



O uso de biotecnologias da reprodução em BÚFALOS

Novas tecnologias

O búfalo tem se tornado uma fonte viável de proteína no Brasil. Esta espécie tem se adaptado bem às condições brasileiras, mostrando bons resultados tanto na produção de carne como na de leite.

Entre os fatores responsáveis por



estes resultados, os mais importantes são as biotecnologias da reprodução e a seleção dos animais de produção. A adoção dos programas de melhoramento genético, auxiliados pelas técnicas da inseminação artificial (IA) e da transferência de embriões (TE), é importante para conseguir aumento nas taxas de produção.

No Brasil, búfalas com bom Escore de Condição Corporal (ECC) no parto apresentaram melhor performance reprodutiva. O primeiro estro após o parto é influenciado pelo ECC, pois búfalas com alto escore ($\geq 4,0$) mos-

tram sintomas de estro mais cedo do que búfalas com menor ECC ($\leq 3,5$). A porcentagem de anestro é afetada pelo ECC; resultando em maior número de búfalas em anestro com baixo ECC. Búfalas com ECC entre 4,0 e 4,5 no parto apresentaram menor intervalo entre partos do que búfalas com ECC entre 2,0 e 2,5. O número de doses de sêmen por concepção variou de acordo com o ECC, onde animais muito magros (ECC $\leq 2,5$) ou muito gordos (ECC = 5) necessitaram de maior número de doses de sêmen por concepção do que animais com ECC entre 3,0 e 4,5 (tabela 1). Desta forma, o ECC no parto é indicador confiável na performance reprodutiva de fêmeas no pós-parto (tabela 2). O búfalo tem comportamento sexual sazonal, pois animais que vivem distantes da região equatorial têm este comportamento influenciado positivamente pela diminuição de horas-luz diárias.

De acordo com Baruselli o manejo eficiente consiste em concentrar a detecção de cio, a Inseminação Artificial (IA) e a Transferência de Embriões (TE) em poucos meses do ano, de março a julho.

A detecção de cio é um fator muito importante no processo de implantação da IA e da TE. A detecção deficiente diminui as taxas de fertilidade e aumenta os custos da IA e TE. Portanto, o uso de rufiões para detecção de cio é indispensável.

Baruselli reportou que 37,93% dos animais apresentaram sinais de cio às 6h da manhã, 17,24% ao meio-dia, 20,68% às 6h da tarde e 24,13% à meia-noite. Porém, as búfalas apresentam sintomas de cio mais freqüentemente à noite, provavelmente

**Visintin, J.A.; Assumpção, M.E.O.A.;
Baruselli, P.S.; Mello, M.R.B.;
Rodrigues Alves, D.O.; Tavares, L.M.T.**
Departamento de Reprodução Animal,
Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia, Universidade de São Paulo.

te influenciados pelo meio ambiente. Durante o outono, tanto a temperatura como a umidade relativa do ar permitem pastoreio e locomoção dos animais sem estresse térmico. Em locais com temperatura e umidade relativa do ar altas durante o dia, há aumento dos sintomas de estro durante a noite. Baruselli sugere a observação de cio às 6h da manhã e às 6h da tarde com 60,26% e 39,74% de detecção de cio, respectivamente.

Para alcançar os melhores resultados, a inseminação artificial deve ser realizada no final do estro, quando o animal não está mais aceitando a cobertura. Portanto, é recomendável que as fêmeas que apresentarem sintomas de estro às 6h da manhã sejam inseminadas às 6h da tarde ou vice-versa, uma vez que o estro destes animais dura em média de 12 horas (63,23%).

A inseminação artificial realizada entre 6 e 8h da manhã apresentou taxa de concepção de 54,27%, entre 11 e 13 horas de 50% e entre 17 e 19h de 45,35%.

Baruselli et al. inseminaram 831 fêmeas em final de estro, quando não mais aceitavam cobertura, observando intervalo entre o início do estro e a inseminação artificial (duração do estro) de 12h (76,24%), 24h (20,44%) e 36h (3,32%).

O ciclo estral que tem duração média de 21 dias, variando de 18 a 26 dias, pode ser sincronizado para facilitar o manejo da IA e da TE, sendo que o intervalo entre a administração da prostaglandina e o estro varia de 24 a 96 horas, predominando o tempo de 48 a 84 horas em 90% dos animais.

Ainda, os fatores climáticos e sazonais têm forte efeito sobre as características físicas e morfológicas do sêmen. Na Região Amazônica, um ambiente quente, úmido e tropical, o melhor período para congelar sêmen é entre janeiro e junho. Búfalos são sensíveis ao estresse térmico, portanto, é comum a queda na qualidade do sêmen durante a estação quente.

Juntamente com a IA, a transferência de embriões tem se tornado uma das mais poderosas ferramentas para os criadores. Muitos países têm incorporado a superovulação e a transferência de embriões em programas de testes de progênie para impulsionar o melhoramento genético dos rebanhos produtores de carne. Com a seleção de machos e fêmeas, tanto adultos como jovens, foi esperada uma melho-



Rebanho de búfalos.

ra de 12% sob o aspecto genético. Posteriormente, um aumento de 22% nas taxas de melhoramento genético foram previstas com o uso de técnicas de fecundação in vitro (FIV) para produzir embriões de bezerras de 1 a 5 meses de idade.

