



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL E RECURSOS
PESQUEIROS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO DA REUTILIZAÇÃO DO IMPLANTE DE PROGESTERONA EM
BÚFALAS SUBMETIDAS A PROTOCOLO CURTO DE IATF NA AMAZÔNIA**

HUGO HAICK PERDIGÃO

Manaus, AM
Fevereiro/2023

HUGO HAICK PERDIGÃO

**AVALIAÇÃO DA REUTILIZAÇÃO DO IMPLANTE DE PROGESTERONA EM
BÚFALAS SUBMETIDAS A PROTOCOLO CURTO DE IATF NA AMAZÔNIA.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Amazonas, área de concentração: Produção Animal, linha de pesquisa Nutrição e Produção de Monogástricos e Ruminantes, para obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros.

Orientador: Marcos Vinicius Castro Ferraz Junior

Coorientador: Fábio Jacobs Dias

Manaus, AM
Fevereiro/2023

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

P433a Perdigão, Hugo Haick
Avaliação da reutilização do implante de progesterona em búfalas submetidas a protocolo curto de IATF na Amazônia. / Hugo Haick Perdigão . 2023
35 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Marcos Vinicius Castro Ferraz Junior
Coorientador: Fábio Jacobs Dias
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Amazônia. 2. Bubalus bubalis. 3. Eficiência Reprodutiva. 4. Inseminação. I. Ferraz Junior, Marcos Vinicius Castro. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

FOLHA DE APROVAÇÃO

HUGO HAICK PERDIGÃO

AVALIAÇÃO DA REUTILIZAÇÃO DO IMPLANTE DE PROGES TERONA EM BÚFALAS SUBMETIDAS A PROTOCOLO CURTO DE IATF NA AMAZÔNIA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros, área de concentração em Produção Animal.

Aprovado em 21 de março de 2023.

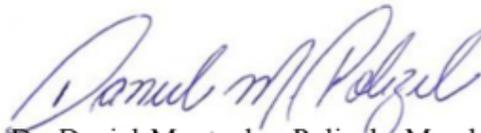
BANCA EXAMINADORA



Dr. Marcos Vinicius de Castro Ferraz Junior - Presidente
Universidade Federal do Amazonas



Dra. Laura Priscila Araujo Amaro Maciel - Membro
ICSEZ / Universidade Federal do Amazonas



Dr. Daniel Montanher Polizel - Membro
FMVZ / Universidade de São Paulo

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família e ao meu amor maior, Ana Vitória.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pelo dom da vida e por todas as graças alcançadas em minha vida. Esse mestrado é mais uma das realizações profissionais em que ele e Nossa Senhora estiveram sempre guiando meus passos.

Em segundo lugar agradeço à toda minha família, em especial ao meu pai, João Carlos da Silva Perdigão e à minha mãe, Ione Haick Perdigão. Ambos sempre estiveram ao meu lado e forneceram todo o suporte necessário para que eu alcançasse meus objetivos acadêmicos e profissionais. A vocês, toda a minha gratidão.

Agradeço também a minha esposa, Paula Caroline, pelo companheirismo em mais essa etapa de nossas vidas. Só nós sabemos as dificuldades enfrentadas, mas todas superadas com êxito. Obrigado por compreender minhas ausências, estresses e não menos importante, por todo o apoio durante a execução deste trabalho.

À minha filha, Ana Vitória Mesquita Perdigão. Você é o bem mais precioso que possuo, toda e qualquer conquista será sempre pensando em você e no seu futuro. Obrigado por ser o combustível diário da minha vida.

Agradeço expressivamente ao meu orientador, Marcos Vinicius de Castro Ferraz Junior. Professor, você é referência no que faz. Obrigado pela paciência, compreensão, ensinamentos, empatia e todo o suporte durante esses dois anos de mestrado. A sua maneira de abordar a ciência me ensinou muita coisa. Reforço a minha gratidão ao senhor!

Ao meu coorientador, Fábio Jacobs Dias. Agradeço por todo o apoio dado durante a execução do experimento e sugestões no trabalho. Muito obrigado!

Não poderia deixar de agradecer ao professor Pedro Paulo Maia Teixeira. Pelos seus ensinamentos, suporte, pela experiência no VOR/UFPA e também no apoio da construção do Pré Projeto de seleção do mestrado. À você, meu muito obrigado.

Aos Coordenadores do Laboratório de Microbiologia e Parasitologia Animal da Faculdade de Ciências Agrárias, Janaína Paolucci e Joel Lima, pela parceria e disponibilidade de ceder a estrutura do laboratório para o processamento das amostras.

Ao Laboratório de Nutrição e Reprodução Animal da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), na pessoa do professor Alexandre Vaz Pires pela disponibilidade de ceder a estrutura e fornecimento dos kits para análise das amostras.

Agradeço também aos alunos de iniciação científica e mestrandos que participaram do experimento e auxiliaram nas etapas desse trabalho: Paloma, Marieta, Maria Gabriela, Bárbara, Matheus, Kamila e Ana Rebeca.

Muito obrigado a toda equipe da Fazenda Experimental da Universidade Federal do Amazonas, pelo fornecimento da estrutura, dos animais e apoio dos funcionários. Vocês foram peças fundamentais para a execução desse projeto.

Por fim, agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a execução e conclusão deste trabalho.

RESUMO

Esse estudo objetivou avaliar se a reutilização de implantes de progesterona (P4) foi capaz de sincronizar a onda de desenvolvimento folicular em búfalas em um protocolo curto de IATF. Foram utilizados implantes de progesterona (P4) de 2,0 g novo (G1) e previamente utilizados por 7 (G2), 14 (G3), 21 (G4) e 28 (G5) dias. O tempo de uso dos implantes de P4 foi considerado como tratamentos experimentais. A reutilização de implantes de P4 não afetou ($P > 0,05$) o diâmetro e área do folículo pré ovulatório, diâmetro e área do CL, taxas de ovulação, taxa de sincronização, e taxa de crescimento folicular. Os tratamentos G1, G2 e G4 apresentaram indícios de serem prejudiciais ao induzirem maiores taxas de formação de cistos foliculares nas búfalas ao compará-las às dos grupos G3 e G5. O uso de dispositivos de P4 previamente utilizados por até 28 dias em protocolo curto de IATF foi capaz de induzir concentrações >1 ng/mL durante a exposição à P4, impedindo ovulações neste período de búfalas criadas na região equatorial brasileira. Todavia, há indícios de que as concentrações acima de 1,5 ng/mL podem ser a causa da alta incidência de cistos foliculares identificados nos grupos experimentais. Assim, conclui-se que o uso do protocolo 7d com implantes de P4 com baixa concentração de P4 em búfalas sincronizou a onda folicular de forma mais eficiente.

