1 (G1) com modificações no G2 e no G3, (D0=GnRH, D7=PGF2 $\alpha$  e D9= GnRH, hCG ou LH respectivamente), para sincronizar o estro de 106 búfalas das raças Murrah e Mediterrâneo, durante a estação reprodutiva de 2008. No D9 do protocolo os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos e receberam: GnRH (G1)-(acetato de lecirelina 25 $\mu$ g, n=38); hCG (G2) - (2500 UI, n=35) ou LH (G3) - (12,5 mg, n=33). Após 16 horas (D9 + 16 horas), realizou-se a IATF e mensurou-se o diâmetro do folículo pré-ovulatório com exames ultrassonográficos. O diagnóstico de gestação foi efetuado no 43º dia após a IATF, e repetido no 61º dia, visando verificar a taxa de mortalidade fetal. As taxas de concepção entre os grupos GnRH, hCG e LH, foram respectivamente: 39,4, 51,4 e 45,5% (p>0,05); a ultrassonografia feita no dia da IATF revelou que 90,4% dos animais possuíam folículos pré-ovulatórios de 11,9 mm de diâmetro médio nos ovários; os grupos hCG e LH tiveram maior taxa de prenhez que o grupo GnRH (p>0,05). A taxa de mortalidade fetal foi de 6,25%. Ao se comparar o ECC com as taxas de prenhez nos grupos G1, G2 e G3, não se observou diferença (p>0,05). Conclui-se que não houve diferença significativa entre os tratamentos utilizados e que a taxa de mortalidade fetal pode ser reduzida com a melhora do ECC dos animais.

**Palavras-chave:** *Bubalus bubalis*, ovsynch, folículo pré-ovulatório, mortalidade embrionária, escore da condição corporal, inseminação artificial em tempo fixo.

## AVALIATION OF EMPLOYING THE MODIFIED OVSYNCH PROTOCOL ON PREGNANCY RATE AND FETAL MORTALITY IN *BUBALUS BUBALIS*

### ABSTRACT

This experiment aimed to evaluate the use of luteinizing hormone (LH) and human chorionic gonadotropin (hCG) in replacement to gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in estrus synchronization protocols in female buffalo, in order to artificial insemination at fixed time (TAI), verify the influence of body condition score (BCS), on pregnancy rates of each group and assess the overall rate of fetal mortality. We used the traditional Ovsynch protocol in

<sup>1</sup> Departamento de Medicina Veterinária, UFPR, Curitiba, PR, Brasil.

<sup>2</sup> Departamento de Medicina Veterinária, PUC-PR, Curitiba, PR, Brasil.

Group 1 (G1) with modifications in G2 and G3 (GnRH = D0, D7 = D9 = PGF2 and GnRH, hCG or LH, respectively), to synchronize estrus of 106 buffaloes of Murrah and Mediterranean during the breeding season of 2008. In D9 protocol the animals were randomly divided into three groups and received: GnRH (G1) - (lecirelin acetate 25µg, n = 38), hCG (G2) - (2500 IU, n = 35) or LH (G3) - (12.5 mg, n = 33). After 16 hours (16 hours + D9), held on TAI and measured the diameter of the preovulatory follicle with ultrasound examinations. Pregnancy diagnosis was performed on day 43 after TAI, and repeated on day 61 in order to check the fetal mortality rate. The conception rates between the groups GnRH, hCG and LH, were respectively: 39.4, 51.4 and 45.5% ( $p > 0.05$ ); ultrasound done on the day of TAI revealed that 90.4% of animals had pre-ovulatory follicles of 11.9 mm in diameter in the ovaries, hCG and LH groups had a higher pregnancy rate than the GnRH group ( $p > 0.05$ ). The fetal mortality rate was 6.25%. Comparing the ECC with pregnancy rates in G1, G2 and G3, there was no difference ( $p > 0.05$ ). It is concluded that there was no significant difference between treatments and that the fetal mortality rate can be reduced with the improvement of ECC animals.

