

Associação da medroxiprogesterona ao protocolo Ovsynch para inseminação artificial em tempo fixo de búfalas cíclicas (*Bubalus bubalis*) criadas na Amazônia Oriental

Alexandre Rossetto GARCIA^{1*}; Benjamim de Souza NAHÚM¹; José de Brito LOURENÇO JUNIOR¹; Norton Amador da COSTA¹; Kelly da Silva GONÇALVES²; Michel Yoshio Almeida MIYASAKI²; André Furugen Cesar de ANDRADE³; Rubens Paes de ARRUDA⁴.

RESUMO

O presente estudo visou avaliar os efeitos da associação da medroxiprogesterona (análogo sintético da progesterona) ao protocolo Ovsynch sobre o crescimento folicular, a ovulação e a taxa de concepção de búfalas criadas na Amazônia Oriental (Tracuateua-PA). Vinte e sete fêmeas adultas (G1 n=14 e G2 n=13), cíclicas, sem bezerro ao pé e com ECC 3,5 foram submetidas a Ovsynch. Os animais do G2 receberam 60 mg de medroxiprogesterona entre D0 e D7 (D0=início do tratamento). A ultrasonografia ovariana foi realizada nos D 0, 7, 9 e 10. O contingente de folículos pequenos diferiu no D7 (G1: 4,57±0,60 versus G2: 6,54±0,67; P=0,05). Tempo e tratamento influenciaram o diâmetro folicular no D7. O crescimento do folículo dominante entre D7 e D9 foi maior nos animais tratados (G1: 2,05±0,49 mm/dia versus 3,48±0,41 mm/dia; P<0,05). Mais animais do G1 ovularam precocemente (35,71% versus 30,77%), porém isso não afetou as taxas de concepção (G1: 50,00% e G2: 30,77%; P>0,05). Os achados sugerem que a medroxiprogesterona (1) aumenta recrutamento folicular e retarda o crescimento dos folículos com diâmetro maior que 5,0 mm entre D0 e D7; (2) sua retirada incrementa em 1,7 vezes o crescimento folicular do D7 ao D9; (3) pode contribuir para a ovulação de folículos maiores e, em tese, para maior formação de tecido luteínico; (4) não promove ovulação precoce após o Ovsynch; (5) não eleva as taxas de concepção após sincronização de fêmeas cíclicas e com bom escore corporal, devendo ser avaliada para uso em fêmeas acíclicas ou com ECC mais baixo.

PALAVRAS-CHAVE: Bubalino; progesterona; sincronização do estro; inseminação artificial; Amazônia.

The association of medroxyprogesterone to the Ovsynch protocol for the fixed time artificial insemination of cyclic buffaloes (*Bubalus bubalis*) in the Eastern Amazon

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of the association of medroxyprogesterone with the Ovsynch protocol on the follicular growth, ovulation, and conception rate of buffaloes in the Eastern Amazon (Tracuateua-PA). Twenty-seven cyclic, non-lactating females (G1 n=14 and G2 n=13) with a 3.5 BCS were synchronized with the Ovsynch. Animals from G2 received a supplementation of 60 mg of medroxyprogesterone from D0 to D7 (D0=starting day of treatment). Ultrasonography evaluation on ovaries was realized on Days 0, 7, 9, and 10. A significant effect of treatment on follicle number was observed on D7 (G1: 4.57±0.60 versus G2: 6.54±0.67; P=0.05). Time and treatment influenced follicular diameter on D7. The growth of the dominant follicular was increased from D7 to D9 on treated females (G1: 2.05±0.49 mm/day versus 3.48±0.41 mm/day; P<0.05). G1 animals (35.71% versus 30.77%) ovulated comparatively earlier than their G2 counterparts, but this did not affect the conception rates (G1: 50.00% and G2: 30.77%; P>0.05). The findings suggest that medroxyprogesterone: (1) increases follicular recruitment and inhibits the growth of follicles whose diameter was larger than 5.0mm from D0 to D7; (2) the withdrawal of medroxyprogesterone speeds up follicular growth 1.7 fold from D7 to D9; (3) would probably contribute to the ovulation of larger follicles thereby forming more luteal tissue; (4) does not stimulate early ovulation after Ovsynch; and (5) does not elevate the conception rate after the synchronization of cyclic females with good body condition, and should be evaluated for the utilization in acyclic/reduced BCS females.

KEY WORDS: Buffalo; progesterone; estrus synchronization; artificial insemination; Amazon.

¹ Pesquisador da Embrapa Amazônia Oriental, Travessa Enéas Pinheiro, s/n. Belém-PA. CEP 66095-100.

² Estudante de Medicina Veterinária – Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém-PA.

³ Estudante de Doutorado – Universidade de São Paulo, Pirassununga-SP.

⁴ Professor de Medicina Veterinária – Universidade de São Paulo, Pirassununga-SP.

* correspondências para argarcia@cpatu.embrapa.br

INTRODUÇÃO

A população bubalina brasileira (*Bubalus bubalis*) é composta por aproximadamente 2,5 milhões de animais e apresentou nos últimos 10 anos crescimento médio anual de 12%, índice também verificado nas criações estabelecidas na Amazônia brasileira (Diaz et al., 2001). Paralelamente ao crescimento quantitativo do rebanho bubalino, existe a necessidade de incremento qualitativo na produção, inclusive no tocante às características reprodutivas, a fim de se acelerar os efeitos positivos do melhoramento genético, que possibilita progressos genéticos significativos nos animais de produção.

Os bubalinos ainda são considerados por alguns pesquisadores como animais de pobre desempenho reprodutivo por apresentarem variações nos índices reprodutivos, os quais, na maioria das vezes, são decorrentes de erros no manejo e do baixo nível tecnológico empregado na criação, bem como das insatisfatórias condições nutricionais, sanitárias e geográficas às quais os animais são submetidos. Quando empregadas com critério, diversas tecnologias apresentam impacto positivo na eficiência produtiva de rebanhos bubalinos, dentre elas a inseminação artificial em tempo fixo.