Palavras chave: Amazônia, *Bubalus bubalis*, eficiência reprodutiva, inseminação.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate whether the reuse of progesterone (P4) implants was able to synchronize the follicular development wave in buffalos in a short IATF protocol. New progesterone (P4) implants of 2,0g (G1) and previously used for 7 (G2), 14 (G3), 21 (G4) and 28 (G5) days were used. The time of use of P4 implants was considered as experimental treatments. The reuse of P4 implants did not affect ($P > 0.05$) the diameter and area of the preovulatory follicle, diameter and area of CL, ovulation rates, synchronization rate, and follicular growth rate. Treatments G1, G2 and G4 showed signs of being harmful by inducing higher rates of follicular cyst formation in buffaloes when compared to groups G3 and G5. The use of P4 devices previously used for up to 28 days in a short IATF protocol was able to induce concentrations >1 ng/mL during exposure to P4, preventing ovulations in this period of buffalos created under the Brazilian equatorial region. However, there are indications that concentrations above 1.5 ng/mL may be the cause of the high incidence of follicular cysts identified in the experimental groups. Thus, it is concluded that the use of the 7d protocol with P4 implants with low P4 concentration in buffaloes synchronized the follicular wave more efficiently.

Key-words: Amazon, *Bubalus bubalis*, insemination, reproductive efficiency

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Esquema do protocolo curto 7d utilizado com diferentes concentrações de P4 dos implantes novos (2 g) ou previamente reutilizados por 7, 14, 21 ou 28 dias. 21
- Figura 2. Mensuração do folículo pré ovulatório e do corpo lúteo. 22
- Figura 3. Área dos folículos de búfalas submetidas a protocolo de IATF utilizando implantes de progesterona (P4) novo (G1) ou previamente reutilizados por 7 (G2), 14 (G3), 21 (G4) ou 28 (G5) dias. 32
- Figura 4. Concentração de progesterona sérica durante o período de permanência do dispositivo intravaginal de P4. 32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resposta reprodutiva de búfalas submetidas a protocolo de IATF utilizando implantes de progesterona (P4) novo (G1) ou previamente reutilizados por 7 (G2), 14 (G3), 21 (G4) ou 28 (G5) dias. 30

Tabela 2. Taxa de ovulação de búfalas submetidas a protocolo de IATF utilizando implantes de progesterona (P4) novo (G1) ou previamente reutilizados por 7 (G2), 14 (G3), 21 (G4) ou 28 (G5) de acordo com o dia da ocorrência. 31

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	15
2.1. Objetivo Geral	15
2.2. Objetivos específicos	15
3. HIPÓTESE	15
CAPÍTULO I: Reutilização do implante de progesterona em búfalas submetidas a protocolo curto de IATF na região equatorial brasileira.	16
Resumo	18
Introdução	18
Material e métodos	20
<i>Local do experimento</i>	20
<i>Animais e manejo</i>	20
<i>Tratamentos</i>	20
<i>Exame ultrassonográfico</i>	21
<i>Coleta de sangue e dosagem hormonal</i>	22
<i>Análise estatística</i>	22
Resultados	23
Discussão	23
Conclusão	25
Referências	25
Declarações	28
<i>Financiamento</i>	28
<i>Conflito de interesse</i>	28
<i>Contribuições dos autores</i>	28
<i>Disponibilidade dos dados</i>	29
<i>Aprovação ética</i>	29
Tabelas	30
Figuras	32
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
5. APÊNDICE	35

1. INTRODUÇÃO

A bubalinocultura brasileira tem um grande potencial devido às condições ambientais favoráveis em algumas regiões do país, especialmente na região Norte, onde a maior parte do efetivo nacional de bubalinos está concentrado. No entanto, a bubalinocultura ainda é considerada uma atividade recente no país, cuja atividade iniciou com a introdução de búfalos (*Bubalus bubalis*) da raça Mediterrânea na Ilha de Marajó, Estado do Pará, em meados de 1885 com animais provenientes da Itália (ROCHA, 2007). O efetivo nacional de bubalinos foi de 1.551.618 cabeças no ano de 2021 e desse total, 68,2% (1.058.291/1.551.618) estão sendo criados na região Norte do país (IBGE, 2021). A tendência é que o Brasil seja o maior produtor de carne bubalina da região ocidental, considerando sua extensão territorial e as condições ambientais (clima e solo) favoráveis, podendo essa produção ser mais expressiva com o aumento da quantidade e qualidade do produto a médio e longo prazo (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

A produtividade ainda é um desafio para a bubalinocultura no Brasil, especialmente nos sistemas tradicionais de criação. Isso ocorre devido a diversos fatores, como a falta de manejo adequado, o baixo investimento em tecnologia, a baixa qualidade genética dos animais, a falta de assistência técnica e de acesso a informações, entre outros (LOURENÇO JÚNIOR, 2008). A baixa eficiência reprodutiva é considerada um dos principais entraves na produção de bubalinos comprometendo a produtividade e prolificidade dessa cadeia produtiva, contudo diversas medidas podem ser adotadas para a melhoria significativa deste fator, dentre elas a adoção de programas de Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF) e, conseqüentemente, a redução do intervalo entre partos (IEP), diagnóstico precoce de gestação e ressincronização imediata (PUGLIESI *et al.*, 2017).

As búfalas expressam sinais de estro pouco evidentes e apresentam retardo na ovulação quando comparada a vaca bovina. (HAIDER *et al.*, 2015). Para contornar esta problemática, há a possibilidade do uso da IATF à base de progesterona, o que eleva o pronunciamento do estro em novilhas búfalas, implicando na melhoria da eficiência reprodutiva (HAIDER *et al.*, 2021). Entretanto, os hormônios utilizados nos protocolos para a sincronização do cio, principalmente

os dispositivos de progesterona (P4), correspondem a um elevado custo, inviabilizando muitas vezes a utilização do protocolo (ALMEIDA et al., 2006).

