JÚLIA GLEYCI SOARES

**Estratégias para aumentar a recuperação de estruturas embrionárias de
búfalas superovuladas**

São Paulo

2015

JÚLIA GLEYCI SOARES

**Estratégias para aumentar a recuperação de estruturas embrionárias de búfalas
superovuladas**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Reprodução Animal da Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências.

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli

De acordo: _____

Orientador

São Paulo
2015

Nº CLASSIFICAÇÃO
Nº TOMBO 033976

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.3125
FMVZ

Soares, Júlia Gleyci
Estratégias para aumentar a recuperação de estruturas embrionárias de búfalas superovuladas /
Júlia Gleyci Soares . -- 2015.
115 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.
Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2015.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli.

1. Búfalos. 2. Superovulação. 3. Embriões. 4. Progesterona. 5. Prostaglandina. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Tratamentos para aumentar a taxa de recuperação de embriões de búfalas superovuladas", protocolado sob o nº 2288/2011, utilizando 60 (sessenta) búfalos, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 17/8/2011.

We certify that the Research "Treatments to increase embryo recovery rate of superovulated buffaloes", protocol number 2288/2011, utilizing 60 (sixty) buffaloes, under the responsibility Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethical Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 8/17/2011.

São Paulo, 18 de agosto de 2011.

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SOARES, Júlia Gleyci

Título: Estratégias para aumentar a recuperação de estruturas embrionárias de búfalas superovuladas

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

*A Deus, por tudo que me foi concedido e por me guiar nos meus passos,
sejam eles de tropeços ou de êxito, para que eu possa me tornar uma pessoa
melhor.*

*Aos meus pais, Telma e Gregório, que sempre primaram pela minha
educação. Amo vocês...*

*Aos meus irmãos, Gabriela, Joana e Benilton, fonte de inspiração pelas
pessoas incríveis que se tornaram. Amo vocês...*

*Ao meu namorado, Nelcio Carvalho. Presente de Deus na minha vida.
Te amo...*

Dedico

Agradeço

A Deus. Obrigada Senhor por tudo que tens me proporcionado. Obrigada por me ouvir e conceder momentos de alegria, e nos momentos difíceis, confortar meu espírito e coração durante a minha caminhada.

Aos meus pais Telma e Gregório Soares, pelo apoio incondicional em todas as minhas decisões. Pelo carinho, força, paciência, amor e encorajamento. Obrigada por estarem sempre ao meu lado. A distância só tem demonstrado o quanto estamos próximos uns dos outros... Amo vocês!

Aos meus irmãos Gabriela, Joana e Benilton, pelo exemplo de índole, integridade e pelo incentivo. Independente dos muitos quilômetros e das obrigações que nos separam e tornam o nosso encontro difícil, me sinto abençoada por tê-los. Amo vocês família!

Ao meu sobrinho Tarcísio. Tatá meu amor, você não tem noção do quanto me faz feliz. A tia babona te ama muito!

Ao meu namorado, Nelcio Carvalho. Por ter sido tão parceiro na condução deste estudo! Acima de tudo, por ser meu companheiro, amigo e um homem incrível... Agradeço a Deus por ter colocado alguém tão especial na minha vida. Amo-te infinitamente!

A toda minha família pelo incentivo e por acreditarem em mim. Em especial meus avós Joana e Renê, minha tia Selma e minha prima-irmã Sarah. Vocês me inspiram e incentivam muito mais do que imaginam. Obrigada por todo amor, carinho e atenção que me motivam a continuar.

Ao meu orientador Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli, pela confiança depositada na oportunidade de realizar o doutorado. Grande exemplo de profissionalismo e dedicação. Obrigada pela contribuição profissional e pessoal

imensurável que esses anos me proporcionaram. Foi uma honra poder trabalhar com o senhor! Muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Michael D'Occhio, que teve papel fundamental na finalização deste trabalho e na minha formação. O meu profundo respeito e admiração. Obrigada pela oportunidade de trabalharmos juntos. Foi uma experiência engrandecedora.

Aos professores do Departamento de Reprodução Animal, FMVZ-USP, pelos ensinamentos e paciência. Em especial, Prof.^a Mayra, Prof. Mário, Prof.^a Cláudia, Prof.^a Carla, Prof. Marcelo, Prof. Visintin e Prof. Ricardo. Obrigada pela excelente convivência durante esse período.

À Harumi, pelo extraordinário trabalho desempenhado na secretaria da pós e por todas as vezes que recorri e prontamente fui atendida.

À Thais e Roberta pelo trabalho desempenhado e todo auxílio prestado.

A todos os funcionários da FMVZ-USP pelo apoio.

Aos amigos “Pietrinhos”: Bruno Monteiro, Bruno Karboxy, Bruna Martins, Emiliana Mili, Guilherme Vasconcelos, Gustavo Macedo, João Gandara, Laís Vieira, Manoel Sá Filho, Marcio Mendanha, Roberta Machado, Rodolfo Badá, Rodrigo Sala e Tomás Souza. Muito obrigada pela convivência tão prazerosa e divertida, além do aprendizado e ganho profissional que o convívio com cada um de vocês me proporcionou!

As minhas queridas amigas Laís Vieira - Lalá e Roberta Harue – Japinha, pela bela amizade construída nesses anos de convivência no nosso AP. Tudo isso tornou a morada em Sampa muito mais prazerosa, divertida e feliz!

Ao grande José Nélcio de Sousa Sales, pela paciência, humildade, gentileza e auxílio prestado sempre que solicitado. Valeu Zé!

Aos amigos do VRA, Bruna Oliveira, Guta, Juliane, Milton, Milena, Roney, Everton, Marcílio, Luana, Andrezza, Carolzinha, Carina, Cristina, Letícia, Diego,

Patrícia, Adriano, Juliana, Fernanda, Mariana, Marcelo, Camila, Miguel, Dona Sandra, Dona Silvia, Diego e Daniel. Obrigada pela convivência sempre agradável. Foi um prazer conhecer cada um de vocês!

À Universidade de São Paulo e ao Departamento de Reprodução Animal – VRA, por tudo que me proporcionaram.

À Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Registro, pela colaboração para execução deste estudo e aos funcionários desta instituição, em especial, Zé, Ismael, Toninho, Mané e Bastião.

À Ourofino Agronegócio, à Agener e à WTA pelo fornecimento dos hormônios e equipamentos necessários para a execução deste projeto.

À CAPES e ao Cnpq pelas bolsas de estudo concedidas.

A todos aqueles que, de alguma forma, apoiaram-me e auxiliaram-me, tornando possível a concretização desta Tese.

E por fim, mas não menos importante, agradeço às pérolas negras que participaram deste projeto, queridas búfalas que tenho tanto prazer em trabalhar.

A todos, muito obrigada!

RESUMO

SOARES, J. G. **Estratégias para aumentar a recuperação de estruturas embrionárias de búfalas superovuladas.** [Strategies to increase embryo recovery of superovulated buffaloes]. 2015. 115 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Apesar de inúmeros estudos desenvolvidos no Brasil e no mundo, a utilização das biotecnologias de superovulação (SOV) e transferência de embriões (TE) em bubalinos ainda apresenta resultados inconsistentes, associados à principalmente à baixa taxa de recuperação de embriões. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da utilização de dispositivo de P4 (para promover diminuição da contratilidade do trato genital, Capítulo 1) ou da administração de PGF_{2α} (para promover aumento da atividade da fímbria e da frequência do batimento ciliar, Capítulo 2) durante o período periovulatório na captação dos oócitos pelas fímbrias e no aumento da produção de embriões em búfalas superovuladas. No Experimento 1 (Capítulo 1), doadoras bubalinas foram homogeneamente divididas em dois grupos: controle (G-C; n=8) e tratamento com progesterona (P4) durante o período periovulatório (G-P4; n=8). A emergência da onda de crescimento folicular foi sincronizada com um dispositivo intravaginal de P4 e a administração de 2 mg i.m. de benzoato de em dia aleatório do ciclo estral (Dia 0; D0). A partir do D4, todas as búfalas receberam 200 mg i.m. de FSH duas vezes ao dia, em 8 doses decrescentes. Foram administrados 530µg i.m. de PGF_{2α} no D6 e no D7. A P4 foi removida do G-C no D7 e do G-P4 no D10. No D8, todas as búfalas receberam 25 mg i.m. de pLH. As inseminações foram realizadas 12 e 24 h após o tratamento com pLH. Foram realizadas colheitas de sangue a cada 12h do D7 ao D11 para posterior dosagem de progesterona. As estruturas embrionárias (oócitos/embriões) foram coletadas pelo método não cirúrgico de lavagem uterina seis dias após a segunda IA (D14). Avaliações ultrassonográficas dos ovários foram realizadas no D8 e no D14 para aferir respectivamente as respostas superestimulatória e superovulatória. As variáveis foram analisadas pelo procedimento GLIMMIX do SAS®. As búfalas do G-P4 apresentaram menor taxa de ovulação ($13,5 \pm 4,9$ vs. $71,5 \pm 16,1\%$; $P=0,002$) e, consequentemente, maior taxa de folículos ≥ 8 mm ($87,8 \pm 10,6$ vs. $34,3 \pm 9,8\%$; $P=0,06$) e menor número de CLs no D14 ($1,1 \pm 0,3$ vs. $8,0 \pm 2,8$; $P=0,04$) que as búfalas do G-C. O número de estruturas embrionárias ($1,9 \pm 0,7$ vs. $0,0 \pm 0,0$; $P=0,03$), de embriões transferíveis ($1,6 \pm 0,7$ vs. $0,0 \pm 0,0$; $P=0,04$) e congeláveis ($1,6 \pm 0,7$ vs. $0,0 \pm 0,0$; $P=0,04$) foram inferiores para o G-P4. A concentração sérica de progesterona foi

maior nos animais do G-P4 ($1,87 \pm 0,13$) que nos do G-C ($0,48 \pm 0,10$; $P < 0,0001$). No Experimento 1 (Capítulo 2), as doadoras foram divididas aleatoriamente em 2 grupos: controle (G-C; $n=22$) e tratamento com prostaglandina $F_{2\alpha}$ durante o período periovulatório (G-PGF; $n=22$). Os animais do G-C foram submetidos ao protocolo de superovulação descrito no capítulo 1. No G-PGF todas as búfalas receberam protocolo de superovulação semelhante ao G-C e, adicionalmente, receberam quatro doses de $PGF_{2\alpha}$ ($0,53$ mg i.m. de cloprostenol sódico) do D8 ao D10 com intervalo de 12h. Foi verificado maior número de estruturas embrionárias recuperadas em búfalas superovuladas tratadas com $PGF_{2\alpha}$ durante o período periovulatório (G-PGF= $3,5 \pm 0,6$) comparado ao grupo controle (G-C= $2,3 \pm 0,5$; $P=0,02$). Além disso, houve aumento no número de embriões transferíveis (G-PGF= $2,7 \pm 0,6$ vs. G-C= $1,8 \pm 0,5$; $P=0,05$). No Experimento 2 (Capítulo 2), os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos experimentais: Grupo Controle (G-C; $n=22$), Grupo PGF injetável (G-PGF-INJ; $n=22$) e Grupo PGF Bomba Osmótica (G-PGF-BO; $n=22$). Os animais pertencentes aos grupos: G-C e G-PGF-INJ foram submetidos aos mesmos protocolos descritos para seus grupos correspondentes no Experimento 1 (Capítulo 2). No G-PGF-BO, todas as búfalas receberam protocolo de superovulação semelhante ao G-C e, adicionalmente, receberam a partir do D8 a inserção subcutânea de uma mini-bomba osmótica, contendo $PGF_{2\alpha}$ ($2,12$ mg de Cloprostenol sódico). A bomba osmótica retirada no D10. Não foram verificadas diferenças no número de estruturas totais recuperadas nas búfalas tratadas com $PGF_{2\alpha}$ durante o período periovulatório (G-C= $2,1 \pm 0,8$ vs. G-PGF-INJ= $2,1 \pm 0,6$ vs. G-PGF-BO= $1,4 \pm 0,4$; $P=0,58$). Os tratamentos no período periovulatório com dispositivo intravaginal de P4 (Capítulo 1) e com $PGF_{2\alpha}$ (Capítulo 2) não foram eficientes em aumentar a recuperação de estruturas embrionárias de búfalas superovuladas.

Palavras-chave: Búfalos. Superovulação. Embriões. Progesterona. Prostaglandina.

ABSTRACT

SOARES, J. G. **Strategies to increase embryo recovery of superovulated buffaloes.** [Estratégias para aumentar a recuperação de estruturas embrionárias de búfalas superovuladas]. 2015. 115 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Despite numerous studies conducted in Brazil and world-wide, the use of superovulation (SOV) and embryo transfer (ET) biotechnologies in buffaloes still shows inconsistent results, particularly in terms of low embryos recovery rate. Thus, the aim of this study was to evaluate the use of a P4 device (to decrease contractility of the genital tract, Chapter 1) or PGF_{2α} administration (to increase activity of the fimbriae and ciliary beat frequency, Chapter 2) during the periovulatory period in the uptake of oocytes by fimbriae and in the increase of embryo production in superovulated buffaloes. In Experiment 1 (Chapter 1), buffalo donors were homogeneously assigned into 2 groups: Control (C-G; n=8) and progesterone (P4) treatment during the periovulatory period (P4-G; n=8). Follicular growth wave emergence was synchronized with an intravaginal P4 device and the injection of 2 mg i.m. of estradiol benzoate at random stage of the estrous cycle (Day 0; D0). From D4 on, all buffaloes received 200 mg i.m. of FSH twice-daily, in 8 decreasing doses. A dose of PGF_{2α} was given on D6 PM and on D7. The P4 was removed from the C-G on D7 and from the P4-G on D10. On D8, all buffaloes received 25 mg i.m. of pLH. Inseminations were done 12 and 24 h after the pLH treatment. Blood samples were collected every 12h from D7 to D11 for further progesterone assay. The embryonic structures (ova/embryos) were collected by nonsurgical uterine flush 6 days after the second timed AI (D14). Ovarian ultrasound examinations were performed on D8 and on D14 to verify respectively the superestimulation and the superovulatory response. Variables were analyzed by GLIMMIX procedure of SAS[®]. Buffaloes from P4-G showed lower ovulation rate (13.5 ± 4.9 vs. $71.5 \pm 16.1\%$; $P=0.002$) and, consequently, higher follicles ≥ 8 mm rate (87.8 ± 10.6 vs. $34.3 \pm 9.8\%$; $P=0.06$) and lower number of CLs on D14 (1.1 ± 0.3 vs. 8.0 ± 2.8 ; $P=0.04$) than buffaloes from C-G. The total number of embryonic structures (1.9 ± 0.7 vs. 0.0 ± 0.0 ; $P=0.03$), transferable (1.6 ± 0.7 vs. 0.0 ± 0.0 ; $P=0.04$) and freezable embryos (1.6 ± 0.7 vs. 0.0 ± 0.0 ; $P=0.04$) were lower for P4-G. The serum progesterone concentration was greater for animals in P4-G (1.87 ± 0.13) than in the C-G (0.48 ± 0.10 ; $P<0.0001$). In Experiment 1 (Chapter 2), donors were randomly assigned into two groups: control (C-G; n=22) and prostaglandin F_{2α} treatment during the periovulatory period (G-PGF; n=22). Animals from C-G were subjected to the superovulation protocol

described on chapter 1. In G-PGF all buffaloes received similar superovulation protocol from the C-G and, additionally, received four doses of $\text{PGF}_{2\alpha}$ (0.53 mg i.m. of sodic cloprostenol) from D8 to D10, 12h apart. A greater number of embryonic structures were recovered from superovulated buffaloes treated with $\text{PGF}_{2\alpha}$ during the periovulatory period ($\text{PGF-G}=3.5\pm0.6$) compared to control group ($\text{C-G}=2.3\pm0.5$; $P=0.02$). Furthermore, increased number of transferable embryos were found in treated animals ($\text{PGF-G}=2.7\pm0.6$ vs. $\text{C-G}=1.8\pm0.5$; $P=0.05$). In Experiment 2 (Chapter 2), animals were randomly assigned into three experimental groups: Control group (C-G; $n=22$), Injectable PGF group (INJ-PGF-G; $n=22$) and Osmotic pump PGF group (BO-PGF-G; $n=22$). The animals from C-G and INJ-PGF-G group were subjected to the same protocols described for their correspondent groups in Experiment 1 (Chapter 2). In BO-PGF-G, all buffaloes received the superovulation protocol similar to C-G and, additionally, received from D8, a subcutaneous insertion of a mini osmotic pump, containing $\text{PGF}_{2\alpha}$ (2.12 mg de sodic cloprostenol). The osmotic pump was removed on D10. No differences were found on the total number of recovered structures in buffaloes treated with $\text{PGF}_{2\alpha}$ during the periovulatory period ($\text{C-G}=2.1\pm0.8$ vs. $\text{INJ-PGF-G}=2.1\pm0.6$ vs. $\text{BO-PGF-G}=1.4\pm0.4$; $P=0.58$). Treatments on the peri- ovulatory period with intravaginal P4 device (Chapter 1) and $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Chapter 2) were not efficient in increasing the recovery of embryonic structures in superovulated buffalo.

Keywords: Buffaloes. Superovulation. Embryos. Progesterone. Prostaglandin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 -	Protocolo para superestimulação do crescimento folicular em doadoras bubalinas, com aplicação de 200 mg de FSH.....	40
Figura 1 -	Modelo hipotético gráfico da resposta ao protocolo de superovulação e taxa de recuperação de embriões produzidos em búfalas antes e após os tratamentos com progesterona e com prostaglandina $F_{2\alpha}$ no período periovulatório	22
Figura 2 -	Representação esquemática do protocolo de superovulação, dos exames ultrassonográficos e das colheitas de sangue.....	40
Figura 3 -	Concentração sérica total de progesterona (ng/mL) de búfalas superovuladas, tratadas com dispositivo intravaginal de progesterona por 7 (G-C) ou 10 dias (G-P4)	45
Figura 4 -	Perfil de liberação de progesterona (ng/mL) de búfalas superovuladas, tratadas com dispositivo intravaginal de progesterona por 7 (G-C) ou 10 dias (G-P4). Efeitos de tratamento ($P = 0,001$), dia ($P < 0,001$) e interação entre tratamento e dia ($P < 0,001$).....	46
Figura 5 -	Número total de estruturas embrionárias, embriões transferíveis e congeláveis de búfalas superovuladas, tratadas com dispositivo intravaginal de progesterona por 7 (G-C) ou 10 dias (G-P4)	46
Figura 6 -	Número de corpos lúteos (CLs) e de folículos (FOL) ≥ 8 mm aferidos no dia 14 (D14) em búfalas superovuladas, tratadas com dispositivo intravaginal de progesterona por 7 (G-C) ou 10 dias (G-P4)	48

Figura 7 -	Taxas de ovulação (Ov), de folículos ≥ 8 mm (Fol ≥ 8 mm) e de recuperação de estruturas embrionárias (oócitos/embriões; Taxa Rec) de búfalas superovuladas, tratadas com dispositivo intravaginal de progesterona por 7 (G-C) ou 10 dias (G-P4) 48
Figura 8 -	Representação esquemática do protocolo de superovulação e dos exames ultrassonográficos 58
Figura 9 -	Taxas de ovulação, de folículos ≥ 8 mm e de recuperação de estruturas embrionárias (oócitos/embriões) de búfalas superovuladas tratadas (G-PGF) ou não (G-C) com prostaglandina $F_{2\alpha}$ injetável no período periovulatório.... 61
Figura 10 -	Número total de estruturas embrionárias, embriões transferíveis e congeláveis de búfalas superovuladas tratadas (G-PGF) ou não (G-C) com prostaglandina $F_{2\alpha}$ injetável no período periovulatório..... 62
Figura 11 -	Dispersão da taxa de recuperação de estruturas embrionárias (oócitos/embriões) de búfalas superovuladas tratadas (G-PGF) ou não (G-C) com prostaglandina $F_{2\alpha}$ injetável no período periovulatório 62
Figura 12 -	Representação esquemática do protocolo de superovulação e dos exames ultrassonográficos 68
Figura 13 -	Taxas de ovulação, de folículos persistentes e de recuperação de estruturas embrionárias (oócitos/embriões) obtidas de búfalas superovuladas tratadas (G-PGF-INJ ou G-PGF-BO) ou não (G-C) com prostaglandina $F_{2\alpha}$ no período periovulatório 71
Figura 14 -	Número total de estruturas embrionárias, embriões transferíveis e congeláveis obtidos de búfalas superovuladas tratadas (G-PGF-INJ ou G-PGF-BO) ou não (G-C) com prostaglandina $F_{2\alpha}$ no período periovulatório 72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Dinâmica folicular e total de estruturas embrionárias (oócitos/embriões) recuperadas de búfalas superovuladas, tratadas com dispositivo intravaginal de progesterona por 7 (G-C) ou 10 dias (G-P4) 44
Tabela 2 -	Dinâmica folicular e total de estruturas embrionárias (oócitos/embriões) recuperadas de búfalas superovuladas tratadas (G-PGF) ou não (G-C) com prostaglandina F2 α injetável no período periovulatório..... 59
Tabela 3 -	Dinâmica folicular e total de estruturas embrionárias (oócitos/embriões) recuperadas de búfalas superovuladas tratadas (G-PGF-INJ ou G-PGF-BO) ou não (G-C) com prostaglandina F2 α no período periovulatório 70

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	HIPÓTESES	21
3	OBJETIVOS	23
4	REVISÃO DE LITERATURA	24
4.1	DINÂMICA FOLICULAR E CONTROLE ENDÓCRINO DO CICLO ESTRAL EM BUBALINOS	24
4.2	CONTROLE DO CRESCIMENTO FOLICULAR E SUPEROVULAÇÃO DE DOADORAS BUBALINAS	27
4.3	AÇÕES DO ESTRADIOL, DA PROGESTERONA E DAS PROSTAGLANDINAS NA TUBA UTERINA	32
	CAPÍTULO 1	37
	EXPERIMENTO 1 - MANUTENÇÃO DO DISPOSITIVO INTRAVAGINAL DE PROGESTERONA DURANTE O PERÍODO PERIOVULATÓRIO EM BÚFALAS SUPEROVULADAS	38
1	JUSTIFICATIVA	38
2	MATERIAL E MÉTODOS	39
2.1	ANIMAIS E LOCAL DO EXPERIMENTO	39
2.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	39
2.3	AVALIAÇÕES ULTRASSONOGRÁFICAS	41
2.4	COLHEITA DE SANGUE E ANÁLISE HORMONAL	41
2.5	AVALIAÇÃO DAS TAXAS DE OVULAÇÃO, DE FOLÍCULOS ≥ 8 MM NO D14 E DE RECUPERAÇÃO DAS ESTRUTURAS EMBRIONÁRIAS	42
2.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
3.1	RESPOSTA FOLICULAR, TAXA DE OVULAÇÃO E DE RECUPERAÇÃO DE ESTRUTURAS EMBRIONÁRIAS E PERFIL DE LIBERAÇÃO DE PROGESTERONA	44
4	CONCLUSÃO	54
	CAPÍTULO 2	55
	EXPERIMENTO 1 - UTILIZAÇÃO DE PROSTAGLANDINA $F_{2\alpha}$ INJETÁVEL DURANTE O PERÍODO PERIOVULATÓRIO EM BÚFALAS SUPEROVULADAS	56
1	JUSTIFICATIVA	56

2 MATERIAL E MÉTODOS	57
2.1 ANIMAIS E LOCAL DO EXPERIMENTO	57
2.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	57
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
3.1 RESPOSTA FOLICULAR, TAXA DE OVULAÇÃO E RECUPERAÇÃO DE ESTRUTURAS EMBRIONÁRIAS.....	59
4 CONCLUSÃO	65
EXPERIMENTO 2 - UTILIZAÇÃO DE PROSTAGLANDINA $F_{2\alpha}$ EM DISPOSITIVO DE LIBERAÇÃO LENTA (BOMBA OSMÓTICA) DURANTE O PERÍODO PERIOVULATÓRIO EM BÚFALAS SUPEROVULADAS.....	
1 JUSTIFICATIVA	66
2 MATERIAL E MÉTODOS	67
2.1 ANIMAIS E LOCAL DO EXPERIMENTO	67
2.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	67
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
3.1 RESPOSTA FOLICULAR, TAXA DE OVULAÇÃO E RECUPERAÇÃO DE ESTRUTURAS EMBRIONÁRIAS.....	69
4 CONCLUSÃO	78
5 DISCUSSÃO GERAL	79
6 CONCLUSÕES	85
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E IMPLICAÇÕES PRÁTICAS	86
REFERÊNCIAS	87

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos dez anos, a taxa de crescimento do rebanho bubalino mundial foi de 14,1%, enquanto a produção de leite aumentou 24,5% nesse mesmo período (FAO, 2015). Atualmente existem aproximadamente 200 milhões de cabeças de búfalos no mundo, as quais são responsáveis pela produção anual de 97,5 milhões de toneladas de leite (FAO, 2015). No Brasil, verificou-se 10,2% de crescimento do rebanho bubalino na última década (FAO, 2015). Na atualidade, estima-se que o rebanho nacional esteja em torno de 1.332.284 búfalos, distribuídos por todos os estados do Brasil (FAO, 2015).