A fim de incrementar cada vez mais o desempenho reprodutivo dos bubalinos submetidos à inseminação artificial, é necessário compreender os eventos e os mecanismos controladores da dinâmica folicular ovariana durante seu ciclo estral fisiológico (Baruselli et al., 1997; Manik et al., 2002), bem como naqueles ciclos induzidos pela utilização de hormônios exógenos. O conhecimento mais profundo da atividade folicular durante o processo de sincronização do estro pode fornecer informações capazes de melhorar a fertilidade dos estros sincronizados, realçando a resposta ao controle hormonal exógeno, tendo em vista que os eventos de recrutamento, seleção, crescimento, dominância e atresia dos folículos ovarianos não estão completamente compreendidos nos bubalinos (Awasthi et al., 2006).

Os folículos ovarianos nos bubalinos desenvolvem-se em ondas, tais como nos bovinos (Baruselli et al., 1997; Sing et al., 2000). Cada onda folicular é caracterizada pelo crescimento sincrônico de um grupo de folículos, onde apenas um continua a se desenvolver, enquanto os outros regridem em intervalos variados (Evans, 2003). Durante cada onda, um folículo é selecionado, tornando-se maior e dominante, em virtude da inibição do crescimento dos outros folículos via da secreção de inibina. Depois da dominância, o folículo pode ovular (folículo dominante ovulatório) ou sofrer atresia (folículo dominante não ovulatório), na dependência da fase de dominância estar associada ou não à luteólise (Taneja et al., 1996; Manik et al., 1998). O grau de sincronismo entre a ocorrência da dominância folicular e da luteólise determina a capacidade de uma fêmea em apresentar ovulação, evento este dependente da liberação do hormônio luteinizante

(LH) (Barros et al., 1995). O pico pré-ovulatório de LH ocorre somente quando a progesterona sérica se encontra em baixos níveis, o que pode ser causado por luteólise ou, em tese, pela remoção de dispositivo que contenha progesterona suplementar.

Estudos prévios têm demonstrado que elevação nos níveis de progesterona durante a fase luteínica anterior à inseminação artificial tem efeito positivo na taxa de concepção em bovinos (Folman et al., 1973; Rosenberg et al., 1990; Ando et al., 2004; Kuroiwa et al., 2005). Quando o estro de fêmeas bovinas é sincronizado segundo o protocolo Ovsynch e há suplementação com progesterona, o incremento nas taxas de prenhez tem ocorrido em diferentes graus, tanto para fêmeas leiteiras quanto de corte (Lamb et al., 2001; Kawate et al., 2006; Melendez et al., 2006; Stevenson et al., 2006; Saldarriaga et al., 2007). Recentemente, foi demonstrado que a associação de progesterona ao protocolo Ovsynch para a sincronização do estro é capaz de elevar a taxa de concepção em fêmeas bubalinas (Ribeiro et al., 2003; De Rensis et al., 2005). Contudo, os eventos ovarianos decorrentes do uso da progesterona associada ao Ovsynch não foram estudados nas búfalas. Deste modo, os resultados de pesquisa sugerem que incrementos na eficiência reprodutiva de búfalas cíclicas podem ser esperados se estas forem submetidas ao Ovsynch e também suplementadas com progesterona durante os primeiros sete dias de tratamento hormonal. Os estudos sobre a dinâmica folicular ovariana durante o uso da referida associação hormonal podem prover bases para o incremento da fertilidade, aumento da precisão da sincronização dos estros e elevação das respostas superovulatórias em bubalinos.

Em virtude da necessidade de maior conhecimento sobre a dinâmica folicular ovariana em búfalas submetidas a novos protocolos de sincronização do estro, o presente estudo teve o objetivo de avaliar os efeitos da associação da medroxiprogesterona (um análogo sintético da progesterona) ao protocolo Ovsynch sobre o crescimento folicular, a ovulação e a taxa de concepção de fêmeas bubalinas criadas na Amazônia Oriental.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no município de Tracuateua-PA (1° 10' de latitude Sul e 46° 09' de longitude Oeste de Greenwich), em unidade demonstrativa para produção de bubalinos em pequena propriedade, durante o mês de dezembro de 2006. O tipo climático local, segundo classificação de Köppen, é o Ami, caracterizado por chuvas mais frequentes entre os meses de dezembro a julho e período seco que se estende de agosto a novembro. A área experimental era formada por 12 hectares de pastagem com *Brachiaria brizantha*, em sistema silvipastoril. A pastagem foi subdividida em seis piquetes de 2 hectares cada, onde os animais foram

mantidos sob regime de pastejo rotacionado intensivo. Na área de manejo, centralizada em relação aos piquetes, foram instalados bebedouro automático e cocho coberto para mineralização dos animais, os quais tinham acesso à água para bebida e sal mineral *ad libitum*.

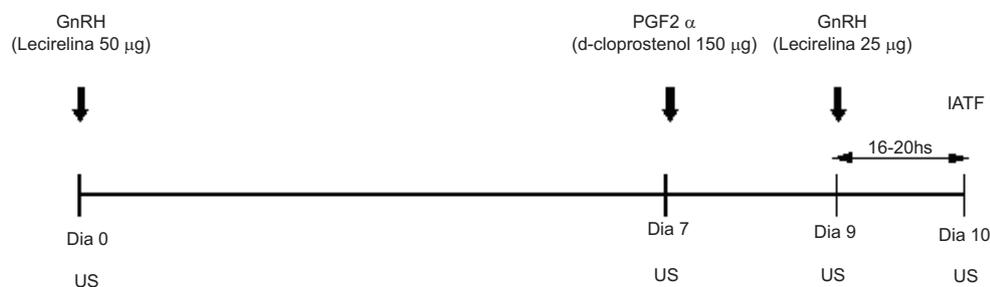
Foram utilizadas 27 búfalas adultas, com idade média de $4,27 \pm 2,28$ anos, cíclicas e sem bezerro ao pé. O peso médio dos animais era de $537 \pm 95,6$ kg e o escore corporal médio era de 3,5 (em escala de 1 a 5). Os animais foram divididos em dois grupos, G1 (n = 14) e G2 (n = 13), considerando seu peso, escore corporal, idade e ordem de parto, de modo que os grupos experimentais fossem equilibrados. Todos os animais (G1 e G2) foram submetidos ao protocolo de sincronização Ovsynch, e receberam administrações de GnRH (lecirelina – Gestran Plus®, Arsa S.R.L., Argentina) no dia 0 (D0 = início do tratamento; 50 µg I.M.) e no dia 9 (25 µg I.M.), além de uma aplicação de prostaglandina (d-cloprostenol, 150 µg I.M. – Prolise®, Arsa S.R.L., Argentina) no dia 7, conforme descrito por Baruselli et al. (2001). Adicionalmente, os animais do G2 foram suplementados com 60 mg de medroxiprogesterona entre os dias 0 e 7, por aplicação de dispositivo intravaginal (Progespon®, Syntex S.A., Argentina). A inseminação artificial foi realizada em todas as búfalas entre 16 e 20 horas após a

segunda administração do GnRH, independentemente de apresentarem sinais de estro. Os tratamentos utilizados estão representados na Figura 1.