Em bubalinos, desde o final da década de noventa, foram realizadas pesquisas com o objetivo de avaliar a eficácia de diferentes protocolos de sincronização da ovulação para IATF. Os trabalhos têm mostrado que é possível obter resultados satisfatórios com o emprego dessa tecnologia em búfalas. No entanto, verificou-se que a estacionalidade reprodutiva interfere na eficiência dos protocolos de IATF. Atualmente é possível sincronizar a ovulação para IATF de búfalas durante todo o ano com eficiência, mesmo em localidades onde os búfalos apresentam evidente estacionalidade reprodutiva, garantindo satisfatórias taxas de concepção e distribuição dos partos conforme a demanda do mercado (BARUSELLI et al., 2009). Apesar da importância que o tratamento hormonal representa para um programa de IATF, ou mesmo de transferência de embriões, ainda persistem dúvidas sobre a vantagem e a viabilidade sobre a reutilização de implantes intravaginais de progesterona (PINTO-NETO et al., 2009).

O uso de protocolo de sincronização de ovulação baseado em cinco dias de exposição à progesterona já está sendo utilizado em bubalinos leiteiros. Esse protocolo curto não afetou negativamente as respostas ovarianas e a taxa de prenhez em búfalas leiteiras, ao compará-lo ao protocolo convencional de nove dias, podendo ser considerado como alternativa viável para reduzir custos da IATF e expandir seu uso em bubalinos (PFEIFER & CASTRO, 2017). A implantação de um programa de IATF, na região amazônica do Brasil, utilizando cipionato de estradiol (CE) para indução da ovulação garante índices reprodutivos similares ao benzoato de estradiol (BE), permitindo uma redução do número de manejos durante o programa de IATF para três vezes (D0, D9 e D11) e proporcionando menor custo de implantação (WEILLER et al., 2021). Entretanto, não foram encontrados trabalhos na literatura que abordem utilização de protocolos curtos de 7 dias de exposição à progesterona e que avaliem a viabilidade da reutilização de implantes de P4 em búfalas na Amazônia.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a reutilização de implantes de progesterona (P4) por 7 dias (protocolo 7d), bem como testar a sua reutilização em até 5 usos em fêmeas bubalinas submetidas a protocolos de IATF em condições amazônicas.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a concentração sanguínea de progesterona e os seus efeitos sobre os parâmetros reprodutivos de búfalas submetidas ao protocolo curto (7d).
- Comparar a concentração sanguínea nos diferentes tratamentos de reutilização do implante de P4.
- Avaliar o crescimento e a ovulação do folículo ovulatório em búfalas submetidas ao protocolo de 7 dias de implante de P4.

3. HIPÓTESE

A utilização de protocolos curtos de progesterona e a reutilização dos implantes não afeta o desempenho reprodutivo de búfalas submetidas à IATF. É possível obter níveis séricos de progesterona > 1 ng/mL ao utilizar este tipo de protocolo e com as reutilizações dos implantes.

CAPÍTULO I

Reutilização do implante de progesterona em búfalas submetidas a protocolo curto 7d de IATF na região equatorial brasileira.

Artigo escrito nas regras da revista: Tropical Animal Health and Production
ISSN versão online: 1573-7438
Frequência: bimestral
Fator de Impacto: 1.930

Reutilização do implante de progesterona em búfalas submetidas a protocolo curto 7d de IATF na região equatorial brasileira

Hugo Haick Perdigão^{1*}; Kamila Nascimento de Sá¹; Paloma Leandra Garcia Melo²; Paula Caroline Reis Mesquita³; Taynara Jaqueline Barreiro da Silva⁴; Fábio Jacobs Dias²; Alexandre Vaz Pires⁴; Marcos Vinicius de Castro Ferraz Junior⁵

¹Programa de Pós Graduação em Ciência Animal e Recursos Pesqueiros, Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, 69067-005, Brasil.

²Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, 69067-005, Brasil.

³Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, Universidade Federal do Amazonas, Instituto de Educação, Agricultura e Ambiente, Campus Vale do Rio Madeira, 69.800-000, Humaitá, Amazonas, Brasil.

⁴Departamento de Zootecnia, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 13418-900.

⁵Departamento de Zootecnia, Instituto de Ciências Sociais, Educação e Zootecnia, Universidade Federal do Amazonas, Parintins, AM, 69152-240, Brasil.

*Corresponding author. Current address: Universidade Federal do Amazonas, AM, Brazil.

Email address: hugohaick@ufam.edu.br

Resumo

Este estudo teve como objetivo avaliar se a reutilização de implantes de progesterona (P4) foi capaz de sincronizar a onda de desenvolvimento folicular em búfalas em um protocolo curto de IATF. Foram utilizados implantes novos de progesterona (P4) (G1) e previamente utilizados por 7 (G2), 14 (G3), 21 (G4) e 28 (G5) dias. O tempo de uso dos implantes P4 foram considerados como tratamentos experimentais. A reutilização dos implantes P4 não afetou ($P > 0,05$) o diâmetro e área do folículo pré-ovulatório, diâmetro e área do CL, taxas de ovulação, taxa de sincronização e taxa de crescimento folicular. Os tratamentos G1, G2 e G4 induziram a formação de grandes folículos persistentes, considerados cistos foliculares, em comparação aos tratamentos G3 e G5. O uso de dispositivos de P4 previamente utilizados por até 28 dias em um curto protocolo de IATF foi capaz de induzir concentrações >1 ng/mL durante a exposição ao P4, impedindo a ovulação neste período de búfalas criadas na região equatorial brasileira. Entretanto, há indícios de que concentrações acima de 1,5 ng/mL podem ser a causa da alta incidência de cistos foliculares identificados nos grupos experimentais. Assim, concluiu-se que o uso de implantes de P4 com baixa concentração de P4 em búfalas sincronizou a onda folicular de forma mais eficiente.

Palavras-chave: Amazônia. *Bubalus bubalis*. Progesterona. Eficiência reprodutiva.