**Keywords:** *Bubalus bubalis*, artificial insemination fixed time, estrus synchronization, preovulatory follicle diameter, embryonic mortality rate.

## EVALUACIÓN DEL USO DEL PROTOCOLO OVSYNCH MODIFICADO EN EL ÍNDICE DE CONCEPCIÓN Y LA MORTALIDAD FETAL EM *BUBALUS BUBALIS*

### RESUMEN

El experimento tuvo como objetivo evaluar el uso de la hormona luteinizante (LH) y gonadotropina coriónica humana (hCG), en sustitución de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) en el Ovsynch en búfalas, con miras a una inseminación artificial de tiempo fijo (IATF), verificar la influencia de la condición corporal (CC) en las tasas de embarazo de cada grupo y evaluar la tasa global de mortalidad fetal. Se utilizó el protocolo Ovsynch tradicional en el Grupo 1 (G1) con modificaciones en G2 y G3 (GnRH = D0, D7 = D9 = PGF2 y GnRH, hCG o LH, respectivamente), para sincronizar el estro de 106 búfalos de las razas Murrah y Mediterráneo durante la temporada de cría de 2008. En el D9 del protocolo, los animales fueron divididos aleatoriamente en tres grupos y sometidos a: GnRH (G1) - (etil lecorelina 25µg, n = 38), la hCG (G2) - (2500 UI, n = 35) o LH (G3) - 12,5 mg, n = 33). Después de 16 horas (16 horas + D9), se realizó el TAI y se midió el diámetro del folículo pre-ovulatorio con ultrasonido. El diagnóstico de gestación se llevó a cabo el día 43 después de la IATF, y se repitió el día 61 con el fin de comprobar la tasa de mortalidad fetal. Las tasas de concepción entre los grupos de la GnRH, hCG y LH, fueron respectivamente: 39,4, 51,4 y 45,5% ( $p > 0,05$ ); la ecografía realizada en el día de la IATF puso de manifiesto que el 90,4% de animales tenía folículos pre-ovulatorios de 11,9 mm de diámetro en los ovarios. Los grupos hCG y LH tuvieron una tasa de embarazo más alta que el grupo de GnRH ( $p > 0,05$ ). La tasa de mortalidad fetal fue de 6,25%. Al comparar la ECC con las tasas de embarazo en G1, G2 y G3, no hubo diferencia ( $p > 0,05$ ). Se concluye que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos y que la tasa de mortalidad fetal se puede reducir con la una mejoría de la condición corporal de los animales.

**Palabras clave:** *Bubalus bubalis*, ovsynch, folículo pre-ovulatorio, mortalidad fetal, puntuación de la condición corporal, inseminación artificial en tiempo fijo, sincronización del estro.

## INTRODUÇÃO

O rebanho bubalino brasileiro tem uma taxa média de crescimento anual de 12,5%, alcançando em torno de dois milhões de cabeças no país (1). A produção de leite desta espécie aumentou 28,3%, e a bubalinocultura é responsável por 12,4% da produção mundial de leite (1). A região Sul apresenta o 2º maior rebanho nacional, destacando-se o Paraná na produção de carne e derivados lácteos (2).

A utilização de protocolos que não necessitem de identificação de estro para a realização da IATF, contribuiu bastante para o incremento da utilização desta biotécnica no rebanho bubalino.

Pursley et al. (3), utilizando o protocolo Ovsynch em fêmeas bovinas verificaram que todos os animais haviam ovulado entre 24 e 32 horas após a aplicação da segunda dose de GnRH. Em fêmeas bubalinas, Paul e Prakash (4) verificaram que após a segunda aplicação de GnRH a ovulação ocorreu entre 20 e 32 horas, incidindo a maior ocorrência de ovulação às 23,3 horas. Uma vez conhecido o momento da ovulação, foram realizados experimentos para determinar o melhor período para se realizar a inseminação artificial. Diferentes períodos foram estudados (0, 8, 16, 24 e 32 horas), sendo que as melhores taxas de concepção foram obtidas, quando a IA foi realizada às 16:00 horas após a segunda dose de GnRH no protocolo Ovsynch (5-7).