Para avaliar a presença, o tamanho e o desenvolvimento dos folículos ovarianos, bem como a possível presença e regressão de corpos lúteos, as búfalas tiveram seus ovários monitorados por ultra-sonografia transretal nos dias 0, 7 e 9 do tratamento hormonal e no dia 10, quando foi realizada a inseminação artificial. A ultra-sonografia foi realizada sempre pelo mesmo operador e o transdutor utilizado foi o modelo linear de 7,5 MHz (Scanner 200®, Pie Medical, Holanda). Todas as estruturas ovarianas visíveis à ultra-sonografia foram identificadas, mensuradas e sua posição relativa no ovário registrada, conforme Savio et al. (1988). Com base nos registros ultra-sonográficos, o crescimento individual dos folículos, a luteólise e eventuais ovulações foram avaliados até 20 horas após o final do tratamento hormonal (dia 10).

O diâmetro de cada estrutura ovariana foi mensurado duas vezes e a média das aferições foi usada como sendo sua medida. Os folículos ovarianos foram classificados de acordo com seu diâmetro em folículos pequenos (tamanho $\leq 5,0$ mm), folículos médios (tamanho entre 5,0 mm e 8,0 mm) ou folículos grandes (tamanho $\geq 8,0$ mm). A ovulação foi

Grupo 1



Grupo 2

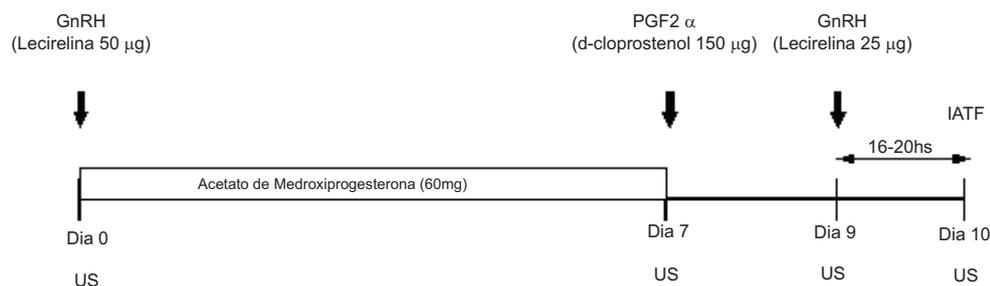


Figura 1- Cronologia de tratamentos hormonais em búfalas criadas na Amazônia Oriental, baseados em aplicações intramusculares de hormônios (Grupo 1) e em aplicações intramusculares + dispositivo intravaginal (Grupo 2), com concomitante execução de avaliações ultra-sonográficas dos ovários (US) para inseminação artificial em tempo fixo (IATF).

definida pelo desaparecimento do maior folículo ovariano identificado na ultra-sonografia imediatamente anterior. A taxa de crescimento diário dos folículos foi calculada pela diferença dos diâmetros individuais obtidos em duas mensurações consecutivas, dividida pelo número de dias transcorridos entre as ultra-sonografias, conforme Rhodes et al. (1995). Nos dias 7 e 9, a dominância foi detectada com base no crescimento individual dos folículos e pela regressão de tamanho determinada nos folículos adjacentes.

Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão (EP), com nível de significância de 5%. O crescimento e a taxa de crescimento diário do folículo dominante foram submetidos à Análise de Variância pelo PROC GLM do SAS. As variáveis número de folículos e diâmetro do folículo dominante, além de serem submetidas à Análise da Variância, foram ainda adicionadas do fator medidas repetidas no tempo, referente aos diferentes dias de amostragem. As probabilidades de interações com o tempo foram determinadas pelo teste de Greenhouse-Geisser, utilizando-se o comando REPEATED gerado pelo procedimento GLM do SAS (SAS, 1996). As taxas de ovulação entre o D9 e o D10 e as taxas de concepção foram expressas em porcentagem e comparadas pelo Teste Exato de Fisher ($P < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O número de folículos ovarianos detectados por ultra-sonografia nos dias 0, 7 e 9 do tratamento hormonal está apresentado na Tabela 1. No dia 0, não foi detectada diferença estatística no número de folículos pequenos, médios e grandes entre os grupos, demonstrando a homogeneidade da condição ovariana dos animais previamente ao tratamento. A condição ovariana no D0 não foi resultante de qualquer intervenção hormonal exógena, uma vez que as ultra-sonografias foram executadas anteriormente a qualquer aplicação hormonal. Em ambos os grupos, foram detectados nos ovários um número maior de folículos pequenos (G1: 4,56 e G2: 4,44), do que folículos médios (G1: 1,44 e G2: 1,00) ou grandes (G1: 0,78 e G2: 0,89), em concordância com os processos de recrutamento, seleção e dominância foliculares, que estabelecem o crescimento competitivo entre os folículos, de modo que, nos animais monotócicos, apenas um folículo atinge o estágio ovulatório e a maioria dos folículos recrutados e selecionados regride. Esse fenômeno foi bem descrito em búfalas por Baruselli et al. (1997), para fêmeas com duas ou três ondas foliculares.