O desenvolvimento do embrião bubalino é mais rápido do que o bovino, implicando a colheita e transferência ao redor de 5 ou 6 dias após o estro.

A resposta à superovulação e à recuperação embrionária em búfalos é geralmente baixa (tabela 3).

Avanços consideráveis têm sido atingidos em termos de resposta superovulatória e de produção de embriões, mas estudos adicionais em foliculogênese, produção de embriões in vitro, imunologia da interação materno-fetal e desenvolvimento do feto devem ser realizados para que estas

Tabela 1. Porcentagem de anestro; intervalo entre parto e primeiro estro; número de doses de sêmen por concepção e intervalo entre parto e prenhez (média ± d.p.) de acordo com o Escore de Condição Corporal (ECC) no parto.

Escore da Condição Corporal	Anestros (%)	Intervalo entre parto e primeiro cio (dias)	Doses de sêmen/concepção	Intervalos entre parto e prenhez (dias)
2,0	53,3 ^a	81,9 ± 17,2 ^a	2,87 ± 1,11 ^a	120,8 ± 22,6 ^a
2,5	37,0 ^{ba}	74,4 ± 30,2 ^a	2,71 ± 1,27 ^a	108,9 ± 31,9 ^a
3,0	19,1 ^{bc}	64,2 ± 25,7 ^a	1,90 ± 1,02 ^b	88,6 ± 37,0
3,5	12,3 ^c	64,9 ± 29,3 ^a	1,88 ± 0,84 ^b	87,7 ± 35,0
4,0	4,7 ^d	53,3 ± 32,5 ^b	1,54 ± 0,66 ^b	75,4 ± 31,9 ^b
4,5	2,2 ^d	48,5 ± 13,7 ^b	1,81 ± 0,87 ^b	70,9 ± 25,9 ^b
5,0	3,3 ^d	36,7 ± 15,2 ^b	2,65 ± 1,41 ^a	80,6 ± 45,3
Total	13,44	58,8 ± 26,5	1,89 ± 0,94	83,7 ± 32,4

(Baruselli, 1995)

Tabela 2. Efeito do Escore de Condição Corporal (ECC) no parto sobre a eficiência reprodutiva em búfalos.

	≤ 2,5 (baixa condição)	3.0 and 3.5 (condição intermediária)	≥ 4.0 (alta condição)
Número de búfalos	42	253	181
Primeiro estro pós-parto (dias)	76,6 ± 24,4 ^a	64,6 ± 27,2 ^b	49,3 ± 19,4 ^c
Incidência de anestro (%)	42,8 ^a	15,4 ^b	3,7 ^c
Dose de sêmen/concepção	2,72 ± 1,12 ^a	1,89 ± 0,68 ^b	1,78 ± 0,89 ^b
Intervalo entre parto e prenhez (dias)	112,7 ± 22,7 ^a	88,1 ± 28,6 ^b	75,1 ± 25,1 ^c
Taxa de Concepção - IA (%)	38,1 ^a	74,3 ^b	82,3 ^c
Taxa de Concepção - IA mais repasse com touro (%)	42,8 ^a	80,2 ^b	87,8 ^c

(Baruselli, 1995)

Tabela 3. Respostas superovulatórias em diferentes tratamentos com FSH.

	Grupo 1 FSH/LH 500UI ^a	Grupo 2 FSH/LH 333UI ^a	Grupo 3 FSH-P 25mg ^b	Grupo 4 FSH-P 14mg ^c
Nº de búfalas	11	12	11	11
Nº de folículos (>0.8 cm) no estro do tratamento	14,4 ± 3,7 ^d	11,7 ± 3,7 ^e	8,7 ± 3,5 ^f	9,9 ± 2,5 ^g
Nº de ovulações	7,4 ± 3,6	7,7 ± 3,0	6,3 ± 3,4	6,4 ± 1,4
Taxa de ovulação (%)	50,6 ^d	65,7 ^e	71,8 ^e	64,2 ^e
Nº de CL no dia 5/6	6,5 ± 2,6	5,7 ± 2,0	5,7 ± 2,9	5,8 ± 1,4
Nº de folículos (> 0.8cm) no dia 5/6	5,6 ± 5,1 ^d	2,3 ± 1,8 ^e	1,1 ± 0,9 ^e	2,3 ± 2,1 ^e
Nº total de embriões	1,0 ± 1,2	2,5 ± 3,5	2,2 ± 3,3	1,8 ± 2,4
Taxa de recuperação de embriões/ovulação (%)	13,5 ^d	32,5 ^e	34,9 ^e	28,4 ^e
Taxa de recuperação de embriões/CL (%)	15,5 ^d	43,8 ^e	38,1 ^e	31,2 ^e
Nº de embriões transferíveis	0,4 ± 0,9	2,0 ± 2,7	1,7 ± 2,6	1,6 ± 2,5
Taxa de embriões transferíveis	45,4 ^d	80,0 ^e	79,1 ^e	90,0 ^e

(Baruselli, 1995)

^a PLUSET, Serono, Itália

^b FSH-P, Schering Corporation, EUA

^c FSH-P, Folltropin, Vetrepharm, Canadá

^{d,e,f,g} valores com diferente sobrescrito diferem entre colunas (P < 0,05)

Tabela 4. Folículos e Complexos Cúmulus Oóforos (CCOs) aspirados pelo ultra-som em novilhas bubalinas.