O objetivo do experimento foi avaliar a substituição do hormônio liberador das gonadotrofinas do protocolo Ovsynch pelo hormônio luteinizante ou pela gonadotrofina coriônica humana sobre a taxa de prenhez, mortalidade fetal e o escore corporal em *Bubalus bubalis*.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em 2008. Foram utilizadas 106 fêmeas bubalinas das raças Murrah e Mediterrâneo do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR - Morretes - PR), em regime semi-estabulado, com peso médio dos animais de 470 kg, idade entre quatro e dez anos e pós-parto de 45 dias. Os animais estavam no período de lactação sendo a produção média de 4,0 litros/animal/dia. A alimentação dos animais era composta por *Brachiaria mutica*, *Brachiaria radicans*, *Brachiaria humidicola*, *Axonopus spp*, *Paspalum spp*, *Hemarthria altiússima* ao pastoreio; e quando estabuladas recebiam *Pennisetum purpureum* e *Saccharum officinarum* picadas e levadas ao cocho (cerca de 35 kg/cabeça/dia) e 2 kg/cabeça/dia de milho moído com minerais. Realizou-se a avaliação do escore de condição corporal (ECC), baseando-se nos critérios de Edmonson et al. (8). Ao todo 81 animais estavam com o ECC na condição de  $\leq 3,0$  e 25 com  $\text{ECC} \geq 3,0$ .

Os hormônios utilizados nos protocolos foram: o acetato de busarelina (Gestran Plus®, Tecnopec); d-cloprostenol (Ciosin®, Intervet Schering-Plough); gonadotrofina coriônica humana (Novolin®, Novo Nordisk) e hormônio luteinizante (Lutropin®, Tecnopec).

Os animais foram divididos ao acaso em três grupos: G1 (n=38), G2 (n=35) e G3 (n=33) e receberam os seguintes tratamentos:

### Grupo 1: (Ovsynch ou controle)

D0-----D7-----D9---+16 h---D10			
GnRH	PGF2 $\alpha$	GnRH	IATF
Acetato de Lecirelina	D-cloprostenol	25 $\mu$ g	
50 $\mu$ g	0,150 mg		

**Grupo 2:** (Tratado com hCG)

<i>D0</i> -----	<i>D7</i> -----	<i>D9</i> ---+16 h---	<i>D10</i>
GnRH	PGF2 $\alpha$	hCG	IATF
Acetato de Lecirelina	D-cloprostenol	2500 UI	
50 $\mu$ g	0,150 mg		

**Grupo 3:** (Tratado com LH)

<i>D0</i> -----	<i>D7</i> -----	<i>D9</i> ---+16 h---	<i>D10</i>
GnRH	PGF2 $\alpha$	LH	IATF
Acetato de Lecirelina	D-cloprostenol	2500 UI	
50 $\mu$ g	0,150 mg		

No dia da última aplicação hormonal do protocolo (D9) foi realizada a ultrassonografia transretal (aparelho Aloka SSD-500, transdutor 5.0 MHz) nos ovários para mensurar o diâmetro dos folículos. No dia seguinte, após 16 horas (momento da IATF), novo exame ultrassonográfico foi feito para mensurar o diâmetro do folículo pré-ovulatório e/ou a ocorrência da ovulação. O diagnóstico de gestação foi realizado com auxílio de aparelho de ultrassonografia no 42º dia após a IAT, mensurando-se também o diâmetro do CL nos animais prenhes. Novo exame ultrassonográfico foi realizado no 63º dia após a IATF para se verificar a taxa de mortalidade fetal nas fêmeas que anteriormente haviam sido diagnosticadas “prenhes”.

**ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Para as variáveis taxa de concepção e de prenhez foi empregado o teste do Chi-quadrado. Foi utilizado também o teste de Chi-quadrado para avaliar a associação entre o protocolo e a concepção em dois níveis de ECC (<3 e >3) (9). Devido ao caráter quantitativo da variável ECC, procedeu-se um estudo de regressão com o intuito de quantificar o efeito do aumento dos níveis desta variável sob a taxa de concepção (probabilidade da fêmea estar prenhe). Para tanto se adotou a técnica de regressão logística implementada no software estatístico SAS<sup>®</sup> por meio do PROC LOGISTIC (10). Admitiu o valor de  $p < 0,05$  para as análises.

**RESULTADOS E DISCUSSÃO**

De acordo com os resultados obtidos, não se observou diferença significativa de resultados na correlação entre os protocolos e o diâmetro do folículo pré-ovulatório com a variável concepção.

Tabela 1. Taxa de concepção em fêmeas bubalinas das raças Murrah e Mediterrâneo, submetidas à inseminação artificial em tempo fixo mediante os protocolos Ovsynch tradicional (G1) e os modificados (G2 e G3), n=106, 2008.

Grupo	Número de animais (n)	Taxa de concepção (%)
G1	38	39,4 <sup>a</sup>
G2	35	51,4 <sup>a</sup>
G3	33	45,5 <sup>a</sup>

Letras iguais na mesma coluna não são significantes

Os dados da Tabela 1 indicam que não houve diferença estatística entre os tratamentos, porém observou-se uma tendência de melhores resultados no grupo de búfalas que receberam o protocolo com o hCG (G2) em relação ao grupo que recebeu GnRH (G1). Tais resultados são muito semelhantes àqueles obtidos por Carvalho et al. (11), os quais compararam a taxa de concepção de animais que receberam GnRH ou hCG no protocolo Ovsynch. Estes pesquisadores obtiveram taxa de concepção de 46,8% e 50,8%, respectivamente ( $P>0,07$ ), evidenciando vantagens ao se administrar o HCG, no protocolo ovsynch modificado. Ao se comparar a taxa de concepção entre os grupos GnRH e LH, os dados encontrados na presente pesquisa são discordantes aos obtidos por Baruselli (12), ao compararem a taxa de concepção destes tratamentos, quando verificaram vantagens significativas ( $p<0,05$ ) ao se empregar o LH, em substituição ao GnRH (taxas de concepção de 46,49% e 65,24%, respectivamente). Os resultados diferentes podem ter sido influenciados pelo número de animais por grupo e/ou dosagem hormonal utilizada. Contudo os dados do presente experimento são semelhantes aos reportados por outros autores (4, 13, 14), ao enfatizarem melhorias na sincronização da ovulação utilizando estes hormônios.

Neste estudo, ao se comparar a associação entre os protocolos de sincronização da ovulação (GnRH, hCG e LH) e a probabilidade de concepção dentro de cada nível de ECC ( $>3$  ou  $\leq 3$ ), não se verificou diferença significativa de resultados (Figura 1).