No dia 7, foi detectada diferença significativa no contingente de folículos pequenos entre os animais do G1 e do G2. O número de folículos pequenos nos ovários dos animais tratados com medroxiprogesterona foi maior (G1: 4,57 \pm 0,60 versus G2: 6,54 \pm 0,67; $P = 0,05$). Nessa fase da sincronização, o número de folículos médios e grandes não

apresentou diferença significativa entre os animais do G1 e do G2 (folículos médios: G1: 1,29 \pm 0,29 versus G2: 0,77 \pm 0,41; $P > 0,05$ e folículos grandes G1: 0,50 \pm 0,17 versus 0,39 \pm 0,18; $P > 0,05$). A medroxiprogesterona exógena aumentou o número de folículos recrutados, mas, enquanto o implante de medroxiprogesterona foi mantido, houve uma contenção no desenvolvimento dos folículos médios e grandes, os quais não foram capazes de se desenvolver em uma velocidade compatível àquela dos folículos menores. Esse efeito da progesterona sobre o crescimento folicular foi citado também por Presicce et al. (2005), os quais relataram que após a inserção de implantes de progesterona, suas concentrações séricas se elevam a ponto de reduzir a frequência de liberação pulsátil de LH e induzir o início da renovação folicular.

No D9, dois dias após a retirada do implante, a ultra-sonografia ovariana revelou que os animais do G1 tenderam a igualar o número de folículos aos animais do G2, não havendo diferença estatística significativa entre os grupos, independentemente do tamanho dos folículos. Portanto, os animais tratados com medroxiprogesterona apresentaram, do D7 ao D9, uma redução no número de folículos pequenos, acompanhada por compensação no número de folículos médios e grandes. O término da suplementação com medroxiprogesterona desbloqueou o avanço do crescimento dos folículos e permitiu que uma quantidade maior destes evoluísse para a classe de médios e grandes folículos. O decréscimo nos níveis endógenos de progesterona, decorrente da retirada do implante e da indução da luteólise no D7,

Tabela 1- Número de folículos ovarianos detectados por ultra-sonografia nos dias 0, 7 e 9 do tratamento para sincronização do estro em búfalas, com uso do protocolo Ovsynch (Grupo 1) ou do protocolo Ovsynch associado à medroxiprogesterona (Grupo 2). Tracuateua-PA, 2006.

Classe de Folículos*	Número de Folículos	
	G 1 (sem implante; n=14)	G 2 (com implante; n=13)
Dia 0		
Folículos pequenos	4,56 \pm 0,58	4,44 \pm 0,80
Folículos médios	1,44 \pm 0,34	1,00 \pm 0,33
Folículos grandes	0,78 \pm 0,28	0,89 \pm 0,26
Dia 7		
Folículos pequenos	4,57 \pm 0,60 ^a	6,54 \pm 0,67 ^b
Folículos médios	1,29 \pm 0,29	0,77 \pm 0,41
Folículos grandes	0,50 \pm 0,17	0,39 \pm 0,18
Dia 9		
Folículos pequenos	4,71 \pm 0,86	4,85 \pm 0,82
Folículos médios	1,00 \pm 0,26	0,85 \pm 0,22
Folículos grandes	1,00 \pm 0,18	0,92 \pm 0,24

* Folículos pequenos: \leq 5,0 mm; Folículos médios: entre 5,0 e 8,0 mm; Folículos grandes \geq 8,0 mm. Letras minúsculas distintas indicam diferença estatística significativa dentro das linhas ($P \leq 0,05$).

permitiu que o FSH e o LH fossem liberados e estimulassem o desenvolvimento, principalmente dos folículos médios, uma vez que os folículos ovarianos de bubalinos podem emergir a partir de diâmetros que variam de $4,20 \pm 0,37$ mm (para folículos que se tornam ovulatórios) a $5,40 \pm 0,24$ mm (para folículos anovulatórios), conforme trabalhos de Manik et al. (2002).

Os diâmetros dos folículos dominantes mensurados nos dias 7 e 9 encontram-se expressos na Tabela 2. Foram considerados dominantes aqueles folículos que emergiram ao início do tratamento, chegaram ao dia 9 com diâmetro mínimo de 7,2 mm, tamanho a partir do qual se estabelece a divergência folicular em bubalinos (Gimenes, 2006). Concomitantemente, os folículos dominantes deveriam apresentar crescimento positivo do dia 0 até o dia 10, juntamente à regressão do diâmetro dos outros folículos ovarianos, considerados subordinados, conforme descrito por Knopf et al. (1989). Esse mecanismo conjunto de crescimento e regressão de folículos dominante e subordinados forma uma onda folicular, fenômeno bem descrito nas búfalas por Baruselli et al. (1997).

O diâmetro médio dos maiores folículos presentes nos ovários ao início do tratamento foi de $8,85 \pm 1,63$ mm no G1 e $10,0 \pm 1,29$ mm no G2, indicando que os animais de ambos os grupos apresentavam condições satisfatórias para ovular após a primeira administração do GnRH, uma vez que esse evento ocorre em 70,5% das búfalas com folículos de diâmetro de $8,0 \pm 1,9$ mm, conforme Baruselli et al. (2003). De fato, no D7, foram detectados corpos lúteos nos ovários de 9 das 14 fêmeas do G1 (64,28%) e em 8 das 13 fêmeas do G2 (61,53%), o que conferiu uma taxa de ovulação total de 62,96% ($n=17/27$) após a primeira administração de GnRH. Porém, esta taxa foi inferior à observada por Berber et al. (2002), que detectaram ovulação em 86,6% das búfalas com folículos de $9,0 \pm 0,2$ mm de diâmetro no momento da primeira administração de GnRH. Como a indução de uma nova onda folicular pela supressão do folículo dominante e a luteólise são fatores chave para o sucesso da sincronização no protocolo Ovsynch, a ovulação induzida no início do tratamento é considerada como o primeiro requisito para que este protocolo seja executado com sucesso.

Os diâmetros médios foliculares no D7 e no D9 sofreram efeito significativo da interação entre tempo e tratamento, sendo que no D7 o diâmetro médio do folículo dominante foi maior numericamente nos animais que não receberam dispositivos intravaginais de medroxiprogesterona (G1: $6,28 \pm 0,75$ mm versus G2: $5,16 \pm 0,61$ mm; $P>0,05$). Com a ovulação ocorrida após a primeira administração de GnRH, houve a possibilidade de início de uma nova onda folicular, o que se estabelece em $1,16 \pm 0,50$ dia ou $1,10 \pm 0,32$ dia após a ovulação, para búfalas de duas ou três ondas

foliculares, respectivamente (Baruselli et al., 1997). O menor diâmetro folicular dos animais que receberam implantes pode indicar que a medroxiprogesterona tenha determinado um crescimento mais lento do folículo dominante entre os dias 0 e 7 do tratamento, o que corrobora observações de Baruselli et al. (1997), que também observaram inibição do crescimento folicular em bubalinos por concentrações luteínicas de progesterona.