Entretanto, como ocorre nas demais espécies de interesse zootécnico, o crescimento do rebanho bubalino deve estar associado ao controle da produtividade. Com o auxílio de biotecnologias da reprodução é possível multiplicar e distribuir animais que possuem elevado mérito genético, colaborando para que a atividade se torne cada vez mais atraente sob os pontos de vista econômico e social.

A inseminação artificial (IA) permite a multiplicação de material genético de origem paterna, o que é indispensável para o melhoramento da espécie. Apesar do progresso e da aplicação da IA nos rebanhos nacionais, faz-se necessário aumentar a contribuição das fêmeas para acelerar o processo de melhoramento genético. Para tanto, torna-se importante a utilização de outras biotecnologias, como a superovulação (SOV) e transferência de embriões (TE; BARUSELLI et al., 2000; CARVALHO; SOARES; BARUSELLI, 2010).

Ínúmeros estudos foram realizados no Brasil e no mundo com o objetivo de avaliar a eficiência da superovulação e da transferência de embriões na espécie bubalina (ALVAREZ et al., 1994; BARUSELLI et al., 1994b; OBA et al., 1994; CARVALHO et al., 2002; CAMPANILE et al., 2010). Embora tenham sido reportados nascimentos de búfalos com o emprego da SOV e TE em diversos países (DROST et al., 1983; DROST et al., 1988; MISRA et al., 1990; ZICARELLI, 1992; BARUSELLI, 1994; BARUSELLI et al., 1994a), a utilização dessa técnica na espécie ainda apresenta limitações, ligadas principalmente à baixa taxa de recuperação embrionária (MISRA et al., 1990; AMBROSE et al., 1991; BARUSELLI, 1994; ZICARELLI et al., 1994a, b; TANEJA et al., 1995; TANEJA; TOTTEY; ALI, 1995; MADAN; DAS; PALTA, 1996; BARUSELLI et al., 2000; ZICARELLI et al., 2000; CARVALHO et al., 2002). Atualmente, búfalas superovuladas produzem em média de 1 a 3 embriões viáveis por colheita (CARVALHO et al., 2002; MISRA; TYAGI, 2007; NEGLIA, GIANLUCA et

al., 2010), o que é inferior ao número médio de embriões recuperados em bovinos (10 embriões totais e 6 transferíveis; BOLAND; GOULDING; ROCHE, 1991).

Os avanços no conhecimento proporcionados por estudos científicos sobre as técnicas de SOV e TE em fêmeas bubalinas permitem afirmar que esses animais respondem ao tratamento superovulatório (BARUSELLI, 1997), embora sejam menos eficientes que as fêmeas bovinas na recuperação de embriões (BARUSELLI et al., 2000). De acordo com BARUSELLI et al. (2000), somente 34,8% das ovulações de búfalas submetidas à superestimulação do crescimento folicular resultam na colheita de estruturas embrionárias, percentual muito inferior àquele encontrado em bovinos por ADAMS (1994), que registra taxas de 63% a 80%. Essa disparidade entre as taxas de recuperação de embriões nas duas espécies pode estar relacionada a alguma falha que as búfalas possam apresentar no processo de captação e/ou transporte dos oócitos pela tuba uterina após as superovulações (BARUSELLI et al., 2000; CARVALHO et al., 2007).

De acordo com Hunter (1988), os dois principais mecanismos envolvidos no transporte dos gametas femininos são os batimentos ciliares do epitélio da tuba uterina e as ondas de contração da musculatura lisa da miosalpinge. Tais mecanismos, assim como o tempo de transporte dos oócitos pela tuba uterina, são controlados pelos esteróides ovarianos.

Os baixos resultados da SOV e TE na espécie bubalina podem decorrer das altas concentrações do hormônio estradiol (E2), postulam Misra et al. (1998). A exposição prolongada a concentrações elevadas de 17β -estradiol podem mudar o ambiente intra-uterino e/ou da tuba uterina e, conseqüentemente, prejudicar a captação dos oócitos pela fímbria e o transporte e desenvolvimento embrionário normal (MISRA et al., 1998). É possível que as fêmeas bubalinas sejam mais sensíveis que as bovinas a elevações nas concentrações plasmáticas de 17β -estradiol durante os tratamentos superovulatórios (BEG; SANWAL; YADAV, 1997), visto que as búfalas apresentam menores concentrações plasmáticas de E2 que as fêmeas bovinas durante o ciclo estral normal (BATRA; PANDEY, 1983).

Uma possível alternativa para reduzir os efeitos deletérios das altas concentrações de E2 seria a utilização de progesterona (P4). Foi verificado por Baruselli et al. (2002) redução nas concentrações séricas de E2 em búfalas superovuladas tratadas com P4 durante o período periovulatório. Além disso, o aumento nas concentrações plasmáticas de P4 estimula os receptores β (inibidores de contratilidade), ocasionando relaxamento da junção ampola-istimo e permitindo o transporte das estruturas embrionárias para a porção istimica da tuba uterina (CASCHETTO et al., 1979; HELM et al., 1982).

Outra possibilidade constitui-se na utilização da prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$). Osada et al. (1999) verificaram que a administração de subseqüentes doses de $PGF_{2\alpha}$ durante o período periovulatório de coelhas, estimulou a contração da musculatura lisa da tuba uterina, permitindo a ativação das fimbrias deste órgão para a captação e transporte dos oócitos.

A exposição até aqui realizada indica a importância de investigar detalhadamente as inter-relações anatomofuncionais entre os hormônios esteróides ovarianos e o sistema genital das búfalas. A compreensão dos processos fisiológicos que envolvem as concentrações de E_2 , de P_4 , e de $PGF_{2\alpha}$ no período periovulatório, e suas relações com a captação e o transporte oocitário é de grande relevância para a melhoria da eficiência da superovulação em bubalinos.

2 HIPÓTESES

No presente estudo verificaram-se as seguintes hipóteses:

- A manutenção do dispositivo intravaginal de progesterona durante o período periovulatório aumenta a recuperação de estruturas embrionárias em búfalas superovuladas (Figura 1);
- A utilização de subsequentes doses de $\text{PGF}_{2\alpha}$ durante o período periovulatório aumenta a recuperação de estruturas embrionárias em búfalas superovuladas (Figura 1).

Figura 1 - Modelo hipotético gráfico da resposta ao protocolo de superovulação e taxa de recuperação de embriões produzidos em búfalas antes e após os tratamentos com progesterona e com prostaglandina $F_{2\alpha}$ no período periovulatório.

3 OBJETIVOS

O objetivo principal no presente trabalho foi avaliar os efeitos da manutenção do dispositivo intravaginal de progesterona (Capítulo 1) ou da aplicação/liberação de constantes doses de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Capítulo 2) durante o período periovulatório, na recuperação de estruturas embrionárias de búfalas superovuladas.

Também foram avaliadas as concentrações plasmáticas de P_4 , as respostas foliculares, as taxas de ovulação e a qualidade embrionária nos diferentes tratamentos estudados.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 DINÂMICA FOLICULAR E CONTROLE ENDÓCRINO DO CICLO ESTRAL EM BUBALINOS

O conhecimento da dinâmica folicular e do padrão de comportamento das ondas de crescimento folicular é de fundamental importância para o emprego de programas reprodutivos que envolvem a sincronização do ciclo estral e ovulação (SILVA et al., 2009). Em búfalos, esta compreensão é necessária para o desenvolvimento de novas técnicas e para a melhoria dos regimes atuais de manipulação do ciclo estral nesta espécie (BARUSELLI et al., 1997). O sucesso dos programas reprodutivos está diretamente relacionado com o desenvolvimento folicular e com a ovulação. Nas últimas décadas, diversas terapias têm sido propostas para manipular o crescimento do folículo ovariano em bubalinos (BARUSELLI et al., 2013).

O planejamento de programas reprodutivos em rebanhos bubalinos exige conhecimento prévio da característica reprodutiva sazonal da espécie. Os búfalos são poliétricos estacionais de dias curtos, semelhantemente aos ovinos e caprinos, apresentando aumento da atividade reprodutiva nos meses do outono e inverno. Desta forma, quando criados em localidades distantes da região equatorial, têm comportamento reprodutivo influenciado positivamente pela diminuição de horas de luz do dia (ZICARELLI et al., 1994a; ZICARELLI, 1997b). Durante o período de anestro, a maioria dos búfalos apresenta crescimento de folículos de tamanho pequeno e médio, no entanto, sem ovulação (EL-WISHY, 2007). Deste modo, Baruselli et al. (2001) verificaram alta influência da latitude na distribuição dos partos ao longo do ano. Quanto maior a latitude, maior a concentração das partições entre janeiro e março (0° a $8^{\circ} = 36,4\%^a$; 8° a $16^{\circ} = 41,0\%^b$; 16° a $24^{\circ} = 62,4\%^c$; 24° a $32^{\circ} = 72,3\%^d$).

Os estudos de dinâmica folicular em bubalinos demonstram que esta espécie apresenta desenvolvimento ovariano semelhante aos bovinos (BARUSELLI et al., 1997). Embora a ocorrência de ciclo com duas ondas de crescimento folicular seja a mais relatada em fêmeas bubalinas (63,3%; MANIK; MADAN; SINGLA, 1994; BARUSELLI et al., 1997; ALI et al., 2003), também foi observado o padrão de uma (BARUSELLI et al., 1997) ou três ondas (MANIK; MADAN; SINGLA, 1994; BARUSELLI et al., 1997). Ainda, Presicce et al. (2004)

observaram que novilhas apresentaram padrão de três ondas de crescimento folicular, enquanto que búfalas multíparas tinham padrão de duas ondas. O número de ondas de crescimento folicular em um ciclo é também associado com a fase luteal ($10,4 \pm 2,1$ dias vs. $12,7 \pm 2,9$ dias, em ciclos de duas ou três ondas, respectivamente) e com a duração do ciclo estral ($22,3 \pm 0,9$ vs. $24,5 \pm 1,9$ dias, respectivamente; (BARUSELLI et al., 1997). O intervalo inter-ovulatório pode variar de 21 a 25 dias, dependendo do número de ondas de crescimento folicular, sendo mais longo em animais com três ondas (MANIK; MADAN; SINGLA, 1994; BARUSELLI et al., 1997).

Embora existam milhares de folículos primordiais em ovários de mamíferos, quase todos são eliminados *in vivo* pelo processo de atresia folicular (SANTOS et al., 2006). Entre as espécies bubalina e bovina, este fenômeno torna-se ainda mais evidente, uma vez que foram constatadas diferenças no número de folículos atrésicos, sendo verificada atresia em 2/3 dos folículos em desenvolvimento nos bubalinos e em 50% nos bovinos (DANELL, 1987). Além disso, foi observado por histologia ovariana, que existe número bastante reduzido da população de folículos primordiais em novilhas búfalas (12.636 em novilhas cíclicas e 10.132 em não cíclicas), quando comparadas às bovinas (50.000 folículos primordiais; (DANELL, 1987). Concomitantemente, Van Ty, Chupin e Driancourt (1989) verificaram que os ovários bubalinos possuem aproximadamente 20% do número de folículos antrais encontrados nos bovinos ($47,5 \pm 23,8$ vs. $233,0 \pm 95,8$; $P < 0,002$). O número de folículos > 1 mm também difere entre as duas espécies, visto que bovinos possuem aproximadamente 90 folículos, enquanto que em búfalos este número se reduz para 46,3 (VAN TY; CHUPIN; DRIANCOURT, 1989).

Desta forma, deve-se considerar que existem particularidades relevantes inerentes à espécie bubalina em comparação à bovina no que se refere à dinâmica folicular. A primeira está relacionada ao número de folículos recrutados por onda de crescimento folicular, menor em bubalinos que em bovinos (BARUSELLI et al., 1997; GIMENES et al., 2009; CAMPANILE et al., 2010). Conforme mencionado, a reduzida população folicular ovariana associada à elevada atresia em bubalinos podem contribuir para o baixo número de folículos antrais recrutados por onda folicular, em comparação aos bovinos (BARUSELLI et al., 2013).

Gimenes et al. (2009) verificaram em animais sincronizados contemporaneamente que, na emergência folicular, o número de folículos em crescimento foi de $13,1 \pm 1,4$ para novilhas búfalas, de $15,0 \pm 2,8$ para novilhas Holandesas e de $29,7 \pm 3,1$ para novilhas Nelore ($P < 0,05$). Essa diferença pode ser refletida nas respostas destes animais quando submetidos

às técnicas de superovulação (SOV), *ovum pick-up* (OPU) e produção *in vitro* de embriões (PIVE).

Entretanto, foi observada baixa variação entre o número de folículos recrutados para as diferentes ondas de crescimento folicular em búfalos (BARUSELLI et al., 1997), em concordância com a alta repetibilidade no número de folículos observados por onda, reportada em bovinos (BONI et al., 1993), o que sugere que o número de folículos recrutados é uma característica individual. Não existem informações disponíveis a respeito da herdabilidade desta característica em búfalos. Porém, a seleção de animais baseada no número de folículos por onda torna-se atrativa, visto que há correlação positiva entre o número de folículos pequenos no início do tratamento superestimulatório e na resposta à superovulação (MONNIAUX; CHUPIN; SAUMANDE; 1983; ROMERO et al., 1991). Estas observações iniciais foram confirmadas recentemente em bovinos, em estudos que verificaram que o número de folículos na onda de crescimento folicular foi altamente variável entre os animais, porém de alta repetibilidade dentro dos indivíduos (BURNS et al., 2005; IRELAND, et al., 2007). Mais recentemente, tem sido relatado que o número de folículos está associado com as concentrações circulantes do hormônio anti Mulleriano (AMH), produzido pelas células da granulosa de todos os folículos e em maior quantidade pelos pequenos folículos antrais saudáveis (IRELAND et al., 2010; MONNIAUX et al., 2012). Portanto, poderia ser possível avaliar a reserva ovariana de folículos responsivos às gonadotrofinas por meio da detecção das concentrações circulantes de AMH (BÓ; MAPLETOFT, 2014).

Outra diferença da espécie bubalina em relação aos bovinos, diz respeito ao diâmetro folicular máximo alcançado por onda de crescimento folicular. Em bubalinos, esse diâmetro varia de 11,1 a 15,5 mm dependendo do número de ondas de crescimento folicular (MANIK; MADAN; SINGLA, 1994; BARUSELLI et al., 1997) e parece ser intermediário entre *Bos indicus* e *Bos taurus*. Em bovinos, os diâmetros máximos variam em função do grupo genético (zebuínos vs. taurinos), sendo menores em *Bos indicus* (10 a 12 mm; (BÓ et al., 1993; RHODES; DE'ATH; ENTWISTLE, 1995; FIGUEIREDO et al., 1997) do que em *Bos taurus* (15 a 20 mm; GINTHER; KASTELIC; KNOPF, 1989; KASTELIC; KNOPF; GINTHER, 1990; BÓ et al., 1993). Além disso, o diâmetro folicular também depende da categoria animal. Presicce et al. (2004) reportaram que a taxa de crescimento e o diâmetro do maior folículo foi significativamente menor em novilhas comparado a búfalas multíparas tanto para primeira onda de crescimento folicular (1,3 mm vs. 1,7 mm/dia, e 10,5 mm vs. 13,3 mm, respectivamente) quanto para segunda onda (1,0 mm vs. 1,3 mm/dia, e 11,0 mm vs. 13,8 mm).

Gimenes et al. (2007) verificaram que também há diferenças entre bubalinos e bovinos com relação aos diâmetros atingidos pelo folículo dominante (FD) e pelos folículos subordinados (FS) no momento da divergência/seleção folicular. Em búfalas, a divergência folicular ocorre 2,6 dias após a ovulação, semelhante à *Bos taurus* (GINTHER et al., 1996) e à *Bos indicus* (SARTORELLI et al., 2005; GIMENES et al., 2008). No momento do desvio folicular, os diâmetros do folículo dominante e do maior subordinado são de 7,2 e 6,4 mm, respectivamente. Estes diâmetros mostram-se maiores que os descritos para *Bos indicus* [FD: 5,4 a 6,2 mm (SARTORELLI et al., 2005; CASTILHO et al., 2007; GIMENES et al., 2007); FS: 5,4 a 5,8 mm (SARTORELLI et al., 2005; CASTILHO et al., 2007; GIMENES et al., 2007), porém menores que os reportados para *Bos taurus* (FD: 8,5 mm e FS: 7,2 mm; GINTHER, O. J. et al., 1996).

De acordo com Gimenes (2006), a aquisição de capacidade ovulatória em novilhas bubalinas ocorre a partir de 8,5 mm de diâmetro, quando 50% dos animais tornam-se responsivos ao LH exógeno.

Conforme previamente mencionado nesta revisão, algumas particularidades na foliculogênese em bubalinos podem explicar os resultados obtidos quando biotecnologias da reprodução são aplicadas a esta espécie.

4.2 CONTROLE DO CRESCIMENTO FOLICULAR E SUPEROVULAÇÃO DE DOADORAS BUBALINAS

O tratamento superovulatório pode ser definido como o método de estimular diversos folículos ovarianos em estágio terciário e os folículos que se tornariam atrésicos a se desenvolverem até o estágio pré-ovulatório, com subsequente ovulação (REICHENBACH et al., 2002). O aumento do número fisiológico de ovulações obtidas por este tratamento deve complementar-se com a IA (CABODEVILA; TORQUATRI, 2001). O uso da SOV seguida pela IA é uma técnica que proporciona maior número de embriões por doadora (MAPLETOFT; BENNETT STEWARD; ADAMS, 2002). Estas técnicas, que estão associadas com a transferência de embriões (TE) em receptoras, são ferramentas importantes para facilitar a disseminação de material genético de alta qualidade (BÓ et al., 2002; BARUSELLI et al., 2011).

O objetivo dos tratamentos para induzir superovulação em programas de transferência de embriões é obter o número máximo de embriões viáveis com alta probabilidade de ocorrência de prenhez (BÓ; MAPLETOFT, 2014). Embora a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) tenha apresentado progresso e venha sendo aplicada com sucesso em rebanhos bubalinos, a exploração de técnicas para multiplicar o material genético de origem materna ainda apresenta baixa difusão. Este cenário é atribuído aos insatisfatórios resultados obtidos até o momento, os quais refletem a compreensão parcial dos eventos envolvidos na manipulação do ciclo estral, na superestimulação do crescimento folicular e na ovulação desta espécie (CARVALHO; SOARES; BARUSELLI, 2010).

Basicamente, o protocolo de superovulação em búfalas inicia-se com a administração de estradiol associada ao tratamento de sete dias com progesterona, o que proporciona a emergência da onda de crescimento folicular de forma sincronizada 4 a 5 dias após (BARTOLOMEU et al., 2002). O intervalo entre o tratamento com estradiol associado à progesterona e o início da emergência da onda de crescimento folicular é similar entre búfalas ($4,5 \pm 0,2$ dias), vacas Holandesas ($4,4 \pm 0,2$ dias) e Nelore ($4,2 \pm 0,2$ dias; (GIMENES et al., 2009). Desta forma, posteriormente, o tratamento exógeno com o hormônio folículo estimulante (FSH) pode ser programado para coincidir com a emergência da onda de crescimento folicular, permitindo que a técnica de superestimulação do crescimento folicular seja mais bem sucedida (CAMPANILE et al., 2010). A meia-vida biológica do FSH é, em média, de 5 horas (LASTER, 1972), de modo que deve ser administrado duas vezes ao dia para induzir adequada resposta superestimulatória (LOONEY et al., 1981; MONNIAUX; CHUPIN; SAUMANDE, 1983).