Introdução

A bubalinocultura brasileira é considerada recente e iniciou com a introdução de búfalos (*Bubalus bubalis*) da raça Mediterrânea na Ilha de Marajó, Estado do Pará, em meados de 1885 com a introdução de animais provenientes da Itália (Rocha, 2007). O efetivo nacional de bubalinos foi de 1.551.618 cabeças no ano de 2021 e desse total, 68,2% (1.058.291/1.551.618) estão sendo criados na região Norte do país (IBGE, 2021).

Apesar do expressivo rebanho nacional, a produtividade da bubalinocultura ainda é baixa, por ser composta prioritariamente por sistemas tradicionais de criação de bubalinos, tornando-se pouco atrativa economicamente (Lourenço Júnior, 2008). A baixa eficiência reprodutiva é considerada um dos principais entraves na produção de bubalinos, comprometendo a produtividade e prolificidade dessa cadeia produtiva. Contudo, diversas medidas podem ser adotadas para a melhoria dos índices zootécnicos, dentre elas a adoção de programas de Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF) e, conseqüentemente, a redução do intervalo entre partos (IEP), diagnóstico precoce de gestação e ressincronização imediata (Pugliesi et al., 2017).

As fêmeas bubalinas na zona equatorial são consideradas animais poliestrais contínuos, onde não existe variação anual na duração de horas de luz conforme a estação do ano. Entretanto na região centro-sul do País são classificadas como animais poliéstricos estacionais de dias curtos, semelhante aos ovinos e caprinos, onde é observada uma concentração maior das manifestações de cio no período do outono (Saraiva et al., 2019).

As búfalas expressam sinais de estro pouco evidentes e apresentam retardo na ovulação quando comparadas às vacas bovinas. (Haider et al., 2015). Para contornar esta problemática, foram desenvolvidos protocolos de IATF à base de progesterona, o que eleva a taxa de prenhez, implicando na melhoria da eficiência reprodutiva (Haider et al., 2021). Entretanto, os hormônios utilizados nos protocolos para a sincronização do cio na IATF, principalmente os dispositivos de progesterona (P4), correspondem a um elevado custo, inviabilizando muitas vezes a utilização da IATF pelo protocolo (Almeida et al., 2006). Sendo assim, são necessárias alternativas que diminuam os custos de implantação de um programa de IATF e que possibilitem o melhoramento genético de rebanhos bubalinos submetidos a protocolos de IATF com menor período de serviço/IATF e melhor custo/benefício. Esse estudo objetivou avaliar se a reutilização de implantes de progesterona (P4) foi capaz de sincronizar a onda de

desenvolvimento folicular em búfalas em um protocolo curto de IATF na região equatorial brasileira.

Material e métodos

Local do experimento

O experimento foi realizado no Setor de Produção de Ruminantes da Fazenda Experimental da Universidade Federal do Amazonas (FAEXP), localizada no km 922, BR 174 que interliga o município de Manaus (AM) a Boa Vista (RR). O clima é caracterizado como equatorial, quente e úmido, limitado a duas estações: período chuvoso, entre o período de dezembro a junho, e estiagem no restante do período.

Animais e manejo

Foram utilizadas 15 fêmeas bubalinas (*Bubalus bubalis*), das raças Murrah e Mediterrânea, com idade entre 4 a 7 anos, apresentando escore de condição corporal (ECC) variando entre 3 a 4, utilizando-se escala de 1 a 5 (Jorge, 2008). Foi adotado o delineamento experimental Cross Over, com 45 unidades experimentais, sendo as 15 búfalas submetidas a 3 protocolos, com intervalo de 10 dias entre eles. O manejo alimentar dos animais consistiu no pastejo de capim *Pennisetum purpureum*, *Urochloa humidicola* e *Megathyrsus maximus* cv. Mombaça, com ingestão de sal mineral e água *ad libitum*.

Os animais foram submetidos ao exame clínico e ginecológico, com uso da ultrassonografia transretal utilizando-se um transdutor linear com frequência de 7,5 MHz, sendo consideradas aptas à participarem do experimento as fêmeas que apresentaram, no momento da avaliação, ausência de anormalidades no trato reprodutivo.

Tratamentos

As búfalas foram submetidas a um protocolo de sincronização de onda folicular e de ovulação. Este consistiu na aplicação de 150 µg Cloprostenol sódico um dia antes do início do

protocolo, para dirimir a concentração sérica de progesterona endógena, além da utilização de um dispositivo intravaginal de progesterona de 2,0 g de P4 novo ou previamente utilizados por 7, 14, 21 e 28 dias e a aplicação intramuscular (im) de 2 mg de benzoato de estradiol (BE) e 150 µg Cloprostenol sódico no D0. No D7 pela manhã, foi realizada a remoção do implante de P4 e a aplicação de 150 µg Cloprostenol sódico e 1,0 mg, por via IM, de cipionato de estradiol (CE) (Fig 01). Após a remoção dos dispositivos intravaginais, estes foram lavados com água corrente, desinfetados com hipoclorito de sódio a 2,5%, identificados e separados de acordo com os dias de uso e armazenados em sacos plásticos em ambiente limpo e arejado.

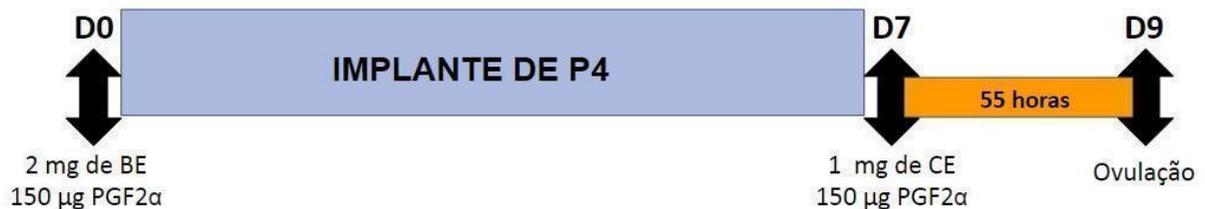


Fig 1. Esquema do protocolo curto 7d utilizado com diferentes concentrações de P4 dos implantes novos (2 g) ou previamente reutilizados por 7, 14, 21 ou 28 dias.