O diâmetro do folículo dominante no D9 (G1: $10,38 \pm 0,82$ mm versus G2: $12,11 \pm 0,73$ mm) foram inferiores ao encontrado por Presicce et al. (2004) que detectaram $13,8 \pm 0,6$ mm. Comparando entre grupos, o diâmetro do folículo dominante foi numericamente maior para os animais que receberam implantes de medroxiprogesterona ($P>0,05$). Esse fato pode parecer contraditório, em função dos menores diâmetros foliculares apresentados pelos animais do G2 no D7. Contudo, o que se observou foi que, tão logo a medroxiprogesterona foi retirada, os animais que anteriormente haviam recebido implantes apresentaram uma taxa de crescimento do folículo dominante 1,7 vezes maior que os animais não implantados. Esse crescimento compensatório foi determinado pela retirada da medroxiprogesterona, cujo efeito, associado ao efeito da progesterona endógena secretada pelo corpo lúteo antes da luteólise, pode ter diminuído a expressão de receptores para LH nas células da camada da granulosa e, assim, ter retardado o crescimento folicular do D0 ao D7. Tão logo o efeito da medroxiprogesterona foi suprimido e a luteólise funcional foi induzida pela administração de análogo da prostaglandina no D7, os folículos podem ter passado por um processo de retomada numérica e funcional dos receptores para LH. A maior secreção de LH conseqüente à menor disponibilidade de progesterona circulante a partir do D7 deve ter sido a responsável pelo crescimento acelerado dos folículos dos animais do G2 nesse período.

Apesar dos animais do G2 terem apresentado menores diâmetros do folículo dominante no D7 que os animais do G1,

Tabela 2- Diâmetros dos folículos ovarianos nos dias 7 e 9 do tratamento para sincronização do estro em búfalas, com uso do protocolo Ovsynch (Grupo 1) ou do protocolo Ovsynch associado à medroxiprogesterona (Grupo 2). Tracuateua-PA, 2006.

Grupo	Diâmetro do folículo dominante \pm E.P. no D7 (mm)	Diâmetro do folículo dominante \pm E.P. no D9 (mm)
G 1 (sem implante; n=14)	$6,28 \pm 0,75$	$10,38 \pm 0,82$
G 2 (com implante; n=13)	$5,16 \pm 0,61$	$12,11 \pm 0,73$
Probabilidade	0,2884	0,1044

Letras maiúsculas distintas indicam diferença estatística significativa dentro das colunas.

essa situação se inverteu no D9, ocasionada pelo crescimento absoluto do diâmetro do folículo dominante em 48 horas, que foi de $4,11 \pm 0,97$ mm para os animais do G1 e $6,95 \pm 0,81$ mm para os animais do G2, conforme demonstrado na Tabela 3. A taxa de crescimento do folículo dominante entre o D7 e D9 apresentada pelos animais do G1 ($2,05 \pm 0,49$ mm/dia) foi significativamente menor àquela apresentada pelos animais do G2 ($3,48 \pm 0,41$ mm/dia; $P < 0,05$). A taxa de crescimento diário folicular dos animais do G1 foi semelhante às taxas de $1,27$ mm/dia e $1,07 \pm 0,07$ mm/dia relatadas por Presicce et al. (2004) e Presicce et al. (2005b), porém foi maior que a taxa de crescimento linear de $0,86 \pm 0,31$ mm/dia encontrada entre o D0 e D10 por Awasthi et al. (2006). A taxa de crescimento do folículo dominante observada nos animais do G2 superou as taxas de crescimento diário pelos referidos autores.

Os dados obtidos com uso da medroxiprogesterona remetem à questão básica sobre como este fármaco pode ter retardado o crescimento dos folículos pequenos e, conseqüentemente, ter diminuído a transformação dos folículos pequenos em médios e dos folículos médios em grandes durante o período de permanência do implante. A medroxiprogesterona é um progestágeno derivado da progesterona, que possui 21 carbonos e tem menor atividade androgênica que outros progestágenos. É, portanto, um fármaco altamente seletivo e de ação muito semelhante ao hormônio endógeno, não determinando interferências no metabolismo lipídico e de carboidratos (Willians e Stancel, 1996). Em função de suas características farmacológicas, três fatores poderiam ser apontados como possíveis causas do efeito sobre o crescimento dos folículos: o *feedback* negativo da progesterona sobre a hipófise, a indução pela progesterona de maior liberação de inibina pelo folículo dominante ou a ação direta da progesterona sobre os folículos em crescimento.

Tabela 3- Crescimento absoluto (mm) e taxa de crescimento do folículo ovariano dominante (mm/dia) do dia 7 ao dia 9 do tratamento para sincronização do estro em búfalas, com uso do protocolo Ovsynch (Grupo 1) ou do protocolo Ovsynch associado à medroxiprogesterona (Grupo 2). Tracuateua-PA, 2006.

Grupo	Crescimento do folículo dominante \pm E.P. do D7 ao D9 (mm)	Taxa de crescimento do folículo dominante \pm E.P. do D7 ao D9 (mm/dia)
G 1 (sem implante; n=14)	$4,11 \pm 0,97^A$	$2,05 \pm 0,49^A$
G 2 (com implante; n=13)	$6,95 \pm 0,81^B$	$3,48 \pm 0,41^B$
Probabilidade	0,0354	0,0354

Letras maiúsculas distintas indicam diferença estatística significativa dentro das colunas.