Após a superestimulação do crescimento folicular, é realizada a indução das múltiplas ovulações. A administração do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) ou do hormônio luteinizante (LH) 24 horas após a última administração de FSH resulta em ovulações sincronizadas, o que elimina a necessidade de detecção de estro das búfalas para a realização da IA (BARUSELLI et al., 2002). Estudos prévios (ZICARELLI et al., 2000) demonstraram que a administração do indutor da ovulação 24 horas após a última aplicação de FSH está associada com maiores taxa de ovulação, fecundação e recuperação de embriões. A administração de LH 12 h após a última dose de FSH induz luteinização folicular sem ovulação (ZICARELLI et al., 2000) e a administração de LH 36 h após a última dose de FSH induz a ovulação de apenas uma pequena proporção de folículos em búfalas (CARVALHO et al., 2002).

Os avanços proporcionados pela técnica de SOV permitem afirmar que as fêmeas bubalinas respondem ao tratamento superovulatório [média de 15 folículos > 8 mm após o tratamento superestimulatório; moderada taxa de ovulação (aproximadamente 60%) e produção de 9 CLs no momento da lavagem uterina; (BARUSELLI, 1997; BARUSELLI et al., 2000)], embora sejam menos eficientes que as fêmeas bovinas na recuperação de embriões.

Este reduzido número de embriões recuperados em búfalos também foi descrito por vários autores (KARAIVANOV, 1986; MADAN, 1990; DROST, 1996; ZICARELLI, 1997a). De acordo com Baruselli et al. (2000), somente 34,8% das ovulações de búfalas submetidas à superestimulação do crescimento folicular resultam na colheita de estruturas embrionárias, percentual muito inferior àquele encontrado em bovinos (63% a 80%; (BOLAND; GOULDING; ROCHE, 1991; ADAMS, 1994; VOS et al., 1994; SHAW et al., 1995). Essa disparidade entre as taxas de recuperação de embriões nas duas espécies pode estar relacionada a alguma falha no processo de captação e/ou transporte dos oócitos pela tuba uterina (BARUSELLI et al., 2000).

Os dois principais mecanismos envolvidos no transporte dos gametas femininos são os batimentos ciliares do epitélio da tuba uterina e as ondas de contração da miosalpinge (HUNTER, 1988). A tuba uterina não é meramente um canal passivo para o transporte de espermatozoides, oócitos e embriões (LYONS; SARIDOGAN; DJAHANBAKHCH, 2006a). Apesar de esta estrutura ser mais conhecida pela função de transporte mecânico de gametas e embriões, adicionalmente, algumas das suas outras funções incluem capacitação e armazenamento de espermatozoides, captação do oócito após a ovulação e controle da migração dos espermatozoides para o sítio de fertilização (EZZATI et al., 2014). Um papel importante da atividade muscular da mesossalpinge tem sido implicado no processo de captação do oócito. Durante este processo, a fimbria, porção final da tuba uterina, que está em estreita proximidade com o folículo rompido, demonstra uma série de atividades oscilantes que se acredita serem responsáveis pela recuperação de oócitos, após a sua liberação (OKAMURA et al., 1977). Ainda, diversas evidências demonstram que a atividade ciliar desempenha um papel importante no transporte de gametas e embriões pela tuba uterina (EZZATI et al., 2014).

Tais mecanismos, assim como o tempo de transporte dos oócitos pela tuba uterina, são controlados pelos esteroides ovarianos (HUNTER, 1988). A frequência dos batimentos ciliares na região da fimbria da tuba uterina está sujeita a flutuações cíclicas que são controladas pelas concentrações de E2 e P4 (NISHIMURA et al., 2010; NAKAHARI et al.,

2011). Neste contexto, os baixos resultados da MOET na espécie bubalina podem decorrer das altas concentrações do hormônio estradiol (E2) durante o tratamento superovulatório, postulam Misra et al. (1998). Relatos prévios demonstraram que exposições prolongadas a elevadas concentrações de 17 β -estradiol podem modificar o ambiente uterino e/ou da tuba uterina e, conseqüentemente, prejudicar o desenvolvimento e o transporte normal dos embriões. É possível que as fêmeas bubalinas sejam mais sensíveis que as fêmeas bovinas a elevações nas concentrações plasmáticas de 17 β -estradiol durante os tratamentos superovulatórios (BEG; SANWAL; YADAV, 1997).

Trabalhando com búfalas superovuladas, Misra et al. (1998) verificaram que altas concentrações de E2 e sua prolongada elevação, ou a grande proporção de E2/P4, podem aumentar a turgidez do sistema genital, dificultando a captação dos oócitos pelas fímbrias da tuba uterina. Além disso, segundo Bellve; McDonald (1970), as altas concentrações de E2 encontradas em fêmeas de pequenos ruminantes superovuladas promovem reversão no peristaltismo da tuba uterina, o que pode ocasionar perda dos oócitos que, eventualmente, tenham sido captados pelas fímbrias. Na ausência de ovulação, os folículos anovulatórios de búfalas superovuladas secretam altas concentrações de E2 (SCHALLENBERGER et al., 1990). Para Zicarelli (1997a), quanto menor for a incidência de cistos ovarianos e de folículos anovulatórios, maior será a taxa de recuperação embrionária nessa espécie.

Concentrações anormais de hormônios esteroides ovarianos podem afetar os mecanismos de transporte dos gametas femininos (HUNTER, 1988). O desequilíbrio entre as concentrações dos hormônios esteroides, ou seja, a elevação na proporção E2/P4, pode prejudicar a interação entre os oócitos e as células ciliadas da endossalpinge durante as ovulações. A ausência dessa interação promove a perda de oócitos, pois, de acordo com Hunter (1988), durante a ovulação o fluxo dos fluidos da tuba uterina direciona-se à cavidade abdominal.

Esta relação entre os hormônios esteroides e a taxa de recuperação de estruturas embrionárias em fêmeas bubalinas superovuladas foi utilizada como base para a elaboração de técnicas de SOV para a espécie. A partir desta hipótese, estudos foram conduzidos (BARUSELLI et al., 2002; CARVALHO et al., 2002) com o objetivo principal de reduzir as concentrações circulantes de E2 durante os tratamentos superovulatórios, seja pela utilização de progesterona exógena ou bioimplantes de deslorelina, respectivamente. Contudo, em ambos os estudos não foi obtido aumento nas taxas de recuperação de estruturas embrionárias.

Ainda, para comprovar tais hipóteses, foram conduzidos estudos sequenciais sobre as inter-relações anatômicas e fisiológicas entre os esteroides ovarianos e o sistema genital de

búfalas e bovinas. Nestes estudos, foram avaliadas as características morfométricas de fêmeas com ovulação única ou múltipla e comparou-se a direção dos movimentos ciliares da tuba uterina quando expostos ou não ao E2 em meio de cultivo. Os autores não verificaram efeito do estradiol no transporte dos embriões ou no movimento ciliar das tubas uterinas. Porém, verificou-se maior número de folículos anovulatórios, maior rigidez da conexão ovário-mesovário e maior espessura da camada muscular do infundíbulo nas búfalas quando comparadas a fêmeas bovinas. Estes fatores poderiam ser parcialmente associados à baixa taxa de recuperação de embriões em bubalinos (CARVALHO, 2006; CARVALHO et al., 2011; CARVALHO et al., 2012).

Outra possível causa pode estar relacionada à baixa qualidade oocitária em bubalinos, visto que nesta espécie existe uma frágil conexão entre o oócito e as camadas de células da granulosa, ao contrário do que ocorre na espécie bovina (GASPARRINI, 2002). Alguns estudos inferem que a somatotropina recombinante bovina (rbST) pode aumentar esta conexão por efeito direto e/ou indireto do fator-I de crescimento semelhante à insulina (IGF-I) e aumentar a população de pequenos folículos antrais (PAVLOK et al., 1996; LUCY, 2000). Adicionalmente, o tratamento com rbST estimula a expansão das células do cumulus (IZADYAR et al., 1998; IZADYAR; ZEINSTRA; BEVERS, 1998), contribuindo para a adesão dos oócitos às fímbrias e às células ciliadas da endosalpíngex, o que poderia aumentar a taxa de recuperação de estruturas embrionárias em animais superovulados.

Na tentativa de comprovar essa hipótese, alguns trabalhos desenvolvidos em bubalinos demonstraram que o emprego de rbST promove aumento do número e da proporção de embriões transferíveis (SONGSASEN et al., 1999) e aumento na taxa de recuperação de embriões (50,0 vs. 33,3%; $P=0,06$) e, apesar de não significativo, do número de estruturas embrionárias recuperadas ($5,1 \pm 6,8$ vs. $1,6 \pm 1,7$; $P = 0,18$; BARUSELLI et al., 2003).

No entanto, existem relatos de diferença na eficiência reprodutiva de vacas bovinas que receberam rbST conforme o aumento da concentração sanguínea de IGF-I em resposta ao tratamento (THATCHER et al., 2006). Vacas secas respondem com alta elevação da concentração sanguínea de IGF-I, a qual está correlacionada com diminuição da fertilidade. Entretanto, vacas em lactação apresentam aumento adequado dos níveis de IGF-I, associados ao aumento da fertilidade. Os autores discutem que a resposta ao tratamento pode estar associada ao metabolismo do animal.

Diante disso, Carvalho et al. (2007) avaliaram o efeito da redução na dose de rbST em búfalas submetidas ao protocolo de superovulação. Neste estudo foram utilizados três grupos: controle (0 mg de rbST), meia dose (250 mg de rbST) e dose inteira (500 mg de rbST). Os

autores não verificaram efeito do tratamento com rbST (dose inteira ou meia dose), quando comparado ao grupo controle. Porém, numericamente, houve maior número de estruturas totais, embriões transferíveis e congeláveis para o grupo tratado com meia dose de rbST.

De modo geral, o problema relacionado à baixa taxa de recuperação de embriões bubalinos permanece pouco elucidado, comprometendo a eficiência da SOV nessa espécie. Desta forma, novos estudos são necessários para viabilizar o emprego da SOV em bubalinos, para que essa técnica seja amplamente difundida e empregada pelos criadores com a finalidade de acelerar o ganho genético e a produtividade dos rebanhos bubalinos.

4.3 AÇÕES DO ESTRADIOL, DA PROGESTERONA E DAS PROSTAGLANDINAS NA TUBA UTERINA

O batimento ciliar na superfície externa do infundíbulo e a aderência adequada da matriz do COC nos cílios do infundíbulo levam a captação e transporte do oócito para o interior da tuba uterina (TALBOT, PRUE; GEISKE; KNOLL, 1999). As células epiteliais da tuba uterina, incluindo as células ciliares, sofrem variações cíclicas durante todo o ciclo ovariano, sob o controle das concentrações de E2 e P4. Ambos os receptores de E2 e P4 foram identificados no epitélio da tuba uterina e a expressão desses receptores também varia durante o ciclo ovariano (POLLOW et al., 1981; AMSO et al., 1994; LYONS et al., 2002; TEILMANN et al., 2006).

Na fase folicular, o aumento moderado do E2 provoca aumento da frequência dos batimentos ciliares (FBC) e o aumento do E2 na fase ovulatória causa diminuição da FBC. O E2 tem dois efeitos na FBC: em baixas doses aumenta a FBC, enquanto que altas doses provoca diminuição. Essas ações do E2 foram abolidas por um inibidor dos receptores de E2 (ICI-182,780). No início da fase lútea, a baixa P4 e o E2 causam aumento da FBC em taxas mais elevadas. Na fase lútea já estabelecida, ocorre aumento da P4 e consequentemente diminuição da FBC. Já no final desta fase, há uma diminuição na P4 e, assim, ocorre aumento na FBC novamente. Existe uma fase de repouso, onde as diminuições na FBC não são explicadas pelo baixo E2 e P4. Assim, as condições celulares na fase de repouso podem ser diferentes das demais fases, tal como na sensibilidade hormonal, expressão de receptores e sinalização intracelular. Porém, as mudanças na FBC durante o ciclo estral ainda não estão completamente elucidadas (NISHIMURA et al., 2010).

Carvalho et al. (2011) verificaram, em cortes histológicos, maior espessura do infundíbulo de búfalas em relação às bovinas. Os autores relatam que essa constatação poderia explicar a menor taxa de recuperação de estruturas embrionárias em búfalas submetidas aos protocolos de SOV, uma vez que o E2 pode reduzir a dimensão do lúmen da tuba uterina por promover contrações da musculatura lisa desse órgão (HUNTER, 1988). Associado a este fator, a elevação na proporção estradiol/progesterona pode prejudicar a interação entre os oócitos e as células ciliadas da endossalpinge durante as ovulações. A ausência dessa interação promove falha na captação dos oócitos, pois o fluxo dos fluidos da tuba uterina é direcionado para cavidade abdominal durante a ovulação (HUNTER, 1988). Além disso, foi verificado que o epitélio da tuba uterina é capaz de selecionar oócitos viáveis (maduros ou não) em éguas, visto que caso o oócito esteja degenerado, este flutua no lúmen da tuba uterina, indicando a capacidade de seleção de oócitos pela tuba uterina (KÖLLE et al., 2009). Ainda, Eddy; Balmaceda; Pauerstein (1978) relataram em coelhas, que a administração de estrógeno após a ovulação resultou na retenção do oócito próximo à junção ampola-istmo.

Portanto, o equilíbrio da proporção estrógeno/progesterona evidencia um papel relevante no transporte de gametas pela tuba uterina. Estudos prévios reportaram que tanto os receptores de E2 quanto os de P4 estão presentes no epitélio da tuba uterina e a expressão desses receptores varia em relação à fase do ciclo ovariano (POLLOW et al., 1981; AMSO et al., 1994; TEILMANN et al., 2006; NUTU et al., 2007). Foi demonstrado que a adição *in vitro* de elevadas concentrações de P4 na tuba uterina de humanos diminuiu em 40-50% a FBC em todas as porções deste órgão, enquanto que o E2 impediu a redução da FBC induzida pela P4 (MAHMOOD et al., 1998). Esses achados indicam que a FBC na fímbria é regulada tanto pelo E2 quanto pela P4 (NAKAHARI et al., 2011).

Nesse sentido, a P4 poderia auxiliar na redução dos possíveis efeitos deletérios de altas concentrações de E2, uma vez que se constatou redução das concentrações séricas de E2 em búfalas superovuladas e tratadas com progesterona durante o período periovulatório (BARUSELLI et al., 2002). Foi demonstrado que a administração de P4 bloqueou os efeitos do E2 nas células epiteliais da tuba uterina de vacas (WIJAYAGUNAWARDANE et al., 1999). Adicionalmente, após a ovulação, a elevação nas concentrações plasmáticas de P4 estimula os receptores β (inibidores de contratilidade), causando relaxamento da junção ampola-istmo e permitindo o transporte do óvulo para a porção ístmica da tuba uterina (CASCHETTO et al., 1979; HELM et al., 1982). A P4 modula a ação do E2 pela rápida redução das concentrações de receptores de estrógeno (EVANS et al., 1980) e também reduz a produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$, indutor de contratilidade na tuba uterina, por meio da diminuição da atividade da fosfolipase-A

(MORISHITA et al., 1993). Ainda, foi verificado que as contrações induzidas pela $\text{PGF}_{2\alpha}$ podem ser reduzidas de maneira dose-dependente pela progesterona, promovendo relaxamento uterino, que é relevante para o sucesso de técnicas de reprodução artificial em humanos (KÜNZEL et al., 2014). Na via genômica, a P4 interage com o seu receptor de progesterona nuclear, que diminui a expressão de genes associados à contração e mantém o relaxamento uterino. Já na via não-genômica, interage com os receptores associados à membrana para modular diretamente os níveis de cálcio intracelular e de adenosina monofosfato cíclica (AMPc; MESIANO, 2007).

A FBC é alta no dia da ovulação em função do E2, o que beneficia a captação e transporte do oócito para a junção ampola-istmo, onde ocorre a fecundação. Posteriormente, uma vez que a fase progesteronica se inicia, as secreções mucosas do istmo diminuem e ocorre relaxamento do tônus muscular através do mecanismo de *downregulation* dos receptores- α por meio da ativação dos receptores- β (NISHIMURA et al., 2010). Estes eventos resultam na abertura do lúmen ístmico, permitindo o transporte do embrião precoce para o útero (JANSEN, 1978). Em seguida, um novo aumento na P4 mantém a FBC baixa, o que pode ajudar o sucesso da implantação do embrião no útero e permitir o seu desenvolvimento nos estágios iniciais da prenhez (NISHIMURA et al., 2010).

A mucosa da tuba uterina é revestida por uma única camada de epitélio cilíndrico simples ou pseudoestratificado cilíndrico, contendo dois tipos celulares, células secretoras e ciliadas (PRIEDKALNS, 1982; ELLINGTON, 1991; BYLANDER et al., 2010). O transporte dos gametas é auxiliado pelos movimentos ciliares (que apresentam atividade máxima na ovulação e logo depois desta) e contrações musculares que estabelecem correntes líquidas que provavelmente captam o oócito para o interior da tuba uterina (HALBERT; TAM; BLANDAU, 1976; PRIEDKALNS, 1982; HALBERT; BECKER; SZAL, 1989; TALBOT, PRUDENCE; SHUR; MYLES, 2003; HAFEZ; HAFEZ, 2004). A regulação dos movimentos ciliares é, portanto fator relevante para o transporte, fecundação do oócito e implantação do embrião. Diversos fatores que afetam os movimentos ciliares têm sido reportados, incluindo a progesterona (BLANDAU et al., 1975; MAHMOOD et al., 1998; LYONS et al., 2002; LYONS; SARIDOGAN; DJAHANBAKHCH, 2006b), estradiol (MAHMOOD et al., 1998), interleucina 6 (PAPATHANASIOU et al., 2008), prostaglandinas (SPILMAN; HARPER, 1975; WÄNGGREN et al., 2006), angiotensina II (Ang II; SARIDOGAN et al., 1996) e Ca^{2+} (VERDUGO, 1980).

A camada externa linear e a camada interna anular dos músculos lisos da tuba uterina contêm tanto receptores α quanto β , cuja sensibilidade é afetada ciclicamente pela influencia de

substâncias endócrinas. Quando os receptores α são estimulados, há um aumento na contratilidade da musculatura lisa na ampola e na fímbria, e quando os receptores β são estimulados, ocorre inibição da contratilidade. Esses receptores são altamente responsivos aos esteroides sexuais (PAUERSTEIN et al., 1974) e às prostaglandinas (PGs), estando diretamente envolvidos no controle rítmico das contrações e relaxamentos tubários, necessários para o transporte do óvulo (HORTON; MAIN; THOMPSON, 1965; HODGSON, 1976; RAJKUMAR; GARG; SHARMA, 1979; RIEHL; HARPER, 1981).

As prostaglandinas são importantes mediadores locais de funções da tuba uterina e estão envolvidas na ovulação e fecundação, bem como no transporte de oócitos e embriões. Elas são sintetizadas a partir de ácidos graxos essenciais via fosfolipase A. O produto desta reação, o ácido araquidônico é metabolizado pela ação da cicloxigenase (COX). Em seguida, o ácido araquidônico é oxidado pela prostaglandina endoperoxídeo sintetase 1 (PTGS1) ou 2 (PTGS2) em prostaglandina H₂ (PGH₂). Finalmente, a prostaglandina E₂ (PGE₂) e a prostaglandina F_{2 α} (PGF_{2 α}) são geradas pela PGH₂ via terminais PG sintetases (PGEs e PGFs). A prostaglandina F_{2 α} também pode ser produzida por meio da conversão da PGE₂ via prostaglandina 9-cetorredutase (CBR1; MAŁYSZ-CYMBORSKA et al., 2013).

As contrações da musculatura lisa da ampola observadas após a ovulação podem ser causadas pelo influxo das altas concentrações de PGF_{2 α} liberada juntamente com o fluido folicular. Em sentido contrário, inibidores da síntese de prostaglandina, inibem a ovulação (AINSWORTH et al., 1979). Além disso, a PGF_{2 α} está presente nas paredes da tuba uterina, onde aumenta a contratilidade da musculatura lisa deste órgão, resultando no aumento da velocidade do transporte oocitário e embrionário (LINDBLOM; HAMBERGER; WIQVIST, 1978; VERDUGO; RUMERY; TAM, 1980; WEBER et al., 1991; KISSLER et al., 2004). Portanto, a PGF_{2 α} auxilia no transporte do oócito e do zigoto na tuba uterina pela estimulação da camada muscular e das células epiteliais ciliadas (HARPER, 1988).

Osada et al. (1999) verificaram que a administração de subseqüentes doses de PGF_{2 α} durante o período periovulatório provocou aumento na atividade de contração da tuba uterina de coelhas. A PGF_{2 α} reestimulou os tecidos tubários a iniciarem a atividade de contração da musculatura lisa, o que permitiu que as porções da fímbria da tuba uterina fossem ativadas para captar os oócitos. O aumento da PGF_{2 α} no fluido folicular previamente à ovulação é um requisito para induzir as contrações da parede folicular, a qual rompe, expelindo o oócito e juntamente o fluido folicular contendo altos níveis de PGF_{2 α} para a ampola da tuba uterina. Acredita-se que esses elevados níveis de PGF_{2 α} são necessários para melhorar a captação dos oócitos pelas fímbrias da tuba uterina (LEMAIRE; MARSH, 1975). Estudos evidenciam que a

PGF_{2α} parece regular o Ca²⁺ citosólico por meio do controle da liberação deste cátion das reservas intracelulares (VILLALÓN; HINDS; VERDUGO, 1989) que por sua vez está ativamente envolvido na modulação da FBC (GIRARD; KENNEDY, 1986). O Ca²⁺ é necessário para a motilidade ciliar tal como demonstrado por estudos que observaram cessação dos movimentos ciliares, na ausência de Ca²⁺ (VERDUGO, 1980). Desta forma, supõe-se que o aumento da PGF_{2α} no fluido folicular antes da ovulação é pré-requisito para induzir contrações da parede tubárica (LEMAIRE; MARSH, 1975).

Os níveis de PGs na tuba uterina são cerca de duas vezes maiores durante a fase folicular do que a fase lútea do ciclo menstrual (NIEDER; AUGUSTIN, 1986). MCCOMB; MOON (1985) verificaram que os níveis de PGE₂ e PGF_{2α} aumentaram significativamente nas fímbrias da tuba uterina de coelhas pouco antes da ovulação. As maiores amplitude e frequência da contratilidade da tuba uterina foram observadas durante o período periovulatório (RUCKEBUSCH; BAYARD, 1975; BENNETT et al., 1988). Além disso, foram encontradas concentrações mais elevadas de receptores de PGF_{2α} nas células epiteliais da tuba uterina durante o estro (ORLICKY; WILLIAMS-SKIPP, 1993). As prostaglandinas facilitam o transporte do oócito ou do zigoto através da tuba uterina por meio da estimulação dos músculos lisos e células epiteliais ciliadas da tuba uterina (HARPER, 1988). Todas essas evidências implicam em um papel importante das PGs na captação dos oócitos (MAŁYSZ-CYMBORSKA et al., 2013).