Exame ultrassonográfico

As búfalas passaram por ultrassonografia dos ovários em dias alternados até a determinação da ovulação, bem como 7 dias após a ovulação para detecção do CL. Os folículos foram classificados como pequenos (≤ 3 mm), médios (3,1– 6 mm) e grandes ($\geq 6,1$ mm) conforme sugerido por Vishnu et al. (2017).

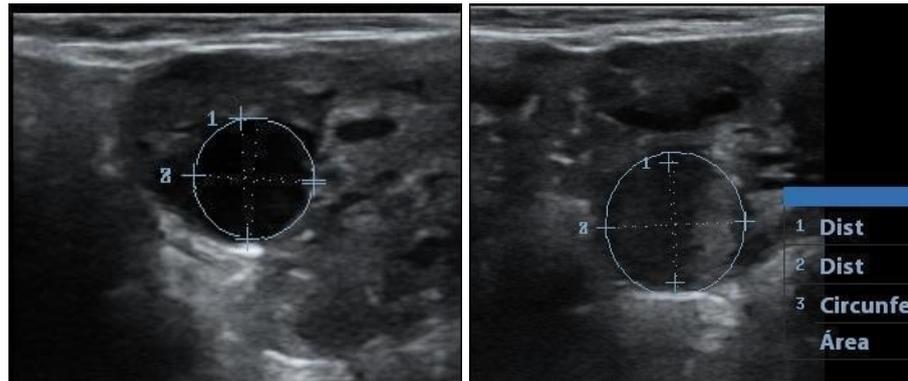


Fig 2. Mensuração do folículo pré ovulatório e do corpo lúteo.

Coleta de sangue e dosagem hormonal

Para a determinação dos níveis de P4 sérica foram realizadas coletas de sangue de todas as fêmeas dos grupos experimentais nos dias D0, D2, D4 e D7. As amostras foram obtidas por venopunção da jugular para coleta do sangue com tubos a vácuo sem anticoagulante. Imediatamente após a coleta, as amostras foram acondicionadas em caixas térmicas refrigeradas para posterior centrifugação a 3000 rpm por 5 minutos no Laboratório de Microbiologia e Parasitologia Animal da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Amazonas (FCA/UFAM), para obtenção do soro sanguíneo. Em seguida, foram pipetadas e armazenadas em microtubos do tipo Eppendorf de 2 mL e congeladas a -20 °C em alíquotas de 1,0 mL, até o momento das análises laboratoriais para dosagem das concentrações séricas de P4. A dosagem de P4 foi realizada no Laboratório de Reprodução Animal da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo (LRA/Esalq/USP) utilizando o método de quimioluminescência automatizada usando um Kits comercial Immulite® 1000 (Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, IL, USA).

Análise estatística

Os dados foram verificados pelos testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variância (Bartlett) antes da ANOVA. Optou-se pelo procedimento

MIXED e GLIMMIX do programa estatístico SAS (SAS Inst., Inc., Cary, NC), onde aplicou-se o MIXED para as variáveis contínuas: diâmetro do folículo, área do folículo, diâmetro do CL, área do CL. A concentração de P4 foi avaliada por medidas repetidas no tempo. O GLIMMIX foi aplicado nas demais variáveis pela opção binomial.

Resultados

Os parâmetros reprodutivos dos grupos experimentais estão descritos nas Tabelas 1 e 2. A reutilização de implantes de P4 não afetou o diâmetro e área do folículo pré ovulatório, diâmetro e área do CL, taxas de ovulação, taxa de sincronização e taxa de crescimento folicular. No entanto, que G1, G2 e G4 apresentaram indícios de serem prejudiciais ao induzirem maiores taxas de formação de cistos foliculares nas búfalas ao compará-las às dos grupos G3 e G5. Houve uma dispersão do número de animais em relação ao momento da ovulação, que ocorreram a partir de 48 horas após a retirada dos dispositivos intravaginais (Tab 1; Tab 2; Fig 3).

O efeito dos tratamentos no nível de P4 durante o protocolo de sincronização para o desempenho reprodutivo de búfalas foi apresentado na Figura 4. Embora todas as búfalas apresentassem concentração sérica de P4 semelhante no D0, as fêmeas dos tratamentos G1 e G2 apresentaram as maiores concentrações de P4 exógena no D7, o que variou entre 2,5 e 1,5 ng/mL, respectivamente. No entanto, os tratamentos G3, G4 e G5, evidenciaram concentração sérica entre 1,5 e 1,0 ng/mL. A concentração de progesterona sérica no D7 foi maior que 1 ng/mL em todos os tratamentos.

Discussão

Neste estudo objetivou-se avaliar a reutilização de implantes de progesterona por 7 dias por até 5 usos em protocolos de IATF de búfalas em condições equatoriais. Os parâmetros

reprodutivos como taxa de ovulação, taxa de sincronização e taxa de crescimento folicular foram semelhantes em todos os tratamentos, demonstrando que a reutilização do implante de P4 de 2,0 g em búfalas por até 5 vezes foi possível no protocolo de IATF que utilizou a P4 de 7 dias. Esse resultado também foi descrito por Gutiérrez-Añez et al. (2018), ao avaliarem búfalas submetidas a dispositivos intravaginais de P4, novos ou reutilizados, com 1,0 g/P4 (DIB®) e 1,38 g/P4 (CIDR®), e sugeriram que as concentrações de P4 dentro dos protocolos de IATF em búfalos podem ser reduzidas, sem prejudicar sua fertilidade.

O uso de protocolos curtos para a sincronização da ovulação tem sido uma opção viável para reduzir custos na inseminação artificial em bubalinos leiteiros. O estudo de Pfeifer and Castro (2017) comparou um protocolo curto de 5 dias com o protocolo convencional de 9 dias e concluiu que não houve impacto negativo nas respostas ovarianas dos animais. Essa descoberta é consistente com outros resultados favoráveis que têm sido obtidos com o uso de protocolos curtos de sincronização da ovulação em outras espécies animais. Todos os tratamentos experimentais induziram concentração sérica de P4 maior que 1 ng/mL em 7 dias após a inserção do implante de P4, impedindo que as ovulações ocorressem durante o uso dos implantes intravaginais. Entretanto, houve indícios de que as concentrações acima de 1,5 ng/mL podem ser a causa da alta incidência de cistos foliculares identificados nos grupos experimentais. A concentração de progesterona diminui a frequência dos pulsos de LH (Adams et al., 1992) e associada ao estabelecimento de folículos persistentes, sendo estes fatores relacionados à redução da fertilidade (Kojima et al., 2003).