Segundo Barros et al. (1995), o *feedback* negativo exercido pela progesterona sobre a hipófise ocasiona uma redução na liberação das gonadotrofinas hipofisárias (FSH e LH). A elevação da progesterona sérica durante a fase luteína diminui a frequência, mas aumenta a amplitude dos pulsos de LH (Willians e Stancel, 1996). Como a competência do folículo em responder ao LH é dependente também da quantidade de receptores para esse hormônio, o aumento no número de receptores torna o folículo capaz de superar os seus concorrentes tanto em seu crescimento quanto em relação à capacidade de ovulação. Gimenes (2006) detectou que, em bubalinos, o folículo se torna mais responsivo ao LH quando o diâmetro folicular é de $7,2 \pm 0,3$ mm. Assim, um decréscimo de LH induzido pelo *feedback* negativo imposto pela progesterona justificaria isoladamente a redução no crescimento dos folículos médios e grandes entre o D0 e o D7 do tratamento. Em muitos sistemas biológicos, os progestágenos neutralizam as ações dos estrogênios de estímulo à proliferação celular (Willians e Stancel, 1996). Em conseqüência à administração de progesterona exógena, pode ter havido uma diminuição na multiplicação de células da camada da granulosa e uma menor ação do LH sobre estas. A redução na produção de estrógeno que é incorporado ao fluido folicular diminui o acúmulo de fluidos no antro folicular e, portanto, determina menor crescimento e diminui o diâmetro dos folículos detectados à ultra-sonografia. Contudo, se a expressão de receptores para LH em bubalinos for semelhante àquela para bovinos, essa situação seria válida somente para folículos com diâmetros a partir de 8,0 mm (Bao et al., 1997).

Como os folículos pequenos e médios apresentam crescimento após episódios de liberação de FSH, se a causa principal do retardo do crescimento folicular no presente trabalho fosse apenas uma menor secreção hipofisária de LH e FSH nos animais tratados, os folículos de diâmetro menor que 5,0 mm também teriam sofrido considerável redução em seu crescimento, o que não ocorreu. De fato, a progesterona exógena impediu que o *pool* de folículos pequenos detectados no D0 crescesse a ponto de mudar de categoria, mas não impediu o recrutamento de folículos com 1 a 3 mm de diâmetro. Comparativamente, os animais não suplementados com progesterona apresentaram no D7 um perfil folicular condizente com os eventos normalmente esperados de seleção e dominância, com média de 4,57, 1,29 e 0,50 folículos pequenos, médios e grandes detectados, respectivamente. O número de folículos recrutados no D7 no grupo não suplementado foi menor do que no grupo que recebeu a progesterona, demonstrando que a progesterona exógena inibiu o crescimento dos folículos, mas não bloqueou os eventos envolvidos no recrutamento folicular. A progesterona tem como um de seus efeitos a elevação da temperatura corpórea, sendo que aplicações de progesterona exógena podem elevar em até $0,56^\circ\text{C}$ a temperatura interna

corporal (Willians e Stancel, 1996). Esse efeito poderia, em tese, elevar a taxa metabólica de um indivíduo sob tratamento contínuo, como o aplicado nos animais suplementados, que permaneceram sob efeito do hormônio exógeno durante sete dias ininterruptos. Um suposto aumento da taxa metabólica pode ser a via responsável pelo aumento no recrutamento de folículos pequenos.

Se a progesterona exógena determinasse maior secreção de inibina, a redução do crescimento folicular ocorreria somente nos folículos pequenos e médios, resguardando os folículos grandes desse efeito inibitório, pois estes são os próprios secretores da inibina. Porém, foi observado que durante os sete dias de permanência do implante, também o crescimento dos folículos dominantes foi prejudicado, o que afasta a hipótese de que a progesterona exógena estimule de forma direta a secreção da inibina. Assim, a progesterona parece ter causado uma redução seletiva no crescimento folicular, também com ação direta sobre os folículos cujo diâmetro era maior ou igual a 5,0 mm, além de estimular o recrutamento folicular nos animais suplementados.

No que diz respeito à taxa de ovulação até 20 horas após a segunda administração de GnRH, que é um efeito indesejável pois precede à inseminação, verificou-se maior ocorrência no G1 que no G2, porém sem diferença significativa (Tabela 4). A taxa de ovulação do grupo sem implante de medroxiprogesterona foi de 35,71% (n=5/14), inferior às taxas ovulatórias observadas por Baruselli et al (1999), os quais verificaram 82,3% (n=14/17), por Beber et al (2002), que encontraram taxa de 93,3% (n=14/15), e àquela obtida por Presicce et al. (2005), que foi de 85,7% (n=12/14). Contudo, os trabalhos citados avaliaram a resposta ovulatória até 72 horas após o final do protocolo Ovsynch, o que permitiu uma avaliação mais abrangente do que no presente estudo, em que se limitou à avaliação da ovulação até o momento da inseminação artificial. A taxa de ovulação dos animais com implante foi de 30,77% (n=4/13). Esse fato pode estar relacionado à capacidade da progesterona em sensibilizar o sistema hipotalâmico-hipofisário-gonadal dos búfalos, podendo suprimir a frequência e a amplitude dos pulsos de LH (Singh, 2003). A antecipação da ovulação em relação à execução da inseminação artificial pode ser um fator negativo nos protocolos de inseminação artificial em tempo fixo, pois a fase de transporte dos espermatozoides até o sítio de fertilização requer um mínimo de 4 a 8 horas após a deposição no útero (Hunter e Wilmut, 1984). Em caso de ovulação precoce, o espermatozoide pode deparar-se com um gameta feminino já envelhecido e de menor qualidade, o que poderia determinar o declínio da taxa de concepção e da eficiência reprodutiva de um programa de inseminação artificial em tempo fixo.

Tabela 4- Frequência de ovulações detectadas por ultra-sonografia até 20 horas após o final do tratamento e taxas de concepção observadas em búfalas tratadas com o protocolo Ovsynch (Grupo 1) ou Ovsynch associado à medroxiprogesterona (Grupo 2). Tracuateua-PA, 2006.

Grupo	Taxa de Ovulação entre o D9 e o D10 (em %)	Taxa de Concepção (em %)
G 1 (sem implante; n=14)	35,71 (5/14)	50,00 (7/14)
G 2 (com implante; n=13)	30,77 (4/13)	30,77 (4/13)
Probabilidade	1,00	0,4401

Letras maiúsculas distintas indicam diferença estatística significativa dentro das colunas.

As taxas de concepção observadas não diferiram estatisticamente (G1: 50% versus G2: 30,77%; $P>0,05$), porém houve maior frequência de fêmeas gestantes no grupo não suplementado com progesterona. A taxa de concepção obtida com o protocolo Ovsynch é equivalente àquelas apresentadas em trabalhos de Baruselli et al. (2001; 2003), Berber et al. (2002) (48,5%, 45,4% e 56,5%, respectivamente). Contudo, Ribeiro et al (2003) indicam incremento de 36,6% para 50,0% nas taxas de concepção quando búfalas inseminadas em tempo fixo na Amazônia recebem suplementação com progesterona. No presente trabalho, a adição de progesterona ao protocolo Ovsynch não determinou incremento nas taxas de concepção, diferentemente, também, dos resultados obtidos por De Rensis et al. (2005), quando detectou-se efeito favorável da progesterona principalmente em fêmeas acíclicas, cujo escore corporal médio era igual a 3,1. Como no presente estudo foram usadas apenas fêmeas cíclicas e com escore corporal médio de 3,5, a seleção prévia pode ter minimizado o impacto do uso da progesterona sobre as taxas de concepção.

CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, pôde-se verificar que a medroxiprogesterona aumentou o número de folículos pequenos nos ovários dos animais tratados e diminuiu o número de folículos grandes, por retardar o crescimento dos folículos com diâmetro maior que 5,0 mm entre os dias 0 e 7 do tratamento.

A retirada da progesterona acelera o crescimento folicular do D7 ao D9, fazendo com que o diâmetro dos folículos dominantes dos animais que recebem medroxiprogesterona suplante o dos animais não implantados.

A implementação nas taxas de crescimento folicular propiciada pela medroxiprogesterona pode ser um efeito positivo adicional ao protocolo Ovsynch, pois contribui para a ovulação de folículos maiores e, em tese, para a formação de

corpos lúteos com mais tecido luteínico e mais eficientes na manutenção da gestação.

A medroxiprogesterona não influencia na taxa de ovulação até 20 horas após a segunda administração de GnRH do protocolo Ovsynch, o que sugere a viabilidade de sua utilização sob a forma de dispositivos intravaginais associados a esse protocolo, a fim de aumentar o grau de sincronismo das ovulações.

A medroxiprogesterona associada ao protocolo Ovsynch (D0 ao D7) não contribuiu para aumento das taxas de concepção na inseminação em tempo fixo, quando fêmeas cíclicas e com escore corporal médio de 3,5 são sincronizadas.

Em função de suas características farmacológicas, a medroxiprogesterona pode ser aproveitada em estudos futuros como alternativa para sincronização do estro em fêmeas acíclicas, de escore corporal mais baixo, bem como em deceptoras ou doadoras de embriões.

AGRADECIMENTOS

À Embrapa Amazônia Oriental e ao Banco da Amazônia pelo suporte financeiro (Projeto Basa Pecuária – 02.05.0.019.00.04) para a execução do trabalho. Agradecimentos extensivos à Associação dos Criadores de Búfalos de Tracuateua-PA e à Universidade Federal do Pará/CEBRAN, em especial aos professores Aluizio Otávio Almeida da Silva e José Silva de Sousa, pelo apoio durante a realização do estudo.

BIBLIOGRAFIA CITADA

Ando, T.; Kamimura, S.; Hamana, K. 2004. Estrous synchronization using an intravaginal progesterone device in combination with GnRH or estradiol benzoate characterized by the initial ovarian conditions in Japanese black cows. *J. Vet. Med. Sci.*, 66(12): 1497-1502.

Awasthi, M.K.; Khare, A.; Kavani, F.S.; Siddiquee, G.M.; Panchal, M.T.; Shah, R.R. 2006. Is one-wave follicular growth during the estrous cycle a usual phenomenon in water buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Anim. Reprod. Sci.*, 92(3-4):241-53.

Bao, B.; Garverick, A.; Smith, G. W.; Smith, M. F.; Salfen, B. E.; Youngquist, R. S. 1997. Changes in messenger ribonucleic acid encoding luteinizing hormone receptor, cytochrome P450-side chain cleavage, and aromatase are associated with recruitment and selection of bovine ovarian follicles. *Biol. Reprod.*, 56(5): 1158-1168.

Barros, C.M.; Figueiredo, R.A.; Pinheiro, O.L. 1995. Estro, ovulação e dinâmica folicular em zebuínos. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 19(1-2): 9-22.

Baruselli, P.S.; Amaral, R.; Barufi, F.B.; Valentim, R.; Marques, M.O. 2001. Lecirelin and buserelin (gonadotrophin releasing hormone agonists) are equally effective for fixed time insemination in buffalo. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, 38(3): 142-145.

Baruselli, P.S.; Madureira, E.H.; Barnabe, V.H.; Barnabe, R.C.; Berber, R.C.A. 2003. Evaluation of synchronization of ovulation

for fixed timed insemination in buffalo (*Bubalus bubalis*). *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, 40(6): 431-442.

- Baruselli, P.S.; Madureira, E.H.; Barnabe, V.H.; Barnabe, R.C.; Visintin, J.A.; Oliveira, C.A.; Amaral, R. 1999. Estudo da dinâmica folicular em búfalas submetidas à sincronização da ovulação para inseminação da ovulação artificial em tempo fixo. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*, (27): 210.
- Baruselli, P.S.; Mucciolo, R.G.; Visitin, J.A.; Viana, W.G.; Arruda, R.P.; Madureira, E.H.; Oliveira, C.A.; Molero-Filho, J.R. 1997. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*, 47(8): 1531-1547.
- Berber, R.C.A.; Madureira, E.H.; Baruselli, P.S. 2002. Comparison of two Ovsynch protocols (GnRH versus LH) for fixed timed insemination in buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*, 57(5): 1421-1430.
- Danell, B. 1987. Oestrous behavior, ovarian morphology and cyclical variation in follicular system and endocrine pattern in water buffalo heifers. Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina Veterinária/Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala. 124pp.
- De Rensis, F.; Ronci, G.; Guarneri, P.; Nguyen, B. X.; Presicce, G. A.; Huszenicza, G.; Scaramuzzi, R.J. 2005. Conception rate after fixed time insemination following Ovsynch protocol with and without progesterone supplementation in cyclic and non-cyclic Mediterranean Italian buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*, 63(7): 1824-1831.
- Diaz, J.D.S.; Oliveira, A.T.D.; Aguiar, P.R.L.; Rodrigues, J.L. 2001. Diagnóstico ultra-sonográfico do momento ovulatório em búfalas (*Bubalus bubalis*) inseminadas no estro espontâneo e induzido. *Ciência Rural*, 31(4): 657-662.
- Evans, A.C.O. Characteristics of ovarian follicle development in domestic animals. 2003. *Reprod. Domest. Anim.*, 38(4): 240-246.
- Folman, Y.; Rosemberg, M.; Herz, Z.; Davidson, M. 1973. The relationship between plasma progesterone concentration and conception in post-partum dairy cows maintained on two levels of nutrition. *J. Reprod. Fert.*, 34(2): 267-278.
- Hunter, R.H.F., Wilmut, I. 1984. Sperm transport in the cow: periovulatory redistribution of viable cells within the oviduct. *Reprod. Nutr. Dev.*, 24(5A): 597-603.
- Kawate, N.; Sakase, M.; Seo Y.; Fukushima, M.; Noda, M.; Takeda, K.; Ueno, S.; Inaba, T.; Kida, K.; Tamada, H.; Sawada, T. 2006. Relations between plasma IGF-I concentrations during treatment with CIDR-based or Ovsynch protocol for timed AI and conception in early postpartum Japanese black beef cows. *J. Reprod. Fert.*, 52(1): 81-89.
- Knopf, K.; Kastelic, J.P.; Schallenberger, E.; Ginther, O.J. 1989. Ovarian follicular dynamics in heifers: test of two-wave hypothesis by ultrasonically monitoring individual follicles. *Domest. Anim. Endocr.*, 6(2): 111-119.
- Kuroiwa, T.; Ishibashi, A.; Fukuda, M.; Kim, S.; Tanaka, T.; Kamomae, H. 2005. Estrus synchronization and conception rate after a progesterone releasing intravaginal device (PRID) treatment from the early luteal phase in heifers. *J. Reprod. Dev.*, 51(5): 669-673.