Nº de novilhas	5
Nº de sessões de aspiração	15
Nº de folículos aspirados	227
Nº de folículos aspirados/animal/seção	3,03
Nº de CCOs recuperados/animal/seção	1,35
Taxa de Recuperação (%)	44,55
Taxa de Maturação (%)	80,20

(Tavares et al., 1997)

técnicas possam ser usadas nessa espécie.

A literatura é escassa quanto a FIV em búfalos, no entanto o primeiro búfalo nascido a partir de maturação, fecundação de oócito e cultivo até o estágio de blasto cisto in vitro prova a possibilidade desta técnica em búfalos.

Em búfalos, a taxa de in vitro (MIV) foi significativamente maior (81,7%) em meios suplementados com LH, FSH e estradiol do que em meios sem hormônios. A taxa de maturação de 41% e 52% foi reportada para animais adultos e pré-púberes. Tavares et al., no Brasil, observaram taxa de maturação de 80,20% (tabela 4).

Em búfalos, as baixas taxas de fecundação (19,6%) e de clivagem (8,9%) foram obtidas com sêmen congelado e capacitado com 10mg de heparina por ml em meio Hepes-Talp. A capacitação envolve mudanças fisiológicas no acrossomo do espermatozóide, necessárias para sua penetração na zona pelúcida do oócito.

No entanto, foram significativamente aumentadas quando o sêmen congelado foi capacitado com 5mMol de cafeína mais 10mg de heparina por ml em meio de Bracket e Oliphant - BO (fecundação de 29,8% e clivagem de 27,6%) e posterior aumento quando espermatozoides frescos foram capacitados da mesma maneira (fecundação de 50% e clivagem de 34%).

Estudos relacionados à maturação e à fecundação in vitro em búfalos são necessários, incluindo tratamento com gonadotrofinas de búfalas em fase puberal associado a aspiração folicular transvaginal com ultra-som.

A porcentagem de embriões que se desenvolveram até os estágios de mórula e de blastocisto foi baixa (4,04% e 0,52%, respectivamente), quando estes foram co-cultivados com células do cúmulus. No entanto, quando zigotos foram cultivados em monocamada de células do cúmulus juntamente com células epiteliais do oviduto, a porcentagem de desenvolvimento até os es-

tágios de mórula e de blastocisto foi maior (17,83% e 8,10%, respectivamente).

As baixas taxas de recuperação de oócitos por ovário podem ser atribuídas ao baixo número médio de folículos primordiais no ovário.

Os benefícios da tecnologia de FIV para o melhoramento genético podem ser alcançados se os oócitos forem aspirados de animais vivos com alto potencial genético. Uma alternativa para a produção de embriões pode ser a fecundação in vitro a partir de oócitos imaturos aspirados por ultra-som transvaginal, tanto de animais adultos quanto em fase pré-púbera tratados com gonadotrofinas.

Kitiyanant et al. obtiveram oócitos de búfalas Swamp adultas pela aspiração folicular por ultra-som, os quais foram desenvolvidos in vitro até os estágios de mórula ou blastocisto. No Brasil, Tavares et al. recuperaram 1,35 oócitos por animal pela aspiração por ultra-som de 5 búfalas durante 8 semanas (tabela 4).

Agradecimentos

Os autores agradecem aos criadores de Búfalos do Vale do Ribeira e à FAPESP (96/5845-1) e ao CNPq (52/1773-96.2) pelo fornecimento de infraestrutura e de animais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARUSELLI, P.S. (1992). Atividade ovariana e comportamento reprodutivo no período pós-parto em búfalos (*Bubalus bubalis*). (Ovarian activity and reproductive behaviour in postpartum period in buffaloes). São Paulo, (Thesis), 99p. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.
2. BARUSELLI, P.S. (1993). Manejo reprodutivo de bubalinos. (Reproductive management in buffaloes) SECRETARIA DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO, INSTITUTO DE ZOOTECNIA. Registro, 46p.
3. BARUSELLI, P.S. (1994a). Basic requirements for artificial insemination and embryo transfer in buffaloes. *Buffalo J.*, (Suppl 2):53-60.
4. BARUSELLI, P.S. (1994b). Sexual behaviour in buffaloes. *Proc. IV World Buffalo Congress*, 1:158-173.
5. BARUSELLI, P.S. (1996). Reprodução de bubalinos. I Simpósio Brasileiro de Bubalinocultura. Cruz das Almas- BA, 29p.