A concentração de estradiol é importante para que ocorra a ovulação. O folículo pré-ovulatório precisa produzir níveis suficientes de estradiol para que ocorra o feedback positivo no hipotálamo e desencadeie o pico pré-ovulatório de LH, que é essencial para a ovulação (Hafez et al., 2000; Campanile et al., 2010). Quando o nível de estradiol é baixo, esse feedback positivo não ocorre e a ovulação pode ser comprometida, levando à formação

de cistos ovarianos. Nós especulamos que o uso de implantes com alta concentração de P4 em búfalas pode induzir menor concentração de estradiol nos animais durante o processo de ovulação para garantir que ocorra o feedback positivo adequado para induzir a ovulação (Gimenes et al., 2011; Perera, 2011).

Conclusão

O uso de dispositivos de P4 previamente utilizados até 28 dias em um protocolo curto de IATF não interfere nos parâmetros reprodutivos analisados e é capaz de induzir concentrações >1 ng/mL durante a exposição à P4, impedindo ovulações neste período de búfalas criadas em condições equatoriais, indicando a possibilidade de redução dos custos de implantação da IATF em búfalas nesta região.

Referências

- Adams, G., Matteri, R., & Ginther, O., 1992. Efeito da progesterona nos folículos ovarianos, surgimento de ondas foliculares e hormônio folículo-estimulante circulante em novilhas, *Reproduction*, 96, 627-640
- Almeida, A. B., Bertan, C. M., Rossa, L. A. F., dos Santos Gaspar, P., Binelli, M., & Madureira, E. H. (2006). Avaliação da reutilização de implantes auriculares contendo norgestomet associados ao valerato ou ao benzoato de estradiol em vacas Nelore inseminadas em tempo fixo. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 43(4), 456-465.
- Campanile, G., Baruselli, P. S., Vecchio, D., Prandic, A., Neglia, G.; Carvalho, N. A. T., Sales, J. N. S., Gasparrini, B., D'occhio, M. J. Growth, metabolic status and ovarian

function in buffalo (*Bubalus bubalis*) heifers fed a low energy or high energy diet. *Animal Reproduction Science*, v.122, p.74–81, 2010.

Gimenes, L. U., Carvalho, N. A. T., Sá Filho, M. F. D., Vannucci, F. S., Torres-Júnior, J. R. S., Ayres, H., & Baruselli, P. S. (2011). Ultrasonographic and endocrine aspects of follicle deviation, and acquisition of ovulatory capacity in buffalo (*Bubalus bubalis*) heifers. *Animal reproduction science*, 123(3-4), 175-179.

Gutiérrez-Añez, J. C., Palomares, R. A., Jiménez-Pineda, J. R., Camacho, A. R., & Portillo-Martínez, G. E. (2018). Pregnancy rate in water buffalo following fixed-time artificial insemination using new or used intravaginal devices with two progesterone concentrations. *Tropical animal health and production*, 50, 629-634.

Haider, M. S., Hassan, M., Khan, A. S., Husnain, A., Bilal, M., Pursley, J. R., & Ahmad, N. (2015). Effect of timing of insemination after CIDR removal with or without GnRH on pregnancy rates in Nili-Ravi buffalo. *Animal reproduction science*, 163, 24-29.

Haider, S., Chishti, G.A., Mehmood, M.U. et al. The effect of GnRH administration/insemination time on follicular growth rate, ovulation intervals, and conception rate of Nili Ravi buffalo heifers in 7 –day-CIDR Co-synch. *Trop Anim Health Prod* 53, 558 (2021).

Hafez, E. S. E.; Jainudeen, M. R.; Rosnina, Y. Hormones, growth factors and reproduction. In: HAFEZ, E. S. E., HAFEZ, B. *Reproduction in Farm Animals*. 7th Ed. 527 Philadelphia: Lippincott, p. 33-54, 2000.

IBGE, 2021 – Produção da Pecuária Municipal (PPM). Brasil. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html?=&t=resultados>. Acessado em 22 de março de 2023.

Kojima, F. N., Bergfeld, E. G. M., Wehrman, M. E., Cupp, A. S., Fike, K. E., Mariscal-Aguayo, D. V. & Kinder, J. E. (2003). Frequency of luteinizing hormone

pulses in cattle influences duration of persistence of dominant ovarian follicles, follicular fluid concentrations of steroids, and activity of insulin-like growth factor binding proteins. *Animal Reproduction Science*, 77(3-4), 187-211.

Jorge, 2008. Escore da condição corporal em bubalinos. Disponível em: http://dsti37.fmvz.unesp.br/bufalos/HPBufalos_files/Mat_Didatico/05-ESCORE_CONDCORPORAL.pdf. Acessado em: 28 de outubro de 2020.

Lourenço Júnior, 2008. Produção de búfalos na Amazônia. In: Simpósio do núcleo de estudos em Bovinocultura, II., 2005, Seropédica. Anais. Rio de Janeiro: Instituto de Zootecnia da UFRRJ; 1:207-226.

Perera, B.M.A.O.. Reproductive cycles of buffalo, *Animal Reproduction Science*, Volume 124, Issues 3–4, 2011, Pages 194-199, ISSN 0378-4320.

Pfeifer, L. F. M., & de Castro, N. Á. (2017). Use of a five-day progesterone-based timed artificial insemination protocol for dairy water buffaloes. *Semina: Ciências Agrárias*, 38(6), 3927-3931.

Pugliesi, G., Rezende, R. G., Silva, J. C. B. D., Lopes, E., Nishimura, T. K., Baruselli, P. S., ... & Binelli, M. (2017). Uso da ultrassonografia Doppler em programas de IATF e TETF em bovinos. *Rev Bras Reprod Anim*, 41(1), 140-150.

Rocha, 2007. Bubalinocultura: Búfalo: sinônimo de produção de carne. Fonte: Embrapa Rondônia. Disponível em: <http://www.zootecniabrasil.com.br/>, acessado em 15 de abril de 2021.