- Lamb, G.C.; Stevenson, J.S.; Kesler, D.J.; Garverik, H.A.; Brown, D.R.; Salfen, B.E. 2001. Inclusion of intravaginal progesterone insert plus GnRH and prostaglandin F2 α for ovulation control in post-partum suckled beef cows. *J. Anim. Sci.*, 79(9): 2253-2259.
- Manik, R.S.; Palta, P., Singla, S.K.; Sharma, V. 2002. Folliculogenesis in buffalo (*Bubalus bubalis*): a review. *Reprod. Fertil. Dev.*, 14(5-6): 315-325.
- Manik, R.S.; Singla, S.K.; Palta, P.; Madan, M.L. 1998. Effect of presence of a dominant follicle on the superovulatory response in buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*, 50(6): 841-852.
- Melendez, P.; Gonzalez, G.; Aguilar, E.; Loera, O.; Risco, C.; Archbald, L.F. 2006. Comparison of two estrus-synchronization protocols and timed artificial insemination in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 89(12): 4567-4572.
- Presicce, G.A.; Bella, A.; Terzano, G.M.; De Santis, G.; Senatore, E.M. 2005b. Postpartum ovarian follicular dynamics in primiparous and pluriparous Mediterranean Italian buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*, 63(5): 1430-1439.
- Presicce, G.A.; Senatore, E.M.; Bella, A.; De Santis, G.; Barile, V.L.; De Mauro, G.J.; Terzano, G.M.; Stecco, R.; Parmeggiani, A. 2004. Ovarian follicular dynamics and hormonal profiles in heifer and mixed-parity Mediterranean Italian buffaloes (*Bubalus bubalis*) following an estrus synchronization protocol. *Theriogenology*, 61(7-8): 1343-1355.
- Presicce, G.A.; Senatore, E.M.; De Santis, G.; Bella, A. 2005. Follicle turnover and pregnancy rates following oestrus synchronization protocols in Mediterranean Italian buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Reprod. Domest. Anim.*, 40(5): 443-447.
- Ribeiro, H.F.L.; Sousa, J.B.S.; Marques, J.R.F.; Lourenço Junior, J.B.; Conceição, J.C.S. 2003. Inseminação artificial em tempo fixo de búfalas com sincronização da ovulação através de Ovsynch + progesterona. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 27(3): 469-471.
- Rhodes, F.M.; De'Arth, G.; Entwistle, K.W. 1995. Animal and temporal effects on ovarian follicular dynamics in Brahman heifers. *Anim. Reprod. Sci.*, 38(4): 265-277.
- Rosenberg, M.; Kaim, M.; Herz, Z.; Folman, Y. 1990. Comparison of methods for synchronization of estrous cycles in dairy cows: Effects on plasma progesterone and manifestation of oestrus. *J. Dairy Sci.*, 73(10): 2807-2816.
- Saldarriaga, J.P.; Cooper, D.A.; Cartmill, J.A.; Zuluaga, J.F.; Stanko, R.L.; Williams, G.L. 2007. Ovarian, hormonal, and reproductive events associated with synchronization of ovulation and timed appointment breeding of Bos indicus-influenced cattle using intravaginal progesterone, gonadotropin-releasing hormone, and prostaglandin F2 α . *J. Anim. Sci.*, 85(1): 151-162.
- SAS. Statistical Analysis System. 1996. User's guide: Stat, Version 6.11. SAS Institute, Cary.
- Savio, J.D.; Keenan, L.; Boland, M.P.; Roche, J.F. 1988. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. *J. Reprod. Fertil.*, 83(2): 663-671.
- Singh, C. 2003. Response of anestrous rural buffaloes (*Bubalus bubalis*) to intravaginal progesterone implant and PGF2 injection in summer. *J. Vet. Sci.*, 4(2): 137-141.
- Singh, J.; Nanda, A.S.; Adams, G.P. 2000. The reproductive pattern and efficiency of female buffaloes. *Anim. Reprod. Sci.*, 60-61(1-3): 593-604.
- Stevenson, J.S.; Pursley, J.R.; Garverick, H.A.; Fricke, P.M.; Kesler, D.J.; Ottobre, J.S.; Wiltbank, M.C. 2006. Treatment of cycling and noncycling lactating dairy cows with progesterone during Ovsynch. *J. Dairy Sci.*, 89(7): 2567-2578.
- Taneja, M.; Ali, A.; Singh, G. 1996. Ovarian follicular dynamics in water buffalo. *Theriogenology*, 46(1): 121-130.
- Willians, C.L.; Stancel, G.M. 1996. Estrogênios e progestogênios. In: Goodman e Gilman. As Bases Farmacológicas da Terapêutica. Mc Graw Hill, Rio de Janeiro, p 1045-1067.

Recebido em 14/01/2008
Aceito em 08/04/2008