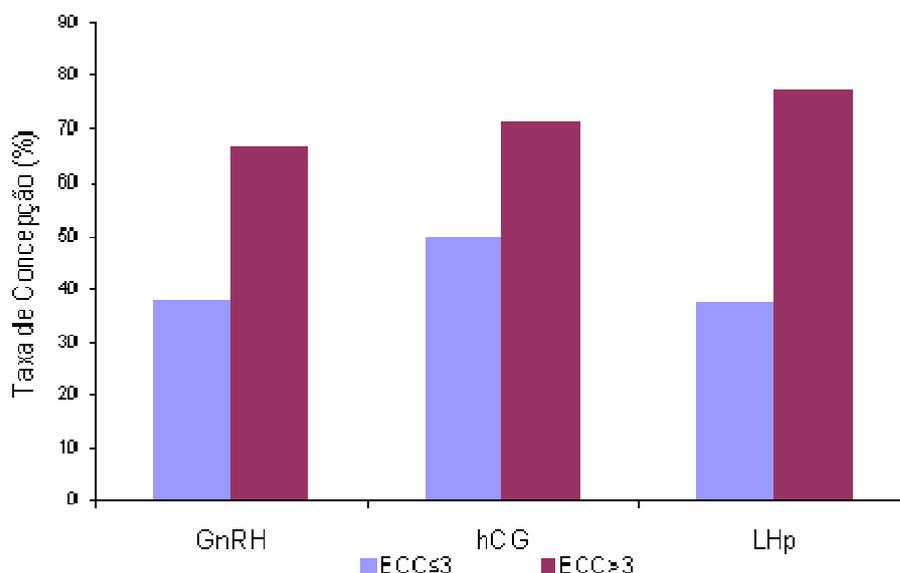


Figura 1. Taxa de concepção em *Bubalus bubalis* em função dos níveis de ECC ( $>3$  com  $p=0,56$  ou  $\leq 3$  com  $p=1,00$ ) dos animais para cada protocolo de sincronização utilizado.

Não houve diferença significativa entre os escores corporais ( $p>0,05$ ).

Considerando os resultados do experimento e aplicando-se a regressão logística, quantificou-se a influência do ECC sobre a taxa de concepção (Figura 2). Foi possível

observar que, em função do aumento de uma unidade no valor do ECC, (média), houve aumento médio de 24,3 % sobre a taxa de concepção,  $(21,3 + 30,0 + 21,6)/3=24,3$  (%). Observa-se ainda que o maior aumento (30%) foi proporcionado por valores de ECC entre 2,5 e 3,5.

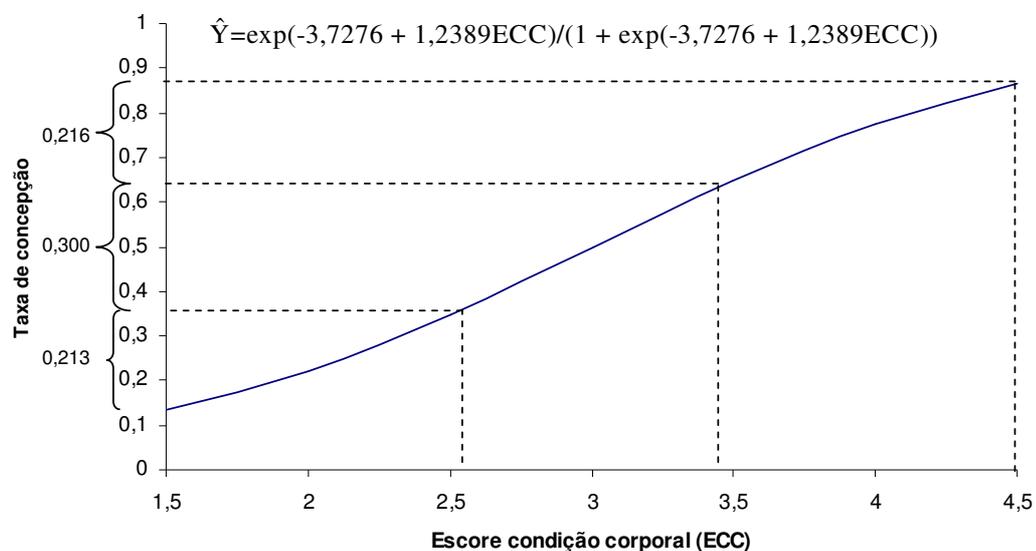


Figura 2. Curva estimada com vistas à descrição da relação entre o escore da condição corporal e a taxa de concepção por meio da técnica de regressão logística.