Saraiva, N. Z., Marques, J. R. F., Figueiró, M. R. (2019). Manejo reprodutivo de búfalos com o uso de biotécnicas da reprodução. Embrapa Amazônia Oriental, 2019. 29 p. (Documentos / Embrapa Amazônia Oriental, ISSN 1983-0513; 443).

Vishnu, K., Kumar, S., Tran, L., Malla, B., Tyagi, A., 2017. Effects of dietary supplementation of different vegetable oils varying in polyunsaturated fatty acid content

on reproductive performance and ovarian follicular characteristics of Murrah buffalo heifers, Buffalo Bulletin, 36(3), 505-519.

Declarações

Financiamento

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM 003/2022) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro a este projeto.

Conflito de interesse

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Contribuições dos autores

H.H. Perdigão: Experimentação, tratamento dos dados, investigação, redação - rascunho original. K.N. Sá: Experimentação e processamento e análise das amostras. P.L.G. Melo: Experimentação e processamento e análise das amostras. P.C.R. Mesquita: Processamento e análise das amostras. T.J.B. Silva: Processamento e análise das amostras. F. Jacobs Dias: Metodologia e supervisão. A.V. Pires: Metodologia e financiamento para aquisição. M.V.C. Ferraz: Conceituação, Metodologia, Análise formal, Captação de financiamento, Redação - revisão, edição, tradução do artigo. Todos os autores leram e aprovaram o manuscrito.

Disponibilidade de dados

Os conjuntos de dados gerados e/ou analisados durante o estudo atual estão disponíveis com o autor correspondente mediante solicitação razoável,

Aprovação ética

O Comitê de Ética do Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Amazonas aprovou todos os procedimentos com animais.

Tabelas

Tab 1. Resposta reprodutiva de búfalas submetidas a protocolo de IATF utilizando implantes de progesterona (P4) novo (G1) ou previamente reutilizados por 7 (G2), 14 (G3), 21 (G4) ou 28 (G5) dias.

Variáveis	Tratamentos					p-value
	G1	G2	G3	G4	G5	
Diâmetro do folículo pré ovulatório (mm)	12,07±0,95	11,37±1,09	10,69±0,89	12,91±1,01	10,53±0,95	0,40
Área do folículo pré ovulatório (mm ²)	12,66±1,94	10,88±2,24	9,01±1,83	13,97±2,07	8,99±1,94	0,30
Diâmetro do corpo lúteo (mm)	13,38±1,43	11,75±1,28	13,18±1,08	12,38±1,43	11,46±1,01	0,72
Área do corpo lúteo (mm ²)	12,50±2,70	10,42±2,41	14,77±2,04	11,80±2,70	10,60±1,91	0,59
Taxa de crescimento folicular (mm/dia)	0,70±0,13	0,74±0,14	0,63±0,14	0,84±0,12	0,55±0,14	0,60
Taxa Ovulação (%)	44,44	55,56	77,78	44,44	77,78	0,55
Taxa de cistos foliculares (%)	33,33	33,33	11,11	55,56	0,00	0,49

Tab 02. Taxa de ovulação de búfalas submetidas a protocolo de IATF utilizando implantes de progesterona (P4) novo (G1) ou previamente reutilizados por 7 (G2), 14 (G3), 21 (G4) ou 28 (G5) de acordo com o dia da ocorrência.

Dia da ovulação	Tratamentos				
	G1	G2	G3	G4	G5
D9	25%	20%	43%	25%	0%
D10	50%	20%	29%	25%	57%
D11	25%	0%	29%	25%	29%
Não determinado	0%	60%	0%	25%	14%

Figuras

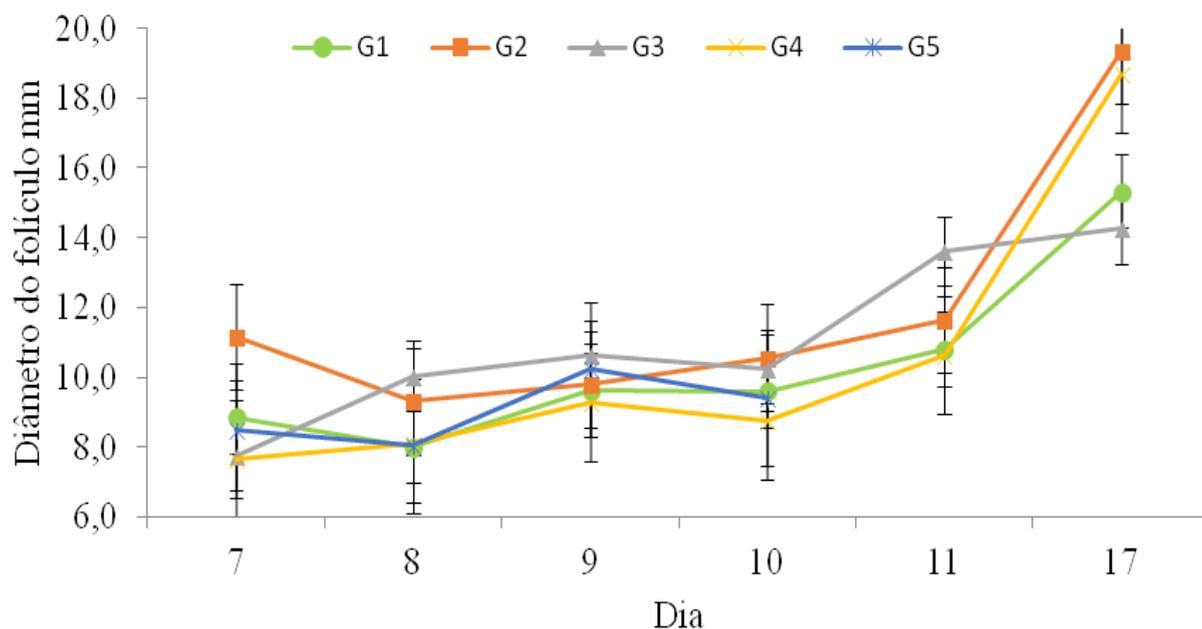


Fig 3 Área dos folículos de búfalas submetidas a protocolo curto de IATF utilizando implantes de progesterona (P4) novo (G1) ou previamente reutilizados por 7 (G2), 14 (G3), 21 (G4) ou 28 (G5) dias.