Diante do exposto, neste projeto de pesquisa é proposto o estudo de novas estratégias para aperfeiçoar o emprego da biotecnologia de SOV e TE em bubalinos. Na atualidade, o setor produtivo da bubalinocultura não dispõe dessa importante ferramenta para multiplicação de fêmeas com elevado mérito genético. Diversos estudos apontam que a baixa taxa de recuperação de embriões é fator limitante para o sucesso da SOV em bubalinos. Neste projeto busca-se avaliar diferentes tratamentos que podem contribuir significativamente para o aumento da produção de embriões em búfalas superovuladas, refletindo na aplicabilidade dessa biotecnologia com impacto positivo no melhoramento genético, no manejo reprodutivo e na produtividade dos rebanhos bubalinos.

CAPÍTULO 1

*Manutenção do dispositivo intravaginal de
progesterona durante o período periovulatório em
búfalas superovuladas*

EXPERIMENTO 1 - MANUTENÇÃO DO DISPOSITIVO INTRAVAGINAL DE PROGESTERONA DURANTE O PERÍODO PERIOVULATÓRIO EM BÚFALAS SUPEROVULADAS

1 JUSTIFICATIVA

O experimento foi conduzido para verificar a hipótese de que a manutenção do dispositivo de P4 durante o período periovulatório, diminui as concentrações circulantes de E2 e a proporção E2/P4 e, conseqüentemente, reduz a contratilidade do sistema genital, facilita a captação dos oócitos pelas fímbrias da tuba uterina e aumenta a recuperação de estruturas embrionária em búfalas superovuladas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS E LOCAL DO EXPERIMENTO

Este experimento foi conduzido na Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Registro (Polo Regional do Vale do Ribeira – Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios), localizada no estado de São Paulo, Brasil, durante a estação reprodutiva favorável (outono e inverno). Foram utilizadas 16 fêmeas bubalinas (*Bubalus bubalis*) da raça Murrah, com idade de $7,44 \pm 1,24$ anos (média $\pm$ erro padrão), apresentando escore de condição corporal (ECC) de $3,81 \pm 0,11$ (escala de 1 a 5, na qual 1 = muito magra e 5 = muito gorda). As búfalas tinham em média $3,69 \pm 1,12$ partos e período pós-parto superior a 45 dias. Todas as doadoras estavam ciclando, o que foi verificado pela presença de CL no início do tratamento (D0), avaliado por exame ultrassonográfico. Os animais foram mantidos sob as mesmas condições de ambiente e alimentação, em sistema de pastejo rotacionado de *Brachiaria brizantha*, com livre acesso à água, e suplementação mineral *ad libitum* em cocho coberto.

2.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os animais foram divididos aleatoriamente em 2 grupos: controle (G-C) e tratamento com progesterona durante o período periovulatório (G-P4), em delineamento experimental *cross over* totalizando duas réplicas (16 observações em cada grupo). A emergência da onda de crescimento folicular foi sincronizada com a inserção de dispositivo intravaginal de progesterona (Sincrogest[®], Ourofino Agronegócio, Brasil) e a aplicação de 2mg de Benzoato de Estradiol por via intramuscular (Sincrodiol[®], Ourofino Agronegócio; i.m.) em estágio aleatório do ciclo estral (Dia 0 = D0; período da manhã). A partir do dia 4 (D4; período da manhã), todas as búfalas receberam 200 mg de FSH i.m. (Foltropin-V[®], Bioniche Animal Health, Canadá) em intervalos de 12 em 12 horas, totalizando 8 aplicações de doses decrescentes (Quadro 1).

Quadro 1 – Protocolo para superestimulação do crescimento folicular em doadoras bubalinas, com aplicação de 200 mg de FSH.

Dia do protocolo	Manhã (7:00 horas)	Tarde (19:00 horas)
D4	20% da dose total de FSH	20% da dose total de FSH
D5	15% da dose total de FSH	15% da dose total de FSH
D6	10% da dose total de FSH	10% da dose total de FSH
D7	5% da dose total de FSH	5% da dose total de FSH

No D6 (período da tarde) e no D7 (período da manhã), todas as búfalas receberam uma dose luteolítica de um análogo de prostaglandina i.m. ($\text{PGF}_{2\alpha}$; 0,53mg de Cloprostenol sódico, Sincrocio[®], Ourofino Agronegócio). O dispositivo intravaginal de P4 foi removido no D7 (período da tarde) do G-C e no D10 do G-P4 (o dispositivo de P4 foi mantido até 48 horas após a aplicação do indutor da ovulação; D10 - período da tarde). No D8 (período da tarde) todas as búfalas receberam 25 mg de LH i.m. (Lutropin[®], Bioniche Animal Health), para a indução e sincronização das múltiplas ovulações. As inseminações artificiais foram realizadas 12 e 24 horas após o tratamento com LH (Figura 2). As inseminações foram realizadas pelo mesmo técnico com sêmen proveniente do mesmo touro da raça Murrah (Hangar da Ingaí MU 1378, CEBRAN) e mesma partida (38).

Figura 2 - Representação esquemática do protocolo de superovulação, dos exames ultrassonográficos e das colheitas de sangue.

US – Avaliações ultrassonográficas (Mindray[®] DP 2200 VET, Shenzhen, China).

BE – Benzoato de Estradiol (Sincrodiol[®], Ourofino Agronegócio, Brasil).

P4 – Dispositivo Intravaginal de Progesterona (Sincrogest[®], Ourofino Agronegócio, Brasil).

$\text{PGF}_{2\alpha}$ – Cloprostenol sódico (Sincrocio[®], Ourofino Agronegócio, Brasil).

FSH – Hormônio Folículo Estimulante (Folltropin-V[®], Bioniche, Canadá).

LH – Hormônio Luteinizante (Lutropin[®], Bioniche, Canadá).

No D14 (período da tarde) foi realizada a lavagem dos sistemas genitais das búfalas com 1.000 ml de solução de Ringer Lactato adicionada de 2% de Holding (Nutricell, Nutrientes Celulares). As estruturas embrionárias recuperadas foram quantificadas e classificadas de acordo com os padrões de morfologia estrutural da IETS (STRINGFELLOW; SEIDEL, 1998). No mesmo dia, as búfalas receberam a aplicação de 0,53 mg de $\text{PGF}_{2\alpha}$ i.m. (Cloprostenol sódico, Sincrocio[®], Ourofino Agronegócio). Vinte e um dias após a lavagem dos sistemas genitais foi reiniciado o tratamento, de modo que todas as búfalas receberam todos os tratamentos, respeitando-se o intervalo de 35 dias entre as colheitas das estruturas embrionárias.

2.3 AVALIAÇÕES ULTRASSONOGRÁFICAS

Foram realizados exames ultrassonográficos dos ovários (Mindray[®] DP 2200 VET, Shenzhen, China) com transdutor transretal linear de 7,5 MHz. Todas as búfalas foram examinadas no D0 para verificar a atividade ovariana (presença de CL), no D4 para verificar o número de folículos recrutados na emergência folicular (≥ 3 mm), no D8 (período da tarde) para verificar a resposta superestimulatória (número de folículos ≥ 8 mm) e no D14 para checar a resposta superovulatória (número de CLs). A ovulação foi considerada quando um folículo ≥ 8 mm previamente observado, não estivesse mais presente e fosse detectada a presença de um corpo lúteo (cada corpo lúteo correspondeu a uma ovulação). Foram considerados animais que responderam à SOV, aqueles que possuíam mais de dois corpos lúteos no dia da avaliação da resposta ao tratamento superovulatório (D14).

2.4 COLHEITA DE SANGUE E ANÁLISE HORMONAL

Durante a avaliação da resposta folicular e luteínica ao protocolo de sincronização da ovulação, amostras de sangue foram colhidas a cada 12h, por punção da veia jugular nos dias 7, 8, 9, 10 e 11, para dosagem da P4 circulante.

As amostras de sangue foram colhidas em tubos a vácuo de 10 ml (Vacutainer[®], Becton-Dickinson e Company, EUA) sem anticoagulante. Durante as colheitas, o sangue foi

mantido em caixa de isopor com gelo e, então, conduzido ao laboratório. As amostras foram refrigeradas (4 °C) durante as primeiras 4 a 5 horas, e então centrifugadas (3000 g, Centrífuga Excelsa Baby[®], Fanem, Brasil) durante 20 minutos. O soro aliquotado foi acondicionado em tubos esterilizados (Tubos Eppendorf 3810X standard[®], Eppendorf, Alemanha) com identificação e em seguida, armazenado em freezer a -25 °C até o momento de análise das concentrações séricas de P4.

As concentrações séricas de P4 foram analisadas pela técnica de radioimunoensaio, utilizando kits comerciais DPC (Coat-a-Count, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA), por técnica previamente validada por Garbino et al. (2004). O coeficiente de variação entre as amostras (intra-ensaio) foi 2,6% e a sensibilidade do ensaio foi 0,006 ng/mL.

2.5 AVALIAÇÃO DAS TAXAS DE OVULAÇÃO, DE FOLÍCULOS ≥ 8 MM NO D14 E DE RECUPERAÇÃO DAS ESTRUTURAS EMBRIONÁRIAS

A taxa de ovulação foi calculada pelo número de corpos lúteos verificados no D14, dividido pelo número de folículos potencialmente ovulatórios (≥ 8 mm) detectados pela ultrassonografia no D8, e o valor obtido foi multiplicado por 100.

A taxa de folículos ≥ 8 mm no D14 foi calculada pelo número de folículos ≥ 8 mm verificados no D14, dividido pelo número de folículos potencialmente ovulatórios (≥ 8 mm) detectados pela ultrassonografia no D8, e o valor obtido foi multiplicado por 100.

A taxa de recuperação de estruturas embrionárias foi obtida pelo número de estruturas embrionárias (oócitos/embriões) recuperadas no D14, dividido pelo número de ovulações (corpos lúteos) detectadas ultrassonograficamente no D14, e o valor obtido foi multiplicado por 100.

A taxa de fecundação foi calculada pelo número de embriões viáveis e degenerados, divididos pelo número de estruturas totais recuperadas, e o valor obtido foi multiplicado por 100. A taxa de embriões viáveis foi obtida pelo número de embriões viáveis, dividido pelo número de estruturas totais recuperadas, e o valor obtido foi multiplicado por 100.

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com auxílio do software Statistical Analysis System for Windows SAS® (SAS, 2000). As variáveis contínuas foram avaliadas quanto à normalidade dos resíduos pelo procedimento UNIVARIATE e submetidas ao teste de Bartlett para analisar a homogeneidade das variâncias. Os dados que não atenderam as premissas da análise de variância foram transformados. A concentração de P4 foi analisada por medida repetida no tempo utilizando o procedimento MIXED do SAS. O modelo estatístico foi formado pelos tratamentos, tempo e interação tratamento/tempo. O efeito de vaca foi incluído no modelo como fator aleatório. A resposta superovulatória e a produção de embriões foram analisadas pelo procedimento GLIMMIX do SAS, assumindo a distribuição de Poisson. O modelo utilizado para análise foi efeito de tratamento, escore de condição corporal e interações. As variáveis de distribuição binomial foram analisadas pelo procedimento GLIMMIX do SAS. Diferenças com $P \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativas, e aquelas com $0,05 < P \leq 0,10$ foram consideradas como tendência. As variáveis contínuas foram expressas em média e erro padrão da média (média $\pm$ EPM) e a binomial em porcentagem.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 RESPOSTA FOLICULAR, TAXA DE OVULAÇÃO E DE RECUPERAÇÃO DE ESTRUTURAS EMBRIONÁRIAS E PERFIL DE LIBERAÇÃO DE PROGESTERONA

Ao final do tratamento superestimulatório (D8) os dois grupos experimentais apresentaram similares números de folículos ≥ 8 mm. Porém, foi verificada menor taxa de ovulação nos animais do G-P4 comparado ao G-C e não foram recuperadas estruturas embrionárias (oócitos/embriões) das búfalas superovuladas tratadas com progesterona durante o período periovulatório. Contrariamente, foram recuperadas estruturas embrionárias (oócitos/embriões) das doadoras do grupo controle. Consequentemente, não foram verificados embriões transferíveis e congeláveis (Figura 5) em búfalas tratadas com P4 no período periovulatório. Os resultados deste experimento estão sumarizados na Tabela 1.

Tabela 1 - Dinâmica folicular e total de estruturas embrionárias (oócitos/embriões) recuperadas de búfalas submetidas ao protocolo de superovulação, tratadas com dispositivo intravaginal de progesterona por 7 (G-C) ou 10 dias (G-P4)

	Tratamento		Valor de <i>P</i>
	G-C (n = 16)	G-P4 (n = 16)	
Número de folículos ≥ 3 mm no D4	25,9 $\pm$ 4,9	23,1 $\pm$ 4,0	0,30
Número de folículos ≥ 8 mm no D8	11,0 $\pm$ 2,7	12,1 $\pm$ 3,2	0,68
Taxa de ovulação (%)	71,5	13,5	0,002
Número de CLs no D14	8,0 $\pm$ 2,8	1,1 $\pm$ 0,3	0,04
Taxa de folículos ≥ 8 mm no D14 (%)	34,4	87,8	0,06
Número de folículos ≥ 8 mm no D14	3,6 $\pm$ 0,9	10,5 $\pm$ 3,0	0,11
Total de estruturas embrionárias	1,9 $\pm$ 0,7	0,0 $\pm$ 0,0	0,03
Transferíveis	1,6 $\pm$ 0,7	0,0 $\pm$ 0,0	0,04
Congeláveis	1,6 $\pm$ 0,7	0,0 $\pm$ 0,0	0,04
Número de oócitos	0,1 $\pm$ 0,1	0,0 $\pm$ 0,0	0,39
Número de degenerados	0,1 $\pm$ 0,1	0,0 $\pm$ 0,0	0,39
Taxa de recuperação de estruturas embrionárias (%)	24,1	0,0	0,02

A concentração sérica de progesterona aferida entre o D7 e o D11 foi maior nos animais do G-P4 ($1,87 \pm 0,13$) que nos do G-C ($0,48 \pm 0,10$; $P < 0,0001$; Figura 3). O perfil de liberação de progesterona (ng/mL) de búfalas submetidas ao protocolo de superovulação, tratadas com dispositivo intravaginal de progesterona por 7 (G-C) ou 10 dias (G-P4) e os efeitos de tratamento ($P = 0,001$), dia ($P < 0,001$) e interação entre tratamento e dia ($P < 0,001$) estão sumarizados na Figura 4.

Figura 3 – Concentração sérica total de progesterona (ng/mL) de búfalas superovuladas, tratadas com dispositivo intravaginal de progesterona por 7 (G-C) ou 10 dias (G-P4).

Figura 4 – Perfil de liberação de progesterona (ng/mL) de búfalas superovuladas (SOV), tratadas com dispositivo intravaginal de progesterona por 7 (G-C) ou 10 dias (G-P4). Efeitos de tratamento ($P = 0,001$), dia ($P < 0,001$) e interação entre tratamento e dia ($P < 0,001$).

Figura 5 – Número total de estruturas embrionárias, embriões transferíveis e congeláveis de búfalas superovuladas, tratadas com dispositivo intravaginal de progesterona por 7 (G-C) ou 10 dias (G-P4).

Possivelmente, existem múltiplos mecanismos fisiológicos que resultam na redução da fertilidade quando há elevação nas concentrações de progesterona próxima à inseminação artificial. A P4 pode alterar o transporte dos espermatozoides ou do oócito por meio da alteração da contratilidade uterina ou da tuba uterina, e desta forma, reduzir as taxas de fecundação (HUNTER, 2005). Além disso, a redução na espessura do endométrio provocada por ligeiras elevações na progesterona (SOUZA et al., 2011) pode ser um indício de outros efeitos da P4 no útero, que poderiam comprometer o desenvolvimento do embrião. Ainda, elevadas concentrações circulantes de progesterona próximas da IA têm demonstrado um efeito prejudicial na fertilidade de vacas leiteiras, porém, os mecanismos fisiológicos envolvidos neste processo não estão bem elucidados (WILTBank et al., 2011).

No presente estudo, foi verificado que as búfalas pertencentes ao G-P4 apresentaram menor número de corpos lúteos no D14 ($1,1 \pm 0,3$) quando comparadas às búfalas do G-C ($8,0 \pm 2,8$; $P = 0,04$ Figura 6). Concomitantemente, o número de folículos ≥ 8 mm no dia da lavagem uterina (D14) foi maior no G-P4 comparado ao G-C ($10,5 \pm 3,0$ vs. $3,6 \pm 0,9$; $P=0,11$; Figura 6). Gimenes et al. (2011) verificaram que a aquisição de capacidade ovulatória em búfalas ocorre quando o folículo dominante alcança o diâmetro de 8,5 mm. No presente estudo, apesar das búfalas apresentarem número similar de folículos ≥ 8 mm no momento da administração do LH em ambos os tratamentos, os animais superovulados submetidos às altas concentrações de P4 apresentaram baixa taxa de ovulação e, dessa forma, alta taxa de folículos ≥ 8 mm (Figura 7).

Figura 6 – Número de corpos lúteos (CLs) e de folículos (FOL) ≥ 8 mm aferidos no dia 14 (D14) em búfalas superovuladas, tratadas com dispositivo intravaginal de progesterona por 7 (G-C) ou 10 dias (G-P4).

Figura 7 – Taxas de ovulação (Ov), de folículos ≥ 8 mm (Fol ≥ 8 mm) e de recuperação de estruturas embrionárias (oócitos/embriões; Taxa Rec) de búfalas superovuladas, tratadas com dispositivo intravaginal de progesterona por 7 (G-C) ou 10 dias (G-P4).

Reporta-se efeito negativo da P4 sobre o E2. A P4 modula a ação do E2 pela rápida redução nas concentrações de receptores de estrógeno (EVANS et al., 1980) fazendo com que o tecido seja menos responsivo ao E2 (HENRICKS; HARRIS, 1978). Dentre os efeitos do E2, a P4 bloqueia a secreção de proteínas (BUHI et al., 1992) e a diferenciação celular epitelial na tuba uterina (KAMWANJA; HANSEN, 1993) que pode ser fundamental para o transporte de gametas. Ainda, o controle das concentrações de E2 é fundamental para estimulação da PG e Endotelina 1 (ET-1) nas células epiteliais da tuba uterina e o E2 proveniente dos folículos ovarianos pode ser importante para a contração da tuba uterina e transporte do gameta/zigoto durante o período periovulatório (WIJAYAGUNAWARDANE et al., 1999).

Búfalas expostas a altas concentrações de progesterona durante o período periovulatório apresentam menores concentrações de E2 neste período (BARUSELLI et al., 2002). Isto poderia influenciar negativamente a expressão de receptores de LH nos folículos, visto que há uma associação significativa entre a expressão de receptores de LH e o estradiol (JEPPESEN et al., 2012). Na presença de um corpo lúteo (CL) funcional ou de altas concentrações plasmáticas de progesterona, há decréscimo na frequência de pulsos de LH (ROBERSON et al., 1989). Consequentemente, o folículo dominante sofre atresia e ocorre falha na ovulação (GINTHER; KNOFF; KASTELIC, 1989; LUCY et al., 1992; STOCK; FORTUNE, 1993).

No presente estudo, após o tratamento superestimulatório com FSH, as doadoras do G-P4 foram expostas a altas concentrações circulantes de progesterona, que podem ter suscitado efeito negativo sobre os receptores e a pulsatilidade de LH e, com isso, provocado o início de um processo de atresia nos folículos superestimulados, o que culminou na redução da capacidade ovulatória dessas estruturas. Tais achados corroboram ao descrito por diversos autores (ADAMS; MATTERI; GINTHER, 1992; STOCK; FORTUNE, 1993; GINTHER et al., 2001) que reportaram que altas concentrações de progesterona reduziram a pulsatilidade e as concentrações circulantes de LH em bovinos.

Uma vez que o folículo dominante entra em processo de atresia, as suas propriedades são modificadas, dentre as quais é relatada a redução na expressão de mRNA para receptores de gonadotrofinas (XU et al., 1995) nas células da granulosa e da teca (IRELAND; ROCHE, 1983), o que impede a indução da ovulação. Os folículos que não ovulam após o tratamento superestimulatório com FSH podem não ter se desenvolvido normalmente ou não possuir receptores de LH (LHR) suficientes para serem ativados pelo pico pré-ovulatório de LH (XU et al., 1995; D'OCCHIO et al., 1997; LIU; SIROIS, 1998).

Além disso, o padrão de expressão das isoformas do receptor de LH (LHR) em folículos bovinos superestimulados permanece incompletamente caracterizado (BARROS et al., 2009). Foi reportada menor expressão de mRNA em LHR em folículos ovulatórios de animais superestimulados (>10 mm) quando comparado a folículos ovulatórios não-superestimulados, em vacas Nelore. Os autores sugerem que alterações nos protocolos de superestimulação que proporcionem um padrão mais fisiológico de expressão de LHR ou maior estimulação da expressão dos LHR durante o crescimento folicular final poderia beneficiar a maturação dos oócitos e do cumulus (que depende da sinalização de LHR em células da granulosa) e a resposta superovulatória (FERNANDES, 2008).

Pode-se sugerir também que no presente estudo, o tratamento que envolve a combinação da alta dose de P4 no período periovulatório associada à elevada concentração de E2 – mesmo que esse tenha sido reduzido, ainda pode ter permanecido em níveis consideráveis pela presença de vários folículos pré-ovulatórios e ainda, somado a possível sensibilidade das búfalas aos níveis do E2 – pode ter bloqueado as ovulações pelo mesmo princípio aplicado em contraceptivos. Os contraceptivos hormonais, em sua maioria compostos por E2 e P4 sintéticos, agem sobrepujando os hormônios que desencadeiam a ovulação. Estes anticoncepcionais têm a função de manter níveis constantes de P4 e E2, que inibem a secreção hipofisária de LH e FSH através de um mecanismo de “feedback” (ou retroalimentação), mantendo os folículos e oócitos “adormecidos” e impedindo a ovulação (THOMAS; JONES, 1979).

A baixa taxa de ovulação no grupo desafiado neste estudo comprometeu a avaliação dos possíveis efeitos das fases subsequentes (contratilidade da tuba uterina, captação dos oócitos e recuperação de estruturas embrionárias), e, portanto, o resultado final deste estudo. Desta forma, os resultados inconsistentes do experimento 1 levam a rejeição da hipótese inicial.