Os dados do presente estudo corroboram os relatos de Baruselli et al. (15), ao observarem a influência ( $p < 0,05$ ) do ECC sobre a taxa de concepção ( $\leq 3,0 = 31,4\%$ ,  $n=223$ ;  $3,5 = 52,9\%$ ,  $n=546$ ;  $\geq 4,0 = 57,1\%$ ,  $n=198$ ), ao pesquisarem fêmeas bubalinas no Vale do Ribeira (SP). Os exames de ultrassonografia transretal antes da IATF revelaram, na presente pesquisa, que 90,4% dos animais possuíam folículos com diâmetro  $\geq 1,0$  cm nos ovários, indicando sincronização de estro. O folículo pré-ovulatório possuía em média  $1,19 \pm 0,14$  cm de diâmetro. Os dados de diâmetro de folículo pré-ovulatório ou do dominante e de corpo lúteo em cada grupo encontram-se na Tabela 2. Estes dados são semelhantes aos obtidos por Campanile et al. (14), onde 86,7% dos animais apresentaram folículos com diâmetro superior a 1,0 cm no momento da IATF. Sartori, Rosa e Wiltbank (16), ao administrarem LH exógeno, demonstraram que somente folículos com mais de 0,85 cm possuíam capacidade ovulatória. Estes autores sugeriram que a expressão de receptores para LH ocorre apenas em folículos com mais de 0,8 cm, demonstrando que folículos menores são incapazes de ovular, mesmo após receberem altas doses de LH exógeno. Por esse motivo calcula-se que a taxa de sincronização de estro, baseia-se no número de animais que possuem folículos com capacidade ovulatória, ou seja, maiores que nove mm. Neste experimento a taxa de sincronização foi satisfatória (90,4%).

A utilização de GnRH, hCG e/ou LH no dia 9 do protocolo teve como objetivo promover a indução sincronizada da ovulação do folículo dominante ( $> 0,9$  cm) pelo efeito fisiológico de estimular a liberação de LH e FSH na hipófise anterior. Essa sincronização permite melhores resultados quanto à taxa de prenhez quando comparada com outros protocolos que não incluem a utilização de indutores da ovulação.

Tabela 2. Diâmetro médio do folículo dominante (FD) no dia da inseminação artificial em tempo fixo e do corpo lúteo (CL) nas búfalas gestantes no 43º dia.

Grupo	Número de animais (n)	Diâmetro médio do FD (cm) na IATF	Diâmetro médio do CL (cm) no 43º dia de prenhez
G1	14	1,13	2,19
G2	18	1,22	2,17
G3	15	1,25	2,15

Na presente pesquisa objetivou-se igualmente verificar a taxa de perdas embrionárias entre o 43º e o 61º dia após a IATF, obtendo-se a cifra de 6,25%, constando os dados individuais dos animais na Tabela 3. Campanile et al. (14), obtiveram percentual de perda embrionária muito próxima a da presente pesquisa (7%) em búfalas inseminadas após a sincronização de estro. Esses mesmos autores utilizaram o GnRH e o HCG em diferentes tratamentos de sincronização de estro, verificando que os animais que haviam recebido HCG, demonstraram maiores concentrações de progesterona (386 pg/ml) em relação aos animais que haviam recebido GnRH (344 pg/ml), não observando contudo, redução das perdas embrionárias.

Tabela 3. Dados dos folículos pré-ovulatórios e de corpo lúteo em animais que tiveram perda fetal entre o 43º e o 61º dia após a inseminação artificial (n=5).

Grupo	Ovário	Folículo (cm)	Corpo Lúteo (cm)
G1	Esquerdo	1,1	2,1
G1	Esquerdo	1,2	2,2
G1	Direito	1,2	2,1
G2	Esquerdo	1,2	2,2
G3	Direito	0,9	2,0

No presente estudo, ao se relacionar a perda fetal com o protocolo utilizado, não se verificou benefício do uso do hCG ou do LH em relação ao GnRH (P= 0,712).