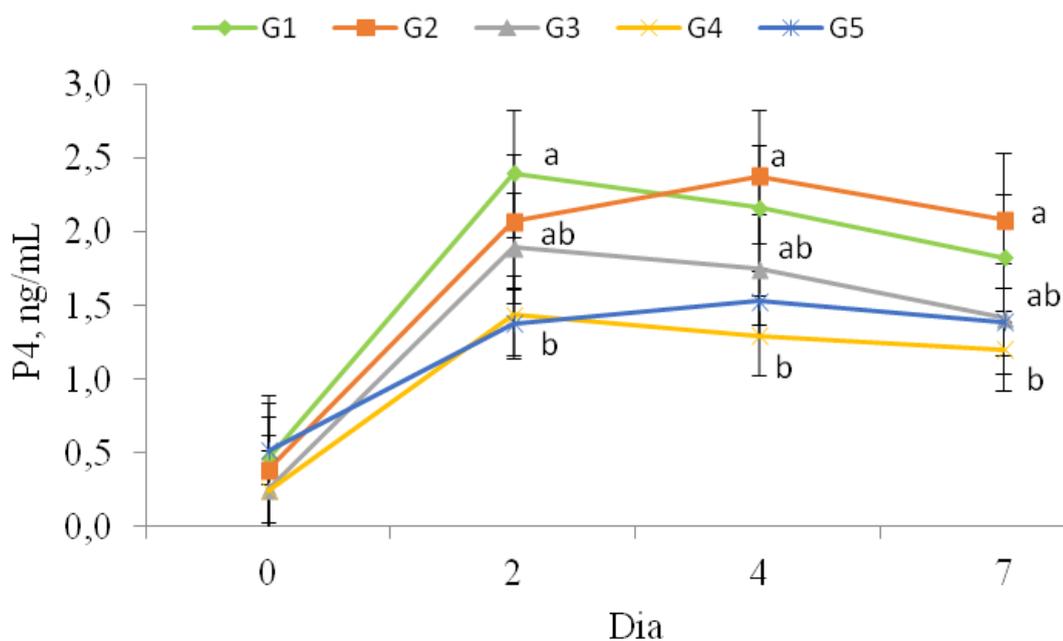


Fig 4 Concentração de progesterona sérica durante o período de permanência do dispositivo intravaginal de P4.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida *et. al.*, 2006. Avaliação da reutilização de implantes auriculares contendo norgestomet associados ao valerato ou benzoato de estradiol em vacas nelore inseminadas em tempo fixo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 43, n. 4, p. 456- 465.

Baruselli *et. al.*, 2009. Eficiência do uso da inseminação artificial em búfalos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, n.6, p.104-110, dez. Disponível em www.cbra.org.br.

Haider *et. al.*, 2015. Effect of timing of insemination after CIDR removal with or without GnRH on pregnancy rates in Nili-Ravi buffalo. **Animal Reproduction Science**, 163, 24-29.

Haider *et. al.*, 2021. The effect of GnRH administration/insemination time on follicular growth rate, ovulation intervals, and conception rate of Nili Ravi buffalo heifers in 7 –day-CIDR Co-synch. **Tropical Animal Health Production** 53, 558.

IBGE, 2021 – Produção da Pecuária Municipal (PPM). Brasil. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html?=&t=resultados>. Acesso em 22 de março de 2023.

Lourenço Júnior, 2008. Produção de búfalos na Amazônia. In: **Simpósio do núcleo de estudos em Bovinocultura, II**. 2005, Seropédica. Anais. Rio de Janeiro: Instituto de Zootecnia da UFRRJ; 1:207-226.

Oliveira *et. al.*, 2007. Desempenho produtivo e custos com alimentação de novilhos bubalinos alimentados com dietas com diferentes fontes de lipídios. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, p.727-732.

Pfeifer & Castro, 2017. Use of a five-day progesterone-based timed artificial insemination protocol for dairy water buffaloes. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 38, n. 6, p. 3927-3932, nov./dez.

Pinto-Neto *et. al.*, 2009. Reutilização de implante intravaginal de progesterona para sincronização de estro em bovinos. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, Umuarama, v. 12, n. 2, p.169-174, jul./dez.

Pugliesi *et. al.*, 2017. Uso da ultrassonografia Doppler em programas de IATF e TETF em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. Belo Horizonte, 41(1):140-150, jan./mar. Disponível em www.cbra.org.br

Rocha, 2007. Bubalinocultura: Búfalo: sinônimo de produção de carne. Fonte: **Embrapa Rondônia**. Disponível em: <http://www.zootecniabrasil.com.br/>, acessado em 15 de abril de 2021.

Weiller *et. al.*, 2021. Use of Estradiol Cypionate to induce ovulation in buffalo raised in floodplain areas of Itacoatiara, Amazonas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.73, n.1, p.41-48.

5. APÊNDICE



Poder Executivo
Ministério da Educação
Universidade Federal do Amazonas
Comissão de Ética no Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “**AVALIAÇÃO DA REUTILIZAÇÃO DO IMPLANTE DE PROGESTERONA EM BÚFALAS SUBMETIDAS À PROTOCOLO CURTO DE IATF NA AMAZÔNIA**” sob a responsabilidade do pesquisador **Marcos Vinicius de Castro Ferraz Junior** (docente ICEZ/UFAM) – que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – e por encontrar-se de acordo com os preceitos da Lei n. 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n. 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), após análise pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS, foi aprovada *ad hoc* sob o N. 014/2021.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	De Julho/2020 a Novembro/2021
Espécie/linhagem/raça	Bubalus bubalis / raças Murrah e Mediterrânea
N. de animais	15
Peso/Idade	400 kg/ 4 a 7 anos
Sexo	Fêmeas (F)
Origem	Setor de Produção de Ruminantes da Fazenda Experimental da Universidade Federal do Amazonas

Manaus, 10 de setembro de 2021.

Profa. Dra. Cinthya Iamile Fritlz Brandão de Oliveira
Coordenadora da CEUA-UFAM