Não obstante, alguns fatores merecem ser ponderados. No que se refere à proporção E2/P4, relatos prévios demonstraram que a alta P4 diminuiu as concentrações de E2 em búfalas superovuladas (BARUSELLI et al., 2002). Porém, Nishimura et al., 2010 verificaram que os efeitos da P4 endógena não foram encontrados em cobaias tratadas com elevadas doses de E2, sugerindo que o E2 antagoniza os efeitos da P4 na FBC da fímbria (NISHIMURA et al., 2010). Adicionalmente, WIJAYAGUNAWARDANE et al. (1998) observaram maiores concentrações de E2 na tuba uterina ipsilateral ao folículo dominante de vacas Holandesas. Estes efeitos são verificados já que as concentrações dos hormônios ovarianos na mucosa da tuba uterina são mais elevadas do que aquelas verificadas na circulação sanguínea (BENDZ et al., 1982), visto

que a mucosa da tuba uterina é exposta diretamente ao fluido folicular e peritoneal, que contêm altas concentrações de esteroides ovarianos (LYONS; SARIDOGAN; DJAHANBAKHCH, 2006a; b).

A exemplo disto, os efeitos do tratamento agudo com E2 nas respostas vasomotoras são diferentes dos tratamentos crônicos, pois enquanto as concentrações plasmáticas necessárias para mediar os efeitos a longo prazo de E2 estão dentro do intervalo nanomolar, é dentro da gama micromolar que pode-se iniciar os efeitos agudos *in vitro* (ANDERSEN et al., 1999). Estas observações podem explicar porque uma dose elevada de E2 é necessária para alterar a FBC da fímbria durante o tratamento agudo com E2 (NISHIMURA et al., 2010). Esses resultados podem explicar e corroborar às premissas sobre alta sensibilidade de fêmeas bubalinas ao E2 quando submetidas ao protocolo de superovulação e sugerir que no presente estudo, mesmo que a P4 tenha diminuído essas concentrações, talvez não tenha sido suficiente para evitar os efeitos negativos das elevadas concentrações de E2 em búfalas superovuladas.

Estudos verificaram que a sinalização da P4 antagoniza ou interage com a sinalização do E2. Por exemplo, a retração induzida pelo E2, dos dendritos primários longos nos núcleos ventro-mediais e ventro-laterais do hipotálamo, foi revertida por meio do tratamento com P4 (GRIFFIN; FLANAGAN-CATO, 2008). Ainda, a P4 antagoniza a capacidade do E2 de conferir neuroproteção contra a toxicidade da N-metil-D-Aspartato (AGUIRRE; BAUDRY, 2009), parcialmente antagoniza a sinalização de E2 no crescimento de células do câncer de mama (SUKOCHEVA; YANG; GIERTHY, 2009) e a P4 e o E2 interagem na homeostase da glicose em ratos diabéticos (LIVINGSTONE; COLLISON, 2002). Estudos também demonstram que a P4 e o E2 também interagem na regulação da FBC na fímbria (NAKAHARI et al., 2011).

Tais evidências apontam que existem diversos fatores que ainda necessitam de estudos e por isso devem ser considerados. A progesterona tem sido apontada como reguladora da frequência dos batimentos ciliares na tuba uterina de diversas espécies de mamíferos (BLANDAU et al., 1975; MAHMOOD et al., 1998; LYONS et al., 2002; LYONS; SARIDOGAN; DJAHANBAKHCH, 2006b). A utilização de P4 exógena reduz em 40-50% a frequência dos batimentos ciliares 24 horas após sua aplicação em humanos. Este efeito da P4 pode ser revertido por meio da utilização de RU486, um antagonista do receptor de progesterona nuclear, sugerindo uma ação via receptor nuclear clássico (MAHMOOD et al., 1998). Wessel; Schuchter; Walt (2004), verificaram que a utilização de P4 reduziu em 11% a frequência dos batimentos ciliares no período de 15 minutos após a aplicação na tuba uterina de vacas. Além disso, esse efeito não foi revertido pela RU486, o que suporta a hipótese de

que existe envolvimento de outro receptor além do receptor de progesterona nuclear (WESSEL; SCHUCHTER; WALT, 2004).

Possíveis mediadores desses efeitos são os receptores de progesterona de membrana (mPR α , β e γ), inicialmente descritos por ZHU; BOND; THOMAS, 2003 e ZHU et al (2003). Sob estimulação da P4, os mPRs regulam a maturação do oócito (PACE; THOMAS, 2005; QIU et al., 2008), secreção de gonadotrofinas (SLEITER et al., 2009), controle das funções do miométrio (KARTERIS et al., 2006) e motilidade espermática (TUBBS; THOMAS, 2009) via interações com as proteínas-G (BYLANDER et al., 2010). Nas tuba uterinas de camundongos foi possível promover a expressão de ambos os receptores por meio da administração de P4 (NUTU et al., 2009).

No período imediato após a ovulação, há um grande aumento na frequência dos batimentos ciliares (FBC) da tuba uterina (CRITOPH; DENNIS, 1977). Estudos demonstram que o fluido folicular pré-ovulatório, obtido no momento da recuperação de oócitos de mulheres submetidas a tratamento de PIVE, provoca aumento significativo na FBC (LYONS; SARIDOGAN; DJAHANBAKHCH, 2006a). No entanto, estudos *in vitro* mostram que a alta dose de progesterona pode inibir a FBC (MAHMOOD et al., 1998; PALTIELI et al., 2000) e este efeito pode ser revertido por meio da utilização de mifepristona, um antagonista do receptor de progesterona (MAHMOOD et al., 1998). Consistentemente, estudos em cobaias mostraram aumento na FBC durante a fase lútea inicial, seguido por uma diminuição na fase lútea média, quando a concentração de progesterona é máxima. Subsequentemente, na fase lútea tardia e concomitante com a queda nos níveis de progesterona, a FBC eleva-se novamente aos níveis observados na fase folicular (NISHIMURA et al., 2010).

As reduções rápidas na FBC pelo efeito da progesterona sugerem que o transporte dos gametas pela tuba uterina podem ser mediados pela P4 via mecanismo de receptor não-genômico, possivelmente envolvendo os receptores de membrana de P4, repetindo-se em todas as espécies mamíferas (BYLANDER et al., 2010). Os receptores clássicos citoplasmáticos (BYLANDER et al., 2013), assim como os receptores gama de P4 ligados à membrana (NUTU et al., 2009) têm sido relacionados com a transdução dos sinais para as células ciliadas.

Nakahari et al. (2011) verificaram que o E2 antagoniza as sinalizações mediadas pela P4 e vice-versa, regulando a FBC nas células ciliares das fimbrias. Os sinais que são estimulados pelo receptor de um hormônio podem suprimir os sinais que são estimulados pelo receptor do outro hormônio. Ainda, os autores verificaram que na fase ovulatória, o E2 mantém a FBC por meio da inibição das ações da P4 e o inverso ocorre na fase luteínica. A

pausa transitória do embrião na junção ampola-istmo finaliza-se quando os efeitos da progesterona tornam-se máximos na fase luteal, resultante da “downregulation” dos receptores alfa adrenérgicos e relaxamento do tônus muscular ístmico (JANSEN, 1978). Portanto, a interação entre E2 e P4 desempenha um papel importante na manutenção da FBC e promove a saúde do sistema reprodutivo feminino (NAKAHARI et al., 2011).

Em estudo recente em bovinos, foi demonstrado por meio de microscopia eletrônica de transmissão e videomicroscopia, que a motilidade dos cílios da tuba uterina é rigorosamente alinhada. Os autores verificaram que o plano de batimento dos cílios é paralelo ao eixo longitudinal da tuba uterina e o 'curso efetivo' e transporte mucociliar são direcionados para o útero (SCHÄTZ et al., 2013). Carvalho (2006) avaliou o deslocamento de microesferas colocadas sobre a superfície luminal da tuba uterina e verificou que a direção dos movimentos ciliares das células endoteliais das tubas uterinas de fêmeas bubalinas e bovinas não é influenciada pela presença de 17 β -estradiol no meio de cultura.

Vários fatores hormonais e neuronais modulam a atividade ciliar, conforme demonstrado pelas variações da FBC na tuba uterina (EZZATI et al., 2014). A relevância dos cílios é tamanha, que na ausência de contratilidade muscular por meio da administração de isoproterenol na ampola da tuba uterina de ratos, o transporte do oócito e do COC pela tuba uterina não foi afetado, implicando que somente os movimentos ciliares são suficientes para o transporte do oócito (HALBERT et al., 1976).

No período imediato após a ovulação, há um grande aumento na FBC (CRITOPH; DENNIS, 1977). Isto tem sido atribuído aos efeitos da P4 em um ambiente rico em estrógeno (JANSEN, 1984). Esta observação é ainda suportada por estudos que demonstram que o fluido folicular pré-ovulatório, obtidos de mulheres submetidas a tratamento de FIV no momento da recuperação de oócitos, provoca aumento significativo na FBC (LYONS; SARIDOGAN; DJAHANBAKHCH, 2006a). No entanto, estudos *in vitro* demonstram que altas doses de progesterona podem inibir a FBC (MAHMOOD et al., 1998; PALTIELI et al., 2000). Este efeito pode ser revertido por meio da utilização de mifepristona, um antagonista do receptor de progesterona (MAHMOOD et al., 1998). No presente estudo, não foram verificados efeitos positivos da P4 na diminuição dos possíveis efeitos negativos do E2 sobre a captação e transporte de estruturas embrionárias de búfalas superovuladas. Sendo assim, fatores desconhecidos, que vão além da ação do E2 e P4 podem controlar a FBC da tuba uterina (NISHIMURA et al., 2010).

4 CONCLUSÃO

A hipótese inicial do presente estudo foi rejeitada e, portanto, conclui-se que:

- Búfalas tratadas com progesterona no período periovulatório apresentaram semelhantes respostas superestimulatórias, entretanto, houve redução na taxa de ovulação,
- Os animais tratados com progesterona apresentaram maiores concentrações plasmáticas de P4 durante o período periovulatório,
- O tratamento com P4 no período periovulatório não aumentou a recuperação de estruturas embrionárias de búfalas superovuladas.

CAPÍTULO 2

*Utilização de Prostaglandina $F_{2\alpha}$ durante o período
periovulatório em búfalas superovuladas*

EXPERIMENTO 1 - UTILIZAÇÃO DE PROSTAGLANDINA $F_{2\alpha}$ INJETÁVEL DURANTE O PERÍODO PERIOVULATÓRIO EM BÚFALAS SUPEROVULADAS

1 JUSTIFICATIVA

O presente experimento foi conduzido para verificar a hipótese de que a administração de sucessivas doses de $PGF_{2\alpha}$ durante o período periovulatório estimula a frequência do batimento ciliar e a atividade contrátil da musculatura lisa das tubas uterinas, e permite que as porções da fímbria deste órgão sejam ativadas para captar os oócitos facilitando o transporte destas estruturas pela tuba uterina, promovendo aumento na recuperação de estruturas embrionárias em búfalas superovuladas.

O experimento 1 foi conduzido na forma de um projeto piloto, no qual foi administrada $PGF_{2\alpha}$ somente na forma injetável, para avaliação da eficácia deste tratamento.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS E LOCAL DO EXPERIMENTO

O experimento 1 deste capítulo foi conduzido na Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Registro (Polo Regional do Vale do Ribeira – Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios), localizada no estado de São Paulo, Brasil, durante a estação reprodutiva favorável (outono e inverno). Foram utilizadas 22 fêmeas bubalinas (*Bubalus bubalis*) da raça Murrah, com idade de $7,00 \pm 0,68$ anos, apresentando ECC de $3,71 \pm 0,09$, número de partos igual a $3,07 \pm 0,49$ e período pós-parto superior a 45 dias. Todas as doadoras estavam ciclando, o que foi verificado pela presença de CL no início do tratamento (D0), avaliado por exame ultrassonográfico. Os animais foram mantidos sob as mesmas condições de ambiente e alimentação, em sistema de pastejo rotacionado de *Brachiaria brizantha*, com livre acesso à água, e suplementação mineral *ad libitum* em cocho coberto.

2.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os animais foram divididos aleatoriamente em 2 grupos: controle (G-C; n=22) e tratamento com PGF_{2α} durante o período periovulatório (G-PGF; n=22) em delineamento experimental *cross over* (todos os animais receberam os dois tratamentos). O G-C foi submetido ao protocolo de superovulação descrito para seu grupo similar no capítulo 1. No G-PGF todas as búfalas receberam protocolo de superovulação semelhante ao G-C e, adicionalmente, receberam quatro doses de PGF_{2α} i.m. (0,53 mg de Cloprostenol sódico, Sincrocio®, Ourofino Agronegócio) do D8 (tarde) ao D10 (manhã) em intervalos de 12 horas (Figura 8). As inseminações foram realizadas pelo mesmo técnico, com sêmen proveniente do mesmo touro da raça Murrah (Hangar da Ingaí MU 1378, CEBRAN) e mesma partida (38).

Figura 8 - Representação esquemática do protocolo de superovulação e dos exames ultrassonográficos.

US – Avaliações ultrassonográficas (Mindray® DP 2200 VET, Shenzhen, China).

BE – Benzoato de Estradiol (Sincrodiol®, Ourofino Agronegócio, Brasil).

P4 – Dispositivo Intravaginal de Progesterona (Sincrogest®, Ourofino Agronegócio, Brasil).

PGF_{2α} – Cloprostenol sódico (Sincrocio®, Ourofino Agronegócio, Brasil).

FSH – Hormônio Folículo Estimulante (Folltropin-V®, Bioniche, Canadá).

GnRH – Hormônio liberador de Gonadotrofinas (Sincroforte®, Ourofino Agronegócio, Brasil).

Os procedimentos de colheita das estruturas embrionárias, avaliações ultrassonográficas e análise estatística foram semelhantes aos descritos nos respectivos itens do experimento 1, capítulo 1.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 RESPOSTA FOLICULAR, TAXA DE OVULAÇÃO E RECUPERAÇÃO DE ESTRUTURAS EMBRIONÁRIAS

Ao final do tratamento superestimulatório (D8), os dois grupos experimentais apresentaram similares números de folículos ≥ 8 mm. Não foram verificadas diferenças nas taxas de ovulação e de folículos ≥ 8 mm no D14 nos grupos G-PGF e G-C (Figura 9). Os resultados do Experimento 1, Capítulo 2, estão sumarizados na tabela 2.

Tabela 2 - Dinâmica folicular e total de estruturas embrionárias (oócitos/embriões) recuperadas de búfalas superovuladas tratadas (G-PGF) ou não (G-C) com prostaglandina $F_{2\alpha}$ injetável no período periovulatório

	Tratamento		Valor de <i>P</i>
	G-C (n = 22)	G-PGF (n = 22)	
Número de folículos ≥ 3 mm no D4	27,9 $\pm$ 2,4	26,2 $\pm$ 2,2	0,56
Número de folículos ≥ 8 mm no D8	17,1 $\pm$ 2,0	18,3 $\pm$ 2,9	0,75
Taxa de ovulação (%)	68,5	73,9	0,30
Número de CLs no D14	11,4 $\pm$ 1,6	13,3 $\pm$ 2,2	0,23
Taxa de folículos ≥ 8 mm no D14 (%)	34,8	26,3	0,23
Número de folículos ≥ 8 mm no D14	5,3 $\pm$ 0,9	4,1 $\pm$ 0,8	0,17
Total de estruturas embrionárias	2,3 $\pm$ 0,5	3,6 $\pm$ 0,6	0,02
Transferíveis	1,8 $\pm$ 0,5	2,8 $\pm$ 0,5	0,04
Congeláveis	1,8 $\pm$ 0,5	2,7 $\pm$ 0,5	0,07
Número de oócitos	0,0 $\pm$ 0,0	0,4 $\pm$ 0,2	0,04
Número de degenerados	0,4 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,1	0,28
Taxa de recuperação de estruturas embrionárias (%)	14,7	29,5	0,08
Taxa de Fecundação (%)	100,0	88,1	0,08
Taxa de Embriões Viáveis (%)	80,0	76,2	0,67

O número de estruturas embrionárias totais (oócitos/embriões) foi maior em búfalas superovuladas tratadas com $\text{PGF}_{2\alpha}$ durante o período periovulatório quando comparado aos animais não tratados neste período (Figura 11). Os resultados do presente estudo podem ser explicados por relatos prévios, que verificaram que o aumento da $\text{PGF}_{2\alpha}$ no fluido folicular antes da ovulação é um requisito para induzir contrações da parede folicular, que em seguida se rompe, expelindo o oócito e o fluido folicular contendo concentrações elevadas de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (LEMAIRE; MARSH, 1975). Acredita-se que estas concentrações elevadas de $\text{PGF}_{2\alpha}$ no fluido folicular são necessárias para melhorar a captação do oócito pelas fímbrias da tuba uterina, uma vez que inversamente, o tratamento com indometacina (inibidor da síntese de PG) inibe a ovulação e captação de estruturas (AINSWORTH et al., 1979).

Além dos efeitos discrepantes da progesterona e do estrógeno no controle da FBC na fase secretora, também podem ser mencionados os efeitos estimulantes dominantes de outros constituintes do fluido folicular como prostaglandinas (EZZATI et al., 2014). A observação desses autores corrobora à sequência dos experimentos realizados nesta tese, visto que se iniciou com a avaliação dos efeitos da P4 seguida então pela avaliação do possível efeito de outra molécula na tuba uterina, a $\text{PGF}_{2\alpha}$.

As prostaglandinas são mediadores locais importantes para as funções da tuba uterina e estão envolvidas nos processos de ovulação e fecundação, bem como no transporte do oócito e do embrião (MALYSZ-CYMBORSKA et al., 2013). A $\text{PGF}_{2\alpha}$ reestimula os tecidos da tuba uterina a iniciarem a atividade de contração da musculatura lisa, o que permite que as porções da fímbria da tuba uterina sejam ativadas para captar os oócitos (OSADA et al., 1999).

Além disso, foi verificado que a camada externa linear e a camada interna anular dos músculos lisos da tuba uterina contêm receptores tanto α quanto β , cuja sensibilidade é afetada ciclicamente pela influência de substâncias endócrinas. Estes receptores são altamente responsivos aos esteroides sexuais (PAUERSTEIN et al., 1974) e as prostaglandinas estão intimamente envolvidas no controle rítmico das contrações e relaxamento da tuba uterina, necessário para o transporte do oócito (HORTON; MAIN; THOMPSON, 1965; HODGSON, 1976; RAJKUMAR; GARG; SHARMA, 1979; RIEHL; HARPER, 1981). Neste contexto, pode-se ainda sugerir que no presente estudo, a atividade da tuba uterina (tanto a FBC quanto a atividade muscular) pode ter sido potencializada por meio da associação de elevadas concentrações de E2, provenientes do tratamento superestimulatório, e os efeitos da PGF injetável. A FBC é alta no dia da ovulação em função do E2, o que beneficia a captação e o transporte do oócito para a junção ampola-istmo, onde ocorre a fecundação (NISHIMURA et

al., 2010). Adicionalmente, as prostaglandinas encontram-se dentre os constituintes do fluido da tuba uterina, e desempenham papel importante na modulação da atividade contrátil da miosalpinge. Este hormônio facilita a captação do oócito e o transporte do embrião (STERIN-SPEZIALE et al., 1978; MORIKAWA et al., 1980; GARDNER et al., 1996).

Figura 9 - Taxas de ovulação, de folículos ≥ 8 mm e de recuperação de estruturas embrionárias (oócitos/embriões) de búfalas superovuladas tratadas (G-PGF) ou não (G-C) com prostaglandina $F_{2\alpha}$ injetável no período periovulatório.

Figura 10 – Número total de estruturas embrionárias, embriões transferíveis e congeláveis de búfalas superovuladas tratadas (G-PGF) ou não (G-C) com prostaglandina $F_{2\alpha}$ injetável no período periovulatório.

Figura 11 – Dispersão da taxa de recuperação de estruturas embrionárias (oócitos/embriões) de búfalas superovuladas tratadas (G-PGF) ou não (G-C) com prostaglandina $F_{2\alpha}$ injetável no período periovulatório.

No presente estudo, foi verificado aumento no número de embriões transferíveis em búfalas tratadas com $\text{PGF}_{2\alpha}$. Ainda, houve tendência de aumento no número de embriões congeláveis (Figura 10), na taxa de recuperação de estruturas embrionárias (Figura 9) e na taxa de fecundação (Figura 11) no G-PGF comparado ao G-C, respectivamente. Esses achados corroboram aos de outros autores, que verificaram que a $\text{PGF}_{2\alpha}$ provoca aumento da atividade contrátil da tuba uterina, e a administração subsequente de $\text{PGF}_{2\alpha}$ reestimula os tecidos da tuba uterina a se contraírem e, portanto, permite que as porções da fímbria deste órgão captem ativamente os oócitos (OSADA et al., 1999).

A $\text{PGF}_{2\alpha}$ aumenta a contratilidade da musculatura lisa da tuba uterina, resultando no aumento da velocidade do transporte embrionário (LINDBLOM; HAMBERGER; WIQVIST, 1978; WEBER et al., 1991; KISSLER et al., 2004). Além disso, Osada et al. (1999) afirmam que as altas concentrações de $\text{PGF}_{2\alpha}$ observadas no fluido folicular apresentam papel importante na indução do transporte dos oócitos do folículo em colapso para a ampola (local da fecundação), de onde, posteriormente, o embrião segue pela tuba uterina, até finalmente chegar à cavidade uterina para nidação e desenvolvimento. Ainda, as prostaglandinas estão presentes nas paredes da tuba uterina, onde realizam as contrações musculares e transporte do oócito. Foi demonstrado que as prostaglandinas $\text{F}_{2\alpha}$, E1 e E2 podem estimular as culturas ciliares de ativas do epitélio ciliado da tuba uterina de coelhos, sendo, portanto, uma alternativa para explicar o efeito das prostaglandinas no transporte de oócitos pela tuba uterina (VERDUGO; RUMERY; TAM, 1980).

Pesquisadores relatam que as células epiteliais ciliadas da tuba uterina de coelhas proporcionam um modelo excelente para o estudo da ligação estímulo-resposta, visto que são conhecidas por reagirem aos transmissores hormonais e químicos, incluindo as prostaglandinas, agonistas β -adrenérgicos e ATP (VERDUGO; RUMERY; TAM, 1980; VILLALON; VERDUGO, 1982; VILLALÓN; HINDS; VERDUGO, 1989). Estudos prévios demonstraram que tanto a $\text{PGF}_{2\alpha}$ quanto a PGE_2 aumentam a FBC na região da fímbria da tuba uterina de coelhas (VERDUGO; RUMERY; TAM, 1980). Relatos adicionais postulam que esse efeito é devido ao aumento nas concentrações de cálcio intracelular (VERDUGO, 1980). Em culturas primárias de células ciliadas da tuba uterina de coelhos, a estimulação da atividade ciliar produzida por concentrações micromolares de adenosina trifosfato (ATP) e $\text{PGF}_{2\alpha}$ foi associada ao aumento transitório de Ca^{2+} intracelular. Foram sugeridos dois diferentes mecanismos cálcio-dependentes para a estimulação da ligação/ativação no epitélio ciliar: 1) ATP agindo via receptor purinérgico ligado ao influxo de Ca^{2+} através da

membrana e 2) $\text{PGF}_{2\alpha}$ agindo via liberação do receptor-mediador do sequestro intracelular de Ca^{2+} (VILLALÓN; HINDS; VERDUGO, 1989).

Em células ciliadas, manipulações experimentais intracelulares e extracelulares de Ca^{2+} podem produzir mudanças no movimento ciliar e flagelado de diversas espécies, desde protozoários a vertebrados (NAITOH; KANEKO, 1973; MURAKAMI; TAKAHASHI, 1975; SATIR, 1975; LEE; VERDUGO, 1976; LEE et al., 1976; VERDUGO; RUMERY; LEE, 1977; BROKAW, 1979; ECKERT; BREHM, 1979; GIBBONS; GIBBONS, 1980; VERDUGO, 1980; TAMM; TAMM, 1981; TASH; MEANS, 1982; HARD; RIEDER, 1983; STOMMEL; STEPHENS, 1985). Prostaglandinas em concentrações normalmente encontradas na tuba uterina podem fortemente estimular a atividade das células ciliadas neste órgão (VERDUGO; RUMERY; TAM, 1980) e evidências indiretas sugerem que sua ação pode estar ligada à liberação intracelular de Ca^{2+} (VERDUGO, 1980), que por sua vez está ativamente envolvida na modulação da FBC (GIRARD; KENNEDY, 1986).

4 CONCLUSÃO

Os resultados deste projeto piloto foram indicativos de que o tratamento com $\text{PGF}_{2\alpha}$ injetável pode aumentar a produção de embriões em búfalas submetidas ao protocolo de SOV.

Baseados nessas evidências, foi formulada a hipótese de que o tratamento com $\text{PGF}_{2\alpha}$ poderia ser utilizado para aumentar a taxa de recuperação de estruturas embrionárias em búfalas e contornar os baixos resultados na SOV reportados nesta espécie. Os resultados obtidos no experimento 1 deram suporte para a condução do experimento 2.

EXPERIMENTO 2 - UTILIZAÇÃO DE PROSTAGLANDINA $F_{2\alpha}$ EM DISPOSITIVO DE LIBERAÇÃO LENTA (BOMBA OSMÓTICA) DURANTE O PERÍODO PERIOVULATÓRIO EM BÚFALAS SUPEROVULADAS

1 JUSTIFICATIVA

O presente estudo foi delineado devido aos resultados promissores obtidos no experimento 1 deste capítulo (projeto piloto). Nesse segundo experimento, um terceiro grupo foi introduzido para avaliar o efeito da liberação constante de $PGF_{2\alpha}$ no período periovulatório por meio do dispositivo de liberação lenta (bomba osmótica) na recuperação de estruturas embrionárias em búfalas superovuladas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS E LOCAL DO EXPERIMENTO

O experimento 2 foi conduzido na Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Registro (Polo Regional do Vale do Ribeira – Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios), localizada no estado de São Paulo, Brasil, durante a estação reprodutiva favorável (outono e inverno). Foram utilizadas 22 fêmeas bubalinas (*Bubalus bubalis*) da raça Murrah, com idade de $8,52 \pm 2,19$, apresentando ECC de $3,71 \pm 0,24$, número de partos igual a $4,43 \pm 1,77$ e período pós-parto superior a 45 dias. Todas as doadoras estavam ciclando, o que foi verificado pela presença de CL no início do tratamento (D0), avaliado por exame ultrassonográfico. Os animais foram mantidos sob as mesmas condições de ambiente e alimentação, em sistema de pastejo rotacionado de *Brachiaria brizantha*, com livre acesso à água, e suplementação mineral *ad libitum* em cocho coberto.

2.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos experimentais: Grupo Controle (G-C; n = 22), Grupo PGF injetável (G-PGF-INJ; n = 22) e Grupo PGF em Bomba Osmótica (G-PGF-BO; n = 22) em delineamento experimental *cross over*. O G-C e o G-PGF-INJ foram submetidos aos protocolos de superovulação descritos para seus grupos similares no experimento 1, deste capítulo. No G-PGF-BO, as doadoras foram submetidas ao protocolo de superovulação semelhante ao G-C. Adicionalmente, todas as búfalas receberam a partir do D8 (tarde), a inserção subcutânea de uma mini-bomba osmótica (dispositivo de liberação lenta contendo 2,12 mg de Cloprostenol sódico, Sincrocio[®], Ourofino Agronegócio), mantida até o D10 (tarde; Figura 11), quando foi removida. No experimento 2, as inseminações foram realizadas pelo mesmo técnico, com sêmen proveniente do mesmo touro da raça Murrah (Bretão da Ingaí, Lagoa da Serra) e mesma partida (18.04.05).

Figura 12 - Representação esquemática do protocolo de superovulação e dos exames ultrassonográficos.

US – Avaliações ultrassonográficas (Mindray® DP 2200 VET, Shenzhen, China).

BE – Benzoato de Estradiol (Sincrodiol®, Ourofino Agronegócio, Brasil).

P4 – Dispositivo Intravaginal de Progesterona (Sincrogest®, Ourofino Agronegócio, Brasil).

PGF_{2α} – Cloprostenol sódico (Sincrocio®, Ourofino Agronegócio, Brasil).

FSH – Hormônio Folículo Estimulante (Folltropin-V®, Bioniche, Canadá).

GnRH – Hormônio liberador de Gonadotrofinas (Sincroforte®, Ourofino Agronegócio, Brasil).

BO – Bomba osmótica (2,12 mg de PGF_{2α})

Os procedimentos de colheita das estruturas embrionárias, avaliações ultrassonográficas, e análise estatística foram semelhantes aos descritos nos respectivos itens do experimento 1 deste capítulo.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 RESPOSTA FOLICULAR, TAXA DE OVULAÇÃO E RECUPERAÇÃO DE ESTRUTURAS EMBRIONÁRIAS

No total, 4 animais foram excluídos da análise estatística por não responderem ao tratamento de superovulação (menos de dois corpos lúteos ao final do tratamento). No D8, os três grupos experimentais apresentaram similares números de folículos ≥ 8 mm.

Foram verificadas diferenças nas taxas de ovulação entre os grupos avaliados (Figura 12) e tendência para as taxas de folículos ≥ 8 mm no D14. Porém, as taxas de recuperação de estruturas embrionárias foram semelhantes entre os grupos. Além disso, foram verificadas diferenças nas taxas de fecundação e de embriões viáveis. Os resultados do experimento 2 estão sumarizados na Tabela 3.

Tabela 3 - Dinâmica folicular e total de estruturas embrionárias (oócitos/embriões) recuperadas de búfalas superovuladas tratadas (G-PGF-INJ ou G-PGF-BO) ou não (G-C) com prostaglandina $F_{2\alpha}$ no período periovulatório

	Tratamento			Valor de P
	G-C (n = 18)	G-PGF-INJ (n = 18)	G-PGF-BO (n = 18)	
Número de folículos ≥ 3 mm no D4	26,1 $\pm$ 3,1	28,8 $\pm$ 3,8	27,4 $\pm$ 3,0	0,22
Número de folículos ≥ 8 mm no D8	15,3 $\pm$ 3,1	13,7 $\pm$ 2,8	13,6 $\pm$ 2,3	0,66
Taxa de ovulação (%)	67,8 ^{ab}	71,2 ^a	61,6 ^b	0,04
Número de CLs no D14	10,4 $\pm$ 1,9	9,7 $\pm$ 2,1	8,4 $\pm$ 1,3	0,37
Número de folículos ≥ 8 mm no D14	4,7 $\pm$ 1,4	3,4 $\pm$ 0,7	4,6 $\pm$ 1,1	0,10
Taxa de folículos ≥ 8 mm no D14 (%)	30,8	24,6	33,9	0,08
Total de estruturas embrionárias	2,1 $\pm$ 0,8	2,1 $\pm$ 0,6	1,4 $\pm$ 0,4	0,58
Transferíveis	1,1 $\pm$ 0,5	1,7 $\pm$ 0,5	1,2 $\pm$ 0,4	0,35
Congeláveis	1,1 $\pm$ 0,5	1,6 $\pm$ 0,5	1,1 $\pm$ 0,4	0,44
Número de oócitos	0,8 $\pm$ 0,7	0,3 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,1	0,48
Número de degenerados	0,2 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,1	0,0 $\pm$ 0,0	0,47
Taxa de recuperação de estruturas embrionárias (%)	20,3	21,1	16,6	0,93
Taxa de Fecundação (%)	63,2 ^b	84,6 ^a	88,0 ^a	0,04
Taxa de Embriões Viáveis (%)	52,6 ^b	82,0 ^a	88,0 ^a	0,008

Figura 13 – Taxas de ovulação, de folículos persistentes e de recuperação de estruturas embrionárias (oócitos/embriões) obtidas de búfalas superovuladas tratadas (G-PGF-INJ ou G-PGF-BO) ou não (G-C) com prostaglandina $F_{2\alpha}$ no período periovulatório.

Não foi verificada diferença no número de estruturas embrionárias totais (oócitos/embriões) independentemente do grupo experimental (Figura 13). De forma semelhante, no presente estudo não foi verificado aumento no número de embriões transferíveis e congeláveis entre os tratamentos.

Figura 14 – Número total de estruturas embrionárias, embriões transferíveis e congeláveis obtidos de búfalas superovuladas tratadas (G-PGF-INJ ou G-PGF-BO) ou não (G-C) com prostaglandina $F_{2\alpha}$ no período periovulatório.

Os tratamentos propostos à base de $PGF_{2\alpha}$ no período periovulatório não foram eficientes em aumentar a produção de embriões em búfalas superovuladas. Portanto, no presente estudo, a hipótese inicial não foi confirmada. Em contraste com o experimento 1 deste capítulo, os resultados insatisfatórios obtidos no experimento 2 são indicativos de que existem diversos outros mecanismos, além da ação da prostaglandina, envolvidos no processo de ovulação e captação de oócitos, que podem influenciar e/ou alterar as sequências de eventos que ocorrem neste momento. Além disso, mesmo que não tenha sido verificada diferença na produção de embriões entre os tratamentos, cogita-se que pode ter ocorrido falha no funcionamento da bomba osmótica utilizada neste experimento.

Entretanto, destaca-se aumento nas taxas de fecundação e de embriões viáveis quando o tratamento com $PGF_{2\alpha}$ foi realizado no período periovulatório em búfalas superovuladas. Esses dados são indicativos de que, mesmo sem efeito positivo na taxa de recuperação, o tratamento com $PGF_{2\alpha}$ pode estar melhorando o transporte de gametas e o ambiente uterino, aumentando a fecundação e a viabilidade embrionária. Existem trabalhos na literatura que demonstram efeito negativo das concentrações plasmáticas de P4 no momento da IA na taxa de concepção (WILTBANK et al., 2011). Vacas com elevada concentração de P4 apresentam

menor taxa de concepção quando comparadas às vacas com reduzida concentração de P4 no momento da IA. No presente estudo, o tratamento com múltiplas doses de PGF_{2α} no período periovulatório pode ter reduzido as concentrações de P4 no momento das IAs, justificando os efeitos positivos nas taxas de fecundação e de embriões viáveis.

Durante o estro, observa-se maior concentração de receptores de PGF_{2α} nas células epiteliais ciliadas da tuba uterina (ORLICKY; WILLIAMS-SKIPP, 1993). A produção local de prostaglandinas e a atividade da fosfolipase A2 são mais elevadas neste período (MORISHITA et al., 1993). Ainda durante esse período, o E2 está correlacionado com a ativação da prostaglandina sintetase, o que resulta em elevada produção de PGF_{2α} pelo útero (WLODAWER; KINDAHL; HAMBERG, 1976). As prostaglandinas facilitam o transporte do oócito e do zigoto através da tuba uterina por estimulação dos músculos lisos e das células epiteliais ciliadas da tuba uterina (MORISHITA et al., 1993). No entanto, as ações positivas da PGF_{2α} não foram verificadas no presente estudo.

Hormônios ovarianos, como P4, ocitocina e E2 e, hormônios da tuba uterina como PGE₂, PGF_{2α} e ET-1, podem controlar sinergicamente as contrações da tuba uterina para promover de forma eficiente o transporte de embriões durante o período periovulatório em fêmeas bovinas (WIJAYAGUNAWARDANE et al., 1998). No mesmo sentido, a composição do fluido da tuba uterina em bubalinos é afetada pelas alterações hormonais que ocorrem durante o ciclo estral, aumentando na fase do estro para alcançar volumes máximos na ovulação (VECCHIO et al., 2010). Em búfalas superovuladas, é possível que a interação desses fatores deva ser mais bem controlada para garantir uma produção satisfatória de embriões em tratamentos de superovulação.

Frente aos resultados deste estudo, novamente retorna-se a problemática da produção insatisfatória de embriões em búfalas, resultando na baixa eficiência dos programas de SOV nesta espécie. De forma semelhante, diversas variáveis restringem o sucesso da SOV em bovinos de leite e reduzem a previsibilidade do número de embriões transferíveis (SINGH et al., 2004). A variabilidade na resposta ovariana está relacionada com fatores como a preparação das gonadotrofinas a serem administradas, a partida e a dose total de sêmen a ser utilizado, a duração e o momento do tratamento e a utilização de diferentes esquemas hormonais na SOV (MAPLETOFT; BENNETT STEWARD; ADAMS, 2002). Além disso, fatores como o status ovariano e o número de folículos pequenos no momento da SOV (CUSHMAN et al., 1999), presença ou ausência de folículo dominante (KIM et al., 2001), histórico reprodutivo, estado nutricional (SANTOS; CERRI; SARTORI, 2008) e repetidas SOV (BÉNYEI et al., 2004), também foram relatados como fontes importantes de variação na

resposta superovulatória e número de embriões transferíveis (RASOLOMBOAHANGINJATOVO et al., 2014).

Ao mesmo tempo, tem sido reconhecido que as manipulações farmacológicas do ciclo estral, com exceção dos efeitos desejados, podem também levar a alguns distúrbios indesejáveis na regulação em longo prazo do trato reprodutivo feminino (MAŁYSZ-CYMBORSKA et al., 2013). Sabe-se que a $\text{PGF}_{2\alpha}$ auxilia no transporte do oócito e do zigoto na tuba uterina pela estimulação da camada muscular e das células epiteliais ciliadas (HARPER, 1988). Durante a ovulação, os níveis de $\text{PGF}_{2\alpha}$ aumentam na tuba uterina para acelerar o transporte dos gametas (SPILMAN; HARPER, 1975), enquanto que após a ovulação, o aumento da P4 causa redução dos níveis de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e aumento da PGE_2 , que causa relaxamento da musculatura da tuba uterina para permitir o transporte do embrião para o útero (SAKSENA; HARPER, 1975; BODKHE; HARPER, 1979). Porém, em tratamentos superovulatórios, a síntese e atividade da PGF e PGE podem ser alteradas, demonstrando efeito negativo da SOV.

Nesse sentido, foi investigada a influência dos protocolos de superovulação na síntese de prostaglandinas na tuba uterina de marrãs. Demonstrou-se aumento significativo nos níveis de RNAm e proteína associados a PGFs na tuba uterina de marrãs superovuladas quando comparado às fêmeas sem estimulação hormonal. Além da rota direta de síntese, a $\text{PGF}_{2\alpha}$ também pode ser produzida pela conversão da PGE_2 via CBR1. Foi verificado que o nível de expressão da proteína CBR1 aumentou significativamente no istmo de marrãs superovuladas e esta pode ser uma das razões para aumento nos níveis de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e diminuição dos níveis de PGE_2 que resultam em menor proporção $\text{PGE}_2/\text{PGF}_{2\alpha}$ na tuba uterina de fêmeas superovuladas. Deste modo, os autores propõem que a menor proporção $\text{PGE}_2/\text{PGF}_{2\alpha}$ após o tratamento superovulatório foi a razão para o transporte anormal de embriões para o útero (MAŁYSZ-CYMBORSKA et al., 2013). Portanto, foi concluído que essas mudanças podem afetar a fecundação, o transporte de gametas e o desenvolvimento embrionário e, em consequência, influenciar negativamente no número de descendentes produzidos (MAŁYSZ-CYMBORSKA et al., 2013).

Durante o período periovulatório, o pico preovulatório de LH em conjunto com concentrações localmente elevadas de E2 provenientes do folículo ovulatório e P4 em concentrações basais pela regressão do CL, induzem efeito estimulatório máximo na produção de PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$ e ET-1 na tuba uterina (WIJAYAGUNAWARDANE; MIYAMOTO; SATO, 1999). Ainda, existem evidências de que a P4 efetivamente suprime a PGF, enquanto o E2 estimula a produção de PGF em níveis elevados (SAKSENA; HARPER, 1975).

O controle na proporção desses agentes/substâncias é importante quando se faz aplicação de biotecnologias, como a SOV e a PIVE. Isso fica evidenciado nos resultados do presente estudo, bem como devem ser levados em conta em futuros estudos com SOV em búfalas, onde esse controle deve estar bem definido para garantir a obtenção de resultados satisfatórios. Além disso, existem indícios de que algumas terapias atualmente utilizadas na espécie bovina devem ser adaptadas para aplicação em bubalinos. Na PIVE, por exemplo, alguns estudos verificaram a necessidade de mudanças nos meios laboratoriais, devido às diferenças espécie-específicas verificadas na composição do fluido folicular de búfalas. Dentre elas, a redução das concentrações de proteína nos meios de FIV e CIV, redução da glicose durante o CIV e ajuste das concentrações de cálcio e potássio no meio FIV para alcançar as proporções $K^+ : Na^+$ e $Ca^{++} : Mg^{++}$ similares às encontradas no fluido da tuba uterina de búfalas (VECCHIO et al., 2010).

No presente estudo, a rejeição da hipótese deste trabalho pode estar associada a uma gama de fatores relacionados a mecanismos ainda não elucidados da fisiologia da reprodução bubalina que podem estar associados ao controle do processo da atividade da tuba uterina. A ET-1 está associada à regulação da contração na tuba uterina (WIJAYAGUNAWARDANE et al., 2001; PRIYADARSANA; WIJAYAGUNAWARDANE; MIYAMOTO, 2004). Juntamente com a ET-1, demonstrou-se que a VEGF estimula a biossíntese e liberação de PGE_2 e $PGF_{2\alpha}$ na tuba uterina bovina (WIJAYAGUNAWARDANE et al., 2005), indicando a participação das mesmas na contração da tuba uterina. As prostaglandinas da série E são conhecidas por causar relaxamento da musculatura (SIEMIENIUCH et al., 2009) por meio da ação da PGE_2 nos seus receptores EP2 e EP4 presentes na tuba uterina bovina (NARUMIYA; SUGIMOTO; USHIKUBI, 1999). Ainda, a Ang II está positivamente relacionada com a contração muscular da tuba uterina bovina (WIJAYAGUNAWARDANE et al., 2001; WIJAYAGUNAWARDANE, MISSAKA et al., 2003; WIJAYAGUNAWARDANE; BANDARA; MIYAMOTO, 2004). Esses fatores também podem estar correlacionados ou terem alguma influência sobre a tuba uterina de fêmeas bubalinas, principalmente quando submetidas a protocolos de SOV, podendo comprometer o controle da atividade da tuba uterina.

Estudo recente em vacas Nelore, avaliou o efeito do protocolo de superovulação na expressão de RNAm dos principais genes envolvidos no transporte de gametas na tuba uterina bovina. Os autores verificaram expressão de transcritos que codificam componentes de todas estas vias supracitadas e ausência de alterações no RNAm de ET-1, ECE, FCEV, Flt1 e Flk1 nas tubas uterinas de vacas submetidas aos protocolos de superestimulação ovariana,

sugerindo funcionamento normal dos processos controlados por estes fatores na fisiologia da tuba uterina bovina. Porém, apesar de hormônios exógenos não alterarem os principais peptídeos envolvidos na contração da tuba uterina, a superestimulação ovariana por FSH+eCG provocou efeito mais diferencial na expressão gênica da tuba uterina pela regulação da transcrição de receptores de PGES e Ang II em vacas Nelore (FONTES et al., 2014).

Diversos estudos demonstram que a PGF e a PGE presentes na fímbria da tuba uterina desempenham um papel importante no processo de captação e transporte do oócito (SAKSENA; HARPER, 1975; RAJKUMAR; GARG; SHARMA, 1979; MCCOMB; MOON, 1985). As falhas de captação do oócito podem ser consideradas como uma importante causa de infertilidade (AHMAD-THABET, 2000). As prostaglandinas estão diretamente envolvidas na contração da tuba uterina, agindo sobre os músculos lisos da tuba uterina. Na tuba uterina, a contratilidade da musculatura lisa é aumentada pela $PGF_{2\alpha}$ e diminuída pela PGE_2 (HARPER, 1988). As PGFs produzem as contrações espasmódicas da região ístmica, enquanto as PGEs suprimem as contrações espontâneas. A PGE_2 via ligação com um dos quatro receptores de PGE_2 regula a secreção de fluidos na tuba uterina, sua composição e a fecundação do oócito. Além disso, juntamente com a PGI_2 , a PGE_2 é responsável pelo relaxamento da musculatura da tuba uterina para transporte do embrião para o útero (SENIOR et al., 1993; NEGISHI; SUGIMOTO; ICHIKAWA, 1995; GAUVREAU et al., 2010). Deste modo, os efeitos das prostaglandinas das séries E e F são mutuamente antagonistas, uma vez que a PGF supera o efeito supressivo da PGE e esta por sua vez suprime o aumento na atividade tubária provocado pela PGF, dependendo da fase do ciclo estral, promovendo o controle do transporte dos gametas (SPILMAN; HARPER, 1973).

Conforme mencionado, o tratamento superovulatório em bovinos levou a uma *upregulation* do RNAm do EP2 na ampola e do EP4 no infundíbulo, bem como uma tendência no aumento dos níveis do RNAm do EP2 no infundíbulo. Sugerindo *upregulation* do mRNA dos receptores de PGE_2 na tuba uterina de vacas Nelore superovuladas, podendo levar a redução da contratilidade da musculatura da tuba uterina. Porém, também foi verificado que o aumento da expressão da AGTR2, que por sua vez pode aumentar a atividade da Ang II, aumentando a contração muscular da tuba uterina e facilitando o transporte dos espermatozoides para o local de fecundação. Portanto, os autores evidenciam que mais estudos são necessários para o completo entendimento desses efeitos (FONTES et al., 2014).

Durante o processo de ovulação, o pico de LH induz a expressão de diversos genes ovarianos e ainda desencadeia mudanças morfológicas e fisiológicas nos folículos pré-ovulatórios, culminando na ovulação (RICHARDS, 2005). Dentre estas, o fator de

crescimento epidermal (EGF) e a síntese de prostaglandina desempenham papel importante neste processo. A síntese de prostaglandina é regulada por duas isoformas de enzimas: as cicloxigenases 1 e 2 (COX-1 e COX-2; SMITH; DEWITT; GARAVITO, 2000). A COX-1 é expressa constitutivamente na maioria dos tecidos, e os seus níveis de expressão não têm grande variação. Por outro lado, a COX-2 representa a isoforma induzível, indetectável na maioria dos tecidos em condições normais, porém é induzida pelo estímulo de vários tecido-dependentes. No ovário, esse processo é rapidamente induzido pelo pico de LH nas células da granulosa, especialmente nas células do cumulus (JOYCE et al., 2001; SIROIS et al., 2004) e é essencial para a ovulação via síntese de prostaglandina E2 (PGE2) e seu subtipo de receptor EP2/EP4 (LIM et al., 1997; SIROIS et al., 2004). Camundongos knock out para COX-2 e o gene para EP2 são infértéis devido a severos prejuízos causados à expansão do cumulus (LIM et al., 1997; DAVIS et al., 1999; HIZAKI et al., 1999). Além disso, em outro estudo foi reportado que alguns andrógenos ativos, incluindo a 11- ketotestosterone (11-KT) são fortemente induzidos pelo estímulo da gonadotrofina coriônica humana (hCG) nos ovários de camundongos (YAZAWA et al., 2008). Ainda, a COX-2 e os genes da amfiregulina (AREG; fator de crescimento semelhante à EGF) são alvos diretos da via andrógeno/receptores de andrógeno nas células da granulosa no período periovulatório, o que indica que o pico de LH está envolvido no processo ovulatório via COX-2 e a expressão de AREG (YAZAWA et al., 2013).

4 CONCLUSÃO

Os resultados verificados no presente estudo são indicativos de que o tratamento intramuscular e a utilização de bomba osmótica como mecanismo de liberação constante de $\text{PGF}_{2\alpha}$ não foram eficientes em melhorar a produção de embriões de búfalas superovuladas.

Ainda, não foi verificado aumento na taxa de recuperação de estruturas embrionárias em búfalas submetidas ao tratamento com $\text{PGF}_{2\alpha}$ seja por via injetável ou por mecanismo de liberação lenta. Os resultados deste estudo rejeitam a hipótese inicial e demonstram que a administração de $\text{PGF}_{2\alpha}$ durante o período periovulatório não foi eficiente em melhorar as taxas de produção de embriões em búfalas submetidas ao protocolo de SOV.

5 DISCUSSÃO GERAL

A tuba uterina é um órgão dinâmico que facilita a função dos gametas, fecundação e desenvolvimento embrionário (KILLIAN, 2004). Nele, fatores endócrinos e parácrinos induzem alterações morfológicas, bioquímicas e fisiológicas no infundíbulo, ampola e istmo para fornecer um microambiente ideal para o transporte de oócitos e maturação, capacitação espermática e transporte, fecundação e desenvolvimento embrionário inicial. Portanto, a organização temporal e espacial de cada um desses eventos é fundamental para a eficiência reprodutiva (RUCKEBUSCH; BAYARD, 1975; WIJAYAGUNAWARDANE et al., 2001). Pode-se aludir que em búfalas, diversas outras moléculas estão envolvidas neste processo e podem estar influenciando a atividade da tuba uterina e consequentemente comprometendo a captação das estruturas em protocolos de SOV. Além dos processos relacionados à P4 e à PGF_{2α} isoladamente, outros fatores devem ser considerados. Killian (2004) afirma que frente a todo papel desempenhado pela tuba uterina, o quadro que emerge é de que alguns dos componentes do meio da tuba uterina possuem funções sobrepostas, que coletivamente proporcionam um sistema à prova de falhas para assegurar a fertilidade *in vivo*, de modo que o sucesso não é dependente de um único componente.

A contração do músculo liso, o fluxo de secreções da tuba uterina e batimento ciliar do epitélio da tuba uterina são responsáveis pelo transporte de gametas e embriões (JANSEN, 1984; LYONS; SARIDOGAN; DJAHANBAKHCH, 2006a). Sabe-se que alguns peptídeos são responsáveis por orquestrar esses processos, incluindo os fatores de crescimento endotelial vascular (VEGF; GABLER et al., 1999; WIJAYAGUNAWARDANE et al., 2005), prostaglandinas (PGs, BRIDGES; FORTUNE, 2007; GABLER et al., 2008), ET-1 (PRIYADARSANA; WIJAYAGUNAWARDANE; MIYAMOTO, 2004; BRIDGES; CHO; KO, 2011) e Ang II (WIJAYAGUNAWARDANE et al., 2001; WIJAYAGUNAWARDANE et al., 2009). As PGs aumentam a contratilidade dos músculos lisos na tuba uterina bovina (LINDBLOM; HAMBERGER; WIKVIST, 1978; WEBER et al., 1991) e estimulam os batimentos ciliares na tuba uterina humana (LYONS; SARIDOGAN; DJAHANBAKHCH, 2006b), e a liberação de PG é estimulada pela VEGF (WIJAYAGUNAWARDANE et al., 2005), ET-1 (WIJAYAGUNAWARDANE et al., 2001; PRIYADARSANA; WIJAYAGUNAWARDANE; MIYAMOTO, 2004) e Ang II (WIJAYAGUNAWARDANE et al., 2001) na tuba uterina bovina (FONTES et al., 2014).

Foram encontradas evidências que o VEGF estimula diretamente a biossíntese e liberação de PGE_2 , $PGF_{2\alpha}$, e ET-1 na tuba uterina bovina. O pico pré ovulatório de LH, juntamente com o aumento da secreção de E2 pelo folículo ovulatório, e as concentrações basais de P4 em função do CL em regressão, regulam positivamente o sistema VEGF, induzindo a produção máxima na tuba uterina de substâncias responsáveis pela contração e relaxamento deste órgão, para o transporte e fertilização dos gametas. Além disso, o efeito estimulatório do VEGF sobre a liberação de PG e ET-1 é intensificada na presença de LH, E2 e P4. Isto implica a possível ação cooperativa do VEGF com o LH e esteroides ovarianos na liberação de PGE_2 , $PGF_{2\alpha}$ e ET-1, sugerindo fortemente a presença de sistema VEGF ativo na tuba uterina bovina durante o período periovulatório (WIJAYAGUNAWARDANE et al., 2005).

Estudos prévios demonstraram que a Ang II pode estimular a FBC, efeito este que pode ser bloqueado pelo losartan, um antagonista do receptor da Ang II (SARIDOGAN et al., 1996). Na tuba uterina de vacas, o sistema Ang II é ativo durante o período periovulatório e estimula a liberação de PGE_2 , $PGF_{2\alpha}$ e ET-1 (WIJAYAGUNAWARDANE et al., 2001). Portanto, a Ang II pode interagir com o VEGF na tuba uterina durante este período e aumenta a liberação de outras substâncias relacionadas à contração, além de sua ação direta sobre a contração e relaxamento da tuba uterina (WIJAYAGUNAWARDANE et al., 2005). Outros estudos demonstraram que outros mediadores, como o Fator de ativação plaquetária (PAF) podem exercer efeito estimulatório da FBC por meio do aumento da PGE_2 (HERMOSO et al., 2001). Adicionalmente, a ET-1 é produzida pelas células epiteliais da tuba uterina bovina e está envolvida na contratilidade da parede muscular deste órgão (ROSSELLI et al., 1994). Em fêmeas bubalinas todos esses fatores podem estar influenciando nas respostas negativas da SOV. Portanto, o controle e entendimento dessas variáveis pode melhorar a produção de embriões em búfalas, que tem apresentado resultados inconsistentes com a utilização de programas de SOV (CARVALHO et al., 2002; MISRA; TYAGI, 2007; NEGLIA et al., 2010).

Novas biotecnologias da reprodução, com eficiência comprovada, já estão disponíveis como ferramenta de produção de descendentes. Dentre elas, pode-se mencionar a PIVE, cuja eficiência aumentou consideravelmente ao longo dos anos, levando a maiores taxas de produção de blastocistos (NEGLIA et al., 2003; GASPARRINI et al., 2006; GASPARRINI et al., 2014) e produção de descendentes em bubalinos (GALLI et al., 2001; HUFANA-DURAN et al., 2004; NEGLIA et al., 2004; SALIBA et al., 2011). Embora exista disponibilidade de

outras biotecnologias para a produção de embriões, não se pode consentir de forma absoluta que a tecnologia de SOV não funciona/não pode ser utilizada em bubalinos.

A compreensão ainda parcial dos processos que ocorrem na tuba uterina e suas implicações na SOV denotam a importância de estudos nesta área ainda desconhecida em vários aspectos e, portanto, não dominada. Os resultados do presente estudo levam a considerar / despertam a necessidade de se conhecer de forma mais aprofundada a função da tuba uterina em fêmeas bubalinas e suas implicações na utilização de biotecnologias como a SOV nesta espécie. Uma recente revisão corrobora à esta premissa, afirmando que ao longo dos últimos anos, com a introdução de técnicas reprodutivas assistidas, como a PIVE, o papel da tuba uterina tem sido subestimado, sendo representado como uma estrutura anatômica ignorada (EZZATI et al., 2014). Portanto, ignorar esta tecnologia pelo fato de ainda não alcançar êxito em elucidar os mecanismos que estão envolvidos na baixa taxa de recuperação de estruturas embrionárias em búfalas submetidas à SOV, pode implicar na permanência da falta de entendimento dos mecanismos envolvidos na fisiologia reprodutiva da fêmea bubalina.

Búfalas submetidas à SOV apresentam resposta satisfatória ao tratamento de superestimulação do crescimento folicular e ovulação, não possuem alteração dos movimentos ciliares endoteliais da tuba uterina sob altas concentrações de E2 e não possuem alterações na morfometria do sistema genital que impedem a recuperação dos oócitos (CARVALHO, 2006). Desta forma, mantém-se ainda fulgente a existência de uma lacuna não esclarecida entre a ovulação e a captação dos oócitos em programas de SOV. Portanto, existe uma falha em um passo fundamental no protocolo de SOV, que é a captação dos oócitos pela tuba uterina. As terapias adotadas no presente estudo não foram eficientes em contornar esta problemática, fazendo-se ainda necessário estudar os fatores que implicam na interferência das funções da tuba uterina em búfalas superovuladas, no intuito do aprimoramento desta técnica e pela relevância do conhecimento da fisiologia nesta espécie.

Em protocolos de superovulação vários folículos são estimulados à ovulação, e para que o sucesso seja estabelecido após essa etapa, é necessário que as fímbrias da tuba uterina estejam ativas para captação dos oócitos e, por conseguinte, permitir que estes sejam fecundados na tuba uterina. Portanto, esta estrutura possui papel fundamental para que se obtenha satisfatória taxa de produção de embriões.

No presente estudo, as concentrações de P4 bem como as doses de PGF apesar de terem sido aquelas usualmente aplicadas em protocolos de sincronização, talvez não tenham sido suficientes para induzir o efeito desejado seja pela utilização de dispositivo intravaginal,

administração intramuscular ou por meio da utilização de um mecanismo de liberação lenta, via subcutânea. Devido à presença de um sistema de troca de contra-corrente entre a vascularização do ovário e da tuba uterina, a tuba uterina é exposta a concentrações muito mais elevadas de esteroides ovarianos, em comparação com a circulação sistêmica (BENDZ et al., 1982). Além disso, após a ruptura do folículo ovulatório e ovulação, o fluido folicular, que é rico em esteroides ovarianos e outras substâncias bioativas, entram em contato direto com o epitélio da tuba uterina (EZZATI et al., 2014).

Análises da composição de secreções da tuba uterina de ovelhas, coelhas, humanas, macacas, babuínas, suínas e bovinas (MASTROIANNI; URZUA; STAMBAUGH, 1970; FEIGELSON; KAY, 1972; BRACKETT; MASTROIANNI, 1974; FAZLEABAS; VERHAGE, 1986; VERHAGE; FAZLEABAS; DONNELLY, 1988; GANDOLFI et al., 1989; KILLIAN et al., 1989; EHRENWALD; FOOTE; PARKS, 1990; NANCARROW; HILL, 1995; BUHI; ALVAREZ; KOUBA, 2000) indicam que o fluido da tuba uterina é bioquimicamente complexo e que proteínas constituem um dos principais componentes das secreções da tuba uterina (KILLIAN, 2004).

Embora a maioria das proteínas no fluido da tuba uterina sejam encontradas em outros tecidos, um grupo de glicoproteínas específicas do oviduto (GEO) ou "ovidutinas" tem sido descrito em ovelhas (SUTTON et al., 1984; SUTTON; NANCARROW; WALLACE, 1986), vacas (BOICE et al., 1990; GERENA; KILLIAN, 1990), babuínas (FAZLEABAS; VERHAGE, 1986; VERHAGE; FAZLEABAS, 1988), hamsters (ROBITAILLE et al., 1988), humanas (VERHAGE; FAZLEABAS; DONNELLY, 1988), porcas (BUHI et al., 1990), coelhas (HYDE; BLACK, 1986; ERICKSON-LAWRENCE et al., 1989), ratas (KAPUR; JOHNSON, 1985; KAPUR; JOHNSON, 1988) e éguas (WILLIS et al., 1994). A produção máxima de GEO ocorre durante os ciclos estrais ou menstruais quando o estrógeno no plasma é dominante, durante o período periovulatório. Considerando a variedade de proteínas detectadas e seus potenciais papéis em modificar ou regular a função celular, tem sido observado que as secreções da tuba uterina influenciam os acontecimentos que cercam a fecundação e desenvolvimento embrionário (KILLIAN, 2004).

As GEO têm seus níveis mais elevados observados na fase periovulatória. Utilizando radiomarcador L- [35S] metionina e [3H] glucosamina, foram identificadas e isoladas duas proteínas, denominadas Proteína Epitelial tubária1 e 2 (TEP-1 e TEP-2) que foram produzidas exclusivamente com trompas de mulheres na pré-menopausa e estavam ausentes nas secreções similares de mulheres na pós-menopausa (MAGUINESS et al., 1993a,b). Embora a função biológica destas proteínas não esteja bem estabelecida, foi sugerido que a sua

produção e secreção são aumentadas em resposta à estimulação estrogênica (ABE; SATOH; HOSHI, 1998). No meio do ciclo, após a ruptura folicular e ovulação, o fluido folicular torna-se o principal componente do fluido tubário imediatamente após a ovulação. Além dos efeitos moduladores que o fluido folicular exerce sobre a FBC e contratilidade muscular tubária, o simples fluxo de fluido folicular no lúmen tubário pode ajudar na captação do oócito e no processo de transporte (DJAHANBAHKCH; EZZATI; SARIDOGAN, 2010).

Além disso, foi demonstrado que as proteínas do fluido da tuba uterina influenciam as funções dos espermatozoides, oócitos e embriões (GANDOLFI et al., 1991; MCNUTT et al., 1992; RODRÍGUEZ; KILLIAN, 1998; STAROS; KILLIAN, 1998). Embora as evidências apresentadas na literatura ratifiquem que as secreções da tuba uterina têm a capacidade de afetar a fisiologia do gameta e embrião, os mecanismos pelos quais estes efeitos são implementados permanecem bastante indefinidos (KILLIAN, 2004). No presente estudo, a utilização de P4 e PGF no período periovulatório podem não terem sido eficientes em promover atividade da tuba uterina de captação e transporte de estruturas embrionárias. Em fêmeas bubalinas, as GEO também podem ter influência sobre a funcionalidade da tuba uterina. No período periovulatório, no qual os experimentos do presente estudo foram conduzidos, ocorrem diversos processos que podem afetar a recuperação dos oócitos e consequentemente, a produção de embriões.

No que concerne as GEO, foi verificado que o ambiente da tuba uterina contém osteopontina (GABLER; CHAPMAN; KILLIAN, 2003), uma glicoproteína encontrada em muitos tecidos, conhecida por estar envolvida na adesão e sinalização celular pela ligação a integrinas através da sua sequência de aminoácidos RGD. A osteopontina é sintetizada pelo epitélio da tuba uterina e está presente no fluido da tuba uterina (GABLER; CHAPMAN; KILLIAN, 2003). Taxas de ligação espermática, fertilização e desenvolvimento embrionário foram significativamente maiores quando oócitos foram pré-incubados com fluido da tuba uterina antes da fertilização *in vitro*, quando comparado ao fluido da tuba uterina pré-incubado com anticorpo para osteopontina (GONCALVES; WAY; KILLIAN, 2001; KILLIAN; GONCALVES, 2002; WAY; GONCALVES; KILLIAN, 2002). Ainda, o pré-tratamento de oócitos bovinos com osteopontina purificada de leite bovino resultou em maiores taxas de produção de embriões (GONCALVES; CHAPMAN; KILLIAN, 2003). Assim com as GEO, a osteopontina parece ter múltiplas funções benéficas na fisiologia da tuba uterina (RITTLING et al., 1998).

Portanto, o fluido da tuba uterina é bioquimicamente complexo e contém diversos componentes capazes de influenciar a função e sinalização celular. Estudos são necessários

para identificar os componentes do fluido da tuba uterina que se associam com os gametas e embriões que podem ser merecedores de estudos funcionais. Futuros estudos direcionados para avaliação da função de componentes específicos do fluido da tuba uterina irão definir melhor a sua contribuição para as múltiplas funções do meio da tuba uterina (KILLIAN, 2004).

6 CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo não confirmam as hipóteses propostas e permitem concluir que:

- A manutenção do dispositivo intravaginal de progesterona ou a aplicação/liberação de constantes doses de $\text{PGF}_{2\alpha}$ durante o período periovulatório não foram eficientes em aumentar a recuperação de estruturas embrionárias de búfalas superovuladas.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E IMPLICAÇÕES PRÁTICAS

Apesar de ter sido verificado aumento significativo na produção de embriões no experimento 1, capítulo 2, esse mesmo efeito não foi confirmado no experimento 2 do mesmo capítulo. A produção de embriões do experimento 1, mesmo significativamente maior, ainda representa baixa produção de estruturas embrionárias por doadora, quando comparada à produção em bovinos, mostrando baixa eficiência na aplicação prática dessa biotecnologia na espécie bubalina. O tratamento com progesterona durante o período periovulatório também não aumentou a produção de embriões por búfala superovulada.

Vale ressaltar que os resultados obtidos nesse estudo ainda estão aquém de uma produção eficientemente desejável. Tais resultados justificam a necessidade de mais estudos visando compreender melhor os mecanismos de falha de captação de estruturas embrionárias em bubalinos para tentar viabilizar o emprego dessa tecnologia comercialmente. Os protocolos de superovulação e de transferência de embriões possuem custo elevado, por isso devem apresentar eficiência satisfatória que justifiquem sua utilização em larga escala em programas de melhoramento genético.

Os resultados do presente experimento confirmam que a técnica de SOV em bubalinos continua apresentando resultados insatisfatórios, atestando vários estudos apresentados na literatura por diversos grupos de pesquisa. Esses resultados questionam a aplicação prática dessa tecnologia em fazendas comerciais. Entretanto, na atualidade, dados promissores estão sendo alcançados com a OPU-PIVE, técnica que está apresentando resultados satisfatórios na multiplicação de material genético superior de origem materna em bubalinos.

REFERÊNCIAS

ABE, H.; SATOH, T.; HOSHI, H. Primary modulation by oestradiol of the production of an oviduct-specific glycoprotein by the epithelial cells in the oviduct of newborn golden hamsters. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 112, n. 1, p. 157-163, 1998.

ADAMS, G. P.; MATTERI, R. L.; GINTHER, O. J. Effect of progesterone on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating follicle-stimulating hormone in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 96, n. 2, p. 627-640, 1992.

ADAMS, G. P. Control of ovarian follicular wave dynamics in cattle: implications for synchronization and superstimulation. **Theriogenology**, v. 41, p. 19-24, 1994.

AGUIRRE, C. C.; BAUDRY, M. Progesterone reverses 17 β -estradiol-mediated neuroprotection and BDNF induction in cultured hippocampal slices. **European Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 3, p. 447-454, 2009.

AHMAD-THABET, S. M. The fimbrio-ovarian relation and its role on ovum picking in unexplained infertility: the fimbrio-ovarian accessibility tests. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, v. 26, n. 1, p. 65-70, 2000.

AINSWORTH, L.; TSANG, B. K.; DOWNEY, B. R.; BAKER, R. D.; MARCUS, G. J.; ARMSTRONG, D. T. Effects of Indomethacin on Ovulation and Luteal Function in Gilts. **Biology of Reproduction**, v. 21, n. 2, p. 401-411, 1979.

ALI, A.; ABDEL-RAZEK, A. K.; ABDEL-GHAFFAR, S.; GLATZEL, P. S. Ovarian Follicular Dynamics in Buffalo Cows (*Bubalus bubalis*). **Reproduction in Domestic Animals**, v. 38, n. 3, p. 214-218, 2003.

ALVAREZ, R. H.; NOGUEIRA, J. R.; MEIRELLES, C. F.; BARUSELLI, P. S. Blood progesterone concentration and ovarian response of Mediterranean buffalo cows superovulated with PMSG or HMG. **Buffalo Bulletin**, v. 13, p. 64-67, 1994.

AMBROSE, D. J.; SINGLA, S. K.; JAILKHANI, S.; PRAKASH, B. S.; MADAN, M. L. Superovulation response in buffaloes (*Bubalus bubalis*) to different treatment regimens of Folltropin. **Theriogenology**, v.35, p. 181, 1991.

AMSO, N. N.; CROW, J.; LEWIN, J.; SHAW, R. W. Physiology: A comparative morphological and ultrastructural study of endometrial gland and Fallopian tube epithelia at different stages of the menstrual cycle and the menopause. **Human Reproduction**, v. 9, n. 12, p. 2234-2241, 1994.

ANDERSEN, H. L.; WEIS, J. U.; FJALLAND, B.; KORSGAARD, N. Effect of acute and long-term treatment with 17- β -estradiol on the vasomotor responses in the rat aorta. **British Journal of Pharmacology**, v. 126, n. 1, p. 159-168, 1999.

BARROS, C. M.; ERENO, R. L.; SIMÕES, R. A. L.; FERNANDES, P.; BURATINI, J.; NOGUEIRA, M. F. G. Use of knowledge regarding LH receptors to improve superstimulatory treatments in cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 22, n. 1, p. 132-137, 2009.

BARTOLOMEU, A. J.; REI, M.; DEL MADUREIRA, E. H.; SOUZA, A. J.; SILVA, A. O.; BARUSELLI, P. S. Timed insemination using synchronization of ovulation in buffaloes using CIDR-B, CRESTAR and Ovsynch. **Animal Breeding**, v. 70, p.332, 2002.

BARUSELLI, P. S.; ARRUDA, R. P.; SOPHON, S.; KAMOMPATANA, M. Embryo transfer in buffaloes: a practical approach using ultrasonography and in vitro culture before transplantation. **Buffalo Journal**, n. 2, p. 211-217, 1994a.

BARUSELLI, P. S.; MUCCIOLO, R. G.; VISINTIN, J. A.; VIANA, W. G.; ARRUDA, R. P.; E.H., M.; MOLERO-FILHO, J. R. Transferência de embriões em bubalinos (*Bubalus bubalis*). Dados preliminares. **Zootecnia**, v. 32, 1994b.

BARUSELLI, P. S. Basic requirements for artificial insemination and embryo transfer in buffaloes. **Buffalo Journal**, v. 2, n. 2, p. 53-60, 1994.

BARUSELLI, P. S.; MUCCIOLO, R. G.; VISINTIN, J. A.; VIANA, W. G.; ARRUDA, R. P.; MADUREIRA, E. H.; OLIVEIRA, C. A.; MOLERO-FILHO, J. R. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in buffalo (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, v. 47, n. 8, p. 1531-1547, 1997.

BARUSELLI, P. S. **Dinâmica folicular durante o ciclo estral e resposta superovulatória em fêmeas bubalinas (*Bubalus bubalis*)**. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997. 96 p.

BARUSELLI, P. S.; MADUREIRA, E. H.; VISINTIN, J. A.; PORTO FILHO, R. M.; CARVALHO, N. A. T.; CAMPANILE, G.; ZICARELLI, L. Failure oocyte entry into oviduct in superovulated buffalo. **Theriogenology**, v. 53, p. 1. Trabalho apresentado na Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, 2000.

BARUSELLI, P. S.; BERNARDES, O.; BARUFI, F. B.; BRAGA, D.; ARAUJO, D.; TONHATI, H. Calving distribution throughout the year in buffalo raised all over Brazil. In: Proceedings of World Buffalo Congress, 6, 2001, Mar acaibo. Proceedings... 2001. p. 234-240.

BARUSELLI, P. S.; CARVALHO, N. A. T.; HENRIQUEZ, C. H. P.; AMARAL, R.; NICHI, M. Synchronization of ovulation for timed artificial insemination during the off breeding season in

the buffalo. In: BUFFALO SYMPOSIUM OF AMERICAS, 1st. 2002, Belém. **Proceedings ...** Belém: Embrapa/CPATU, 2002. v. 1, p. 418-420.

BARUSELLI, P. S.; MARQUES, M. O.; ARRUDA, R. P.; CARVALHO, N. A. T.; OLIVEIRA, C. A. Plasma estradiol and progesterone concentrations in superovulated buffalo in presence of CIDR-B devices. **Theriogenology**, v. 57, p. 761, 2002.

BARUSELLI, P. S.; CARVALHO, N. A. T.; CAVALCANTE, A. K. S.; NICHI, M.; ZICARELLI, L. Use of rBST associated to a protocol for multiple ovulation and embryo transfer in buffalo (*Bubalus bubalis*). In: CONGRESSO NAZIONALE SULL'ALLEVAMENTO DEL BUFFALO, 2., 2003, Roma, 2003. p. 269-273.

BARUSELLI, P. S.; FERREIRA, R. M.; SALES, J. N. S.; GIMENES, L. U.; SÁ FILHO, M. F.; MARTINS, C. M.; RODRIGUES, C. A.; BÓ, G. A. Timed embryo transfer programs for management of donor and recipient cattle. **Theriogenology**, v. 76, n. 9, p. 1583-1593, 2011.

BARUSELLI, P. S.; SOARES, J. G.; GIMENES, L. U.; MONTEIRO, B. M.; OLAZARRI, M. J.; CARVALHO, N. A. T. Control of Buffalo Follicular Dynamics for Artificial Insemination, Superovulation and In Vitro Embryo Production. **Buffalo Bulletin**, v. 32, n. Special Issue 1, p. 160-176, 2013.

BATRA, S. K.; PANDEY, R. S. LH and oestradiol-17 β in blood plasma and milk during the oestrous cycle and early pregnancy in Murrah buffaloes. **Animal Reproduction Science**, v. 5, n., p. 247-257, 1983.

BEG, M. A.; SANWAL, P. C.; YADAV, M. C. Ovarian response and endocrine changes in buffalo superovulated at midluteal and late luteal stage of the estrous cycle: A preliminary report. **Theriogenology**, v. 47, n. 2, p. 423-432, 1997.

BELLVE, A. R.; MCDONALD, M. F. DIRECTIONAL FLOW OF FALLOPIAN TUBE SECRETION IN THE EWE AT ONSET OF THE BREEDING SEASON. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 22, n. 1, p. 147-149, 1970.

BENDZ, A.; HANSSON, H. A.; SVENDSEN, P.; WIQVIST, N. On the extensive contact between veins and arteries in the human ovarian pedicle. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 115, n. 2, p. 179-182, 1982.

BENNETT, W. A.; WATTS, T. L.; BLAIR, W. D.; WALDHALM, S. J.; FUQUAY, J. W. Patterns of oviducal motility in the cow during the oestrous cycle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 83, n. 2, p. 537-543, 1988.

BÉNYEI, B.; GÁSPÁRDY, A.; KOMLÓSI, I.; PÉCSI, A. Repeatability and Heritability of Ovulation Number and Embryos in Dam-daughters Pairs in Superovulated Holstein–Friesian Cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 39, n. 2, p. 99-102, 2004.

BLANDAU, R. J.; BOLING, J. L.; HALBERT, S.; VERDUGO, P. Methods for studying oviductal physiology. **Gynecology and Obstetric Investigation**, v. 6, n. 3-4, p. 123-145, 1975.

BÓ, G. A.; MARTINEZ, M.; NASSER, L. F.; CACCIA, M.; TRIBULO, H.; MAPLETOFT, R. J. Follicular dynamics in *Bos indicus* and *Bos taurus* beef cattle under pasture conditions in Argentina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 10, 1993, Campo Grande, 1993. p. 22.

BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S.; MORENO, D.; CUTAIA, L.; CACCIA, M.; TRÍBULO, R.; TRÍBULO, H.; MAPLETOFT, R. J. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 53-72, 2002.

BÓ, G. A.; MAPLETOFT, R. J. Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle. **Theriogenology**, v. 81, n. 1, p. 38-48, 2014.

BODKHE, R. R.; HARPER, M. J. K. Influence of hCG injection and steroid treatment on prostaglandin metabolism by rabbit uterus and oviduct. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 57, n. 1, p. 101-112, 1979.

BOICE, M. L.; GEISERT, R. D.; BLAIR, R. M.; VERHAGE, H. G. Identification and characterization of bovine oviductal glycoproteins synthesized at estrus. **Biology of Reproduction**, v. 43, n. 3, p. 457-465, 1990.

BOLAND, M. P.; GOULDING, D.; ROCHE, J. F. Alternative gonadotrophins for superovulation in cattle. **Theriogenology**, v. 35, p. 5-17, 1991.

BONI, R.; ROELOFSEN, V. M.; PIETERSE, M.; WURTH, Y.; KRUIPTH, A. M. Follicular recruitment after repeated removal of all follicles > 2 mm in bovine ovary. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 12, p. 40, 1993.

BRACKETT, B. G.; MASTROIANNI, L., JR. Composition of oviductal fluid. In: Johnson, A. D. e Foley, C. W. (Ed.). **The Oviduct and its Functions**. New York: Academic Press, 1974, p.133-160.

BRIDGES, P. J.; FORTUNE, J. E. Regulation, action and transport of prostaglandins during the periovulatory period in cattle. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 263, n. 1–2, p. 1-9, 2007.

BRIDGES, P. J.; CHO, J.; KO, C. Endothelins in regulating ovarian and oviductal function. **Frontiers in bioscience (Scholar edition)**, v. 3, p. 145-155, 2011.

BROKAW, C. J. Calcium-induced asymmetrical beating of triton-demembrated sea urchin sperm flagella. **The Journal of Cell Biology**, v. 82, n. 2, p. 401-411, 1979.

BUHI, W. C.; ALVAREZ, I. M.; SUDHIPONG, V.; DONES-SMITH, M. M. Identification and characterization of de novo-synthesized porcine oviductal secretory proteins. **Biology of Reproduction**, v. 43, n. 6, p. 929-938, 1990.

BUHI, W. C.; ASHWORTH, C. J.; BAZER, F. W.; ALVAREZ, I. M. In vitro synthesis of oviductal secretory proteins by estrogen-treated ovariectomized gilts. **Journal of Experimental Zoology**, v. 262, n. 4, p. 426-435, 1992.

BUHI, W. C.; ALVAREZ, I. M.; KOUBA, A. J. Secreted Proteins of the Oviduct. **Cells Tissues Organs**, v. 166, n. 2, p. 165-179, 2000.

BURNS, D. S.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; IRELAND, J. L. H.; KNIGHT, P. G.; IRELAND, J. J. Numbers of Antral Follicles During Follicular Waves in Cattle: Evidence for High Variation Among Animals, Very High Repeatability in Individuals, and an Inverse Association with Serum Follicle-Stimulating Hormone Concentrations. **Biology of Reproduction**, v. 73, n. 1, p. 54-62, 2005.

BYLANDER, A.; NUTU, M.; WELLANDER, R.; GOKSOR, M.; BILLIG, H.; LARSSON, D. J. Rapid effects of progesterone on ciliary beat frequency in the mouse fallopian tube. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 8, n. 1, p. 48, 2010.

BYLANDER, A.; LIND, K.; GOKSOR, M.; BILLIG, H.; LARSSON, D. J. The classical progesterone receptor mediates the rapid reduction of fallopian tube ciliary beat frequency by progesterone. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 11, n. 1, p. 33, 2013.

CABODEVILA, J.; TORQUATRI, S. Superovulação de Fêmeas bovinas. In: (Ed.). **Biotechnologia de la Reproducción** Argentina: PALMA, G.A. , 2001. v.1ª edição INTA, p.79-108.

CAMPANILE, G.; BARUSELLI, P. S.; NEGLIA, G.; VECCHIO, D.; GASPARRINI, B.; GIMENES, L. U.; ZICARELLI, L.; D'OCCHIO, M. J. Ovarian function in the buffalo and implications for embryo development and assisted reproduction. **Animal Reproduction Science**, v. 121, n. 1-2, p. 1-11, 2010.

CARVALHO, N. A. T.; BARUSELLI, P. S.; ZICARELLI, L.; MADUREIRA, E. H.; VISINTIN, J. A.; D'OCCHIO, M. J. Control of ovulation with a GnRH agonist after superstimulation of

follicular growth in buffalo: fertilization and embryo recovery. **Theriogenology**, v. 58, n. 9, p. 1641-1650, 2002.

CARVALHO, N. A. T. **Avaliação anatomofuncional do sistema genital de fêmeas bubalinas (*Bubalus bubalis*) e suas implicações na múltipla ovulação e transferência de embriões**. 2006. 145 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

CARVALHO, N. A. T.; NAGASAKU, E. M.; VANNUCCI, F. S.; TOLEDO, L. M.; CARVALHO, J. B. P.; CARVALHO, M. I. A. B.; GIMENES, L. U.; AYRES, H.; MARTINZ, C. C.; BARUSELLI, P. S. Use of different doses of r-bST associated to a protocol for multiple ovulation and embryo transfer in buffalo (*Bubalus bubalis*). **Italian Journal of Animal Science**, v. 6, p. 652-654, 2007a.

CARVALHO, N. A. T.; VANNUCCI, F. S.; D'ANGELO, M.; GALLUPO, A. G.; MELO, G. M.; SOUZA, R. J.; NICH, M.; GIMENES, L. U.; SÁ FILHO, M. F.; MARTIZ, C. C.; CASTRICINI, E. S. C.; BARUSELLI, P. S. Oocytes transport across the oviduct of Murrah and Nelore cows. **Italian Journal of Animal Science**, v. 6, p. 649-651, 2007b.

CARVALHO, N. A. T.; SOARES, J. G.; BARUSELLI, P. S. Embryonic transference in buffalos and cows. **Revista Veterinaria**, v. 21, p. 179-181, 2010.

CARVALHO, N. A. T.; BOMBONATO, P. P.; D'ANGELO, M.; BARUSELLI, P. S. Anatomical and functional characterization of the genital system of female buffaloes (*Bubalus bubalis*) and its implications on multiple ovulation and embryo transfer. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, p. 95-103, 2011.

CARVALHO, N. A. T.; SOARES, J. G.; VANNUCCI, F. S.; D'ANGELO, M.; GALLUPO, A. G.; MELO, G. M.; SOUZA, R. J.; NICH, M.; GIMENES, L. U.; SÁ FILHO, M. F.; MARTINS, C. M.; CASTRICINI, E.; BARUSELLI, P. S. In vitro oocyte transport through the oviduct of buffalo and crossbred beef cows. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 49, p. 277-284, 2012.

CASCHETTO, S.; LINDBLOM, B.; WIQVIST, N.; WILHELMSSON, L. Prostaglandins and the contractile function of the human oviductal ampulla. **Gynecology and Obstetric Investigation**, v. 10, n. 5, p. 212-220, 1979.

CASTILHO, C.; GARCIA, J. M.; RENESTO, A.; NOGUEIRA, G. P.; BRITO, L. F. C. Follicular dynamics and plasma FSH and progesterone concentrations during follicular deviation in the first post-ovulatory wave in Nelore (*Bos indicus*) heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 98, n. 3-4, p. 189-196, 2007.

CRITOPH, F. N.; DENNIS, K. J. Ciliary activity in the human oviduct. **British Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 84, n. 3, p. 216-218, 1977.

CUSHMAN, R. A.; DESOUSA, J. C.; HEDGPETH, V. S.; BRITT, J. H. Superovulatory Response of One Ovary Is Related to the Micro- and Macroscopic Population of Follicles in the Contralateral Ovary of the Cow. **Biology of Reproduction**, v. 60, n. 2, p. 349-354, 1999.

D'OCCHIO, M. J.; SUDHA, G.; JILLELLA, D.; WHYTE, T.; MACLELLAN, L. J.; WALSH, J.; TRIGG, T. E.; MILLER, D. Use of a GnRH agonist to prevent the endogenous LH surge and injection of exogenous LH to induce ovulation in heifers superstimulated with FSH: A new model for superovulation. **Theriogenology**, v. 47, n. 3, p. 601-613, 1997.

DANELL, B. **Oestrous behaviour, ovarian morphology and cyclical variation in follicular system and endocrine pattern in water buffalo heifers**. 1987. 124 f. Tese (Doutorado) - Faculty of Veterinary Medicine, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, 1987.

DAVIS, B. J.; LENNARD, D. E.; LEE, C. A.; TIANO, H. F.; MORHAM, S. G.; WETSEL, W. C.; LANGENBACH, R. Anovulation in Cyclooxygenase-2-Deficient Mice Is Restored by Prostaglandin E2 and Interleukin-1 β . **Endocrinology**, v. 140, n. 6, p. 2685-2695, 1999.

DJAHANBAHKCH, O.; EZZATI, M.; SARIDOGAN, E. Physiology and pathophysiology of tubal transport: ciliary beat and muscular contractility, relevance to tubal infertility, recent research, and future directions. In: LEDGER, W. L., TAN, S. L., BAHATHIQ, A. (Ed.). **The fallopian tube in infertility and IVF practice**. Cambridge: Cambridge University, 2010, p.18-29.

DROST, M.; WRIGHT JR, J. M.; CRIPE, W. S.; RICHTER, A. R. Embryo transfer in water buffalo (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, v. 20, n. 5, p. 579-584, 1983.

DROST, M.; ALEXIEV, A.; VLAHOV, K.; KARAIVANOV, C.; CRIPE, W. S.; LEONARDS, A. P.; KACHEVA, D.; POLIHRONOV, O.; NICOLOV, N.; PETROV, M.; DRAGOEVA, A. Successful nonsurgical embryo transfer in buffalo (*Bubalus bubalis*) in Bulgaria. **Theriogenology**, v. 30, n. 4, p. 659-668, 1988.

DROST, M. Reproductive technology in buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, v. 2, p. 93-102, 1996.

ECKERT, R.; BREHM, P. Ionic Mechanisms of Excitation in Paramecium. **Annual Review of Biophysics and Bioengineering**, v. 8, n. 1, p. 353-383, 1979.

EDDY, C. A.; BALMACEDA, J. P.; PAUERSTEIN, C. J. Effect of Resection of the Ampullary-Isthmic Junction on Estrogen Induced Tubal Locking of Ova in the Rabbit. **Biology of Reproduction**, v. 18, n. 1, p. 105-109, 1978.

EHRENWALD, E.; FOOTE, R. H.; PARKS, J. E. Bovine oviductal fluid components and their potential role in sperm cholesterol efflux. **Mol Reprod Dev**, v. 25, n. 2, p. 195-204, 1990.

EL-WISHY, A. B. The postpartum buffalo: II. Acyclicity and anestrus. **Animal Reproduction Science**, v. 97, n. 3-4, p. 216-236, 2007.

ELLINGTON, J. E. The bovine oviduct and its role in reproduction: a review of the literature. **Cornell Veterinary**, v. 81, n. 3, p. 313-328, 1991.

ERICKSON-LAWRENCE, M. F.; TURNER, T. T.; THOMAS, T. S.; OLIPHANT, G. Effect of steroid hormones on sulfated oviductal glycoprotein secretion by oviductal explants in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 40, n. 6, p. 1311-1319, 1989.

EVANS, R. W.; CHEN, T. J.; HENDRY, W. J., 3RD; LEAVITT, W. W. Progesterone regulation of estrogen receptor in the hamster uterus during the estrous cycle. **Endocrinology**, v. 107, n. 2, p. 383-390, 1980.

EZZATI, M.; DJAHANBAKHCH, O.; ARIAN, S.; CARR, B. Tubal transport of gametes and embryos: a review of physiology and pathophysiology. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 31, n. 10, p. 1337-1347, 2014.

FAO. **FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS**. Agriculture data. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/>>. Acesso em: 20 mar. 2015.

FAZLEABAS, A. T.; VERHAGE, H. G. The detection of oviduct-specific proteins in the baboon (*Papio anubis*). **Biology of Reproduction**, v. 35, n. 2, p. 455-462, 1986.

FEIGELSON, M.; KAY, E. Protein Patterns of Rabbit Oviductal Fluid. **Biology of Reproduction**, v. 6, n. 2, p. 244-252, 1972.

FERNANDES, P. **Expression of LHR isoforms in granulosa cells of Nelore females submitted or not to ovarian superstimulation**. 2008. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

FIGUEIREDO, R. A.; BARROS, C. M.; PINHEIRO, O. L.; SOLER, J. M. P. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. **Theriogenology**, v. 47, n. 8, p. 1489-1505, 1997.

FONTES, P. K.; CASTILHO, A. C. S.; RAZZA, E. M.; ERENO, R. L.; SATRAPA, R. A.; BARROS, C. M. Prostaglandin receptors (EP2 and EP4) and angiotensin receptor (AGTR2) mRNA expression increases in the oviducts of Nelore cows submitted to ovarian superstimulation. **Animal Reproduction Science**, v. 151, n. 3-4, p. 112-118, 2014.

GABLER, C.; EINSPANIER, A.; SCHAMS, D.; EINSPANIER, R. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its corresponding receptors (flt-1 and flk-1) in the bovine oviduct. **Molecular Reproduction and Development**, v. 53, n. 4, p. 376-383, 1999.

GABLER, C.; CHAPMAN, D.; KILLIAN, G. Expression and presence of osteopontin and integrins in the bovine oviduct during the oestrous cycle. **Reproduction**, v. 126, n. 6, p. 721-729, 2003.

GABLER, C.; ODAU, S.; MULLER, K.; SCHON, J.; BONDZIO, A.; EINSPANIER, R. Exploring cumulus-oocyte-complex-oviductal cell interactions: Gene profiling in the bovine oviduct. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 59, n. SUPPL. 9, p. 29-42, 2008.

GALLI, C.; CROTTI, G.; NOTARI, C.; TURINI, P.; DUCHI, R.; LAZZARI, G. Embryo production by ovum pick up from live donors. **Theriogenology**, v. 55, n. 6, p. 1341-1357, 2001.

GANDOLFI, F.; BREVINI, T. A.; RICHARDSON, L.; BROWN, C. R.; MOOR, R. M. Characterization of proteins secreted by sheep oviduct epithelial cells and their function in embryonic development. **Development**, v. 106, n. 2, p. 303-312, 1989.

GANDOLFI, F.; MODINA, S.; BREVINI, T. A.; GALLI, C.; MOOR, R. M.; LAURIA, A. Oviduct ampullary epithelium contributes a glycoprotein to the zona pellucida, perivitelline space and blastomeres membrane of sheep embryos. **European Journal of Basic and Applied Histochemistry**, v. 35, n. 4, p. 383-392, 1991.

GARBINO, E. J.; HERNANDEZ, J. A.; SHEARER, J. K.; RISCO, C. A.; THATCHER, W. W. Effect of lameness on ovarian activity in postpartum Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n., p. 4123-4131, 2004.

GARDNER, D. K.; LANE, M.; CALDERON, I.; LEETON, J. Environment of the preimplantation human embryo in vivo: metabolite analysis of oviduct and uterine fluids and metabolism of cumulus cells. **Fertility and Sterility**, v. 65, n. 