## CONCLUSÕES

A segunda aplicação de GnRH do protocolo Ovsynch tradicional pode ser substituída pelo uso de hCG ou de LH para indução da ovulação em fêmeas bubalinas obtendo-se taxas de prenhez satisfatórias.

À medida que o escore de condição corporal aumenta em uma unidade, a taxa de prenhez pode aumentar significativamente.

## REFERÊNCIAS

1. Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação. Arquivo de notícias [Internet]. Brasília; 2009 [acesso em 2009 Mar 17]. Disponível em: <http://www.fao.org.br>
2. Associação Brasileira dos Criadores de Búfalos. Info Produtor [Internet]. São Paulo; 2009 [acesso em 2009 Mar 20]. Disponível em: <http://www.bufalo.com.br>
3. Pursley JR, Wiltbank MC, Stevenson JS, Ottobre JS, Garverick HA, Anderson LL. Pregnancy rates per artificial insemination for cows and heifers inseminated at a synchronized ovulation or synchronized estrus. J Dairy Sci. 1997;80:295-300.

4. Paul V, Prakash BS. Efficacy of the ovsynch protocol for synchronization of ovulation and fixed-time artificial insemination in Murrah buffaloes (*bubalus bubalis*). *Theriogenology*. 2005;64:1049-60.
5. Fricke PM, Guenther JN, Wiltbank MC. Efficacy of decreasing the dose of gnrh used in a protocol for synchronization of ovulation and timed ai in lactating dairy cows. *Theriogenology*. 1998;50:1275-84.
6. Tenhagen BA, Drillich M, Surholt R, Heuwieser W. Comparison of timed AI after synchronized ovulation to AI at estrus: reproductive and economic considerations. *J Dairy Sci*. 2004;87:85-94.
7. Sarkar M, Prakash BS. Synchronization of ovulation in yaks (*poephagus grunniensl.*) using pgf2 and gnrh. *Theriogenology*. 2005;63:2494-503.
8. Edmonson AJ, Lean IJ, Weaver LD, Farver T, Webster G. A body condition scoring chart for holstein dairy cows. *J Dairy Sci*. 1989;72:68-78.
9. Campos H. Estatística não paramétrica. 4o ed. Piracicaba: ESALQ/USP; 1983.
10. Statistical Analysis System user's guide. Version 9.1. Cary - USA: SAS Institute; 2006.
11. Carvalho NAT, Reichert RH, Nichi M, Henriquez CEP, Oliveira CA, Baruselli PS. Use of hCG to timed artificial insemination in buffalo [abstracts]. In: Proceedings of the 15th International Congress on Animal Reproduction; 2004, Porto Seguro. Belo Horizonte: CBRA; 2004.v.2, p.384.
12. Baruselli PS. Sincronização da ovulação com GnRH e prostaglandina f2 $\alpha$  para inseminação artificial em tempo fixo em bubalinos [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo; 2002.
13. Neglia G, Gasparrini B, Di Palo R, De Rosa C, Zicarelli L, Campanile G. Comparison of pregnancy rates with two oestrus synchronization protocols in Italian Mediterranean buffalo cows. *Theriogenology*. 2003;60:125-33.
14. Campanile G, Neglia G, Gasparrini B, Galiero G, Prandi A, Di Palo R, et al. Embryonic mortality in buffaloes synchronized and mated by AI during the seasonal decline in reproductive function. *Theriogenology*. 2005;63:2334-40.
15. Baruselli OS, Madureira EH, Vsintin JA, Barnabe VH, Barnabe RC, Amaral R. Inseminação artificial em tempo fixo com sincronização da ovulação em bubalinos. *Rev Bras Reprod Anim*. 1999;23:360-2.
16. Sartori R, Rosa GJ, Wiltbank MC. Ovarian structures and circulating steroids in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *J Dairy Sci*. 2001;85:2813-22.

**Recebido em: 23/11/11**

**Aceito em: 25/07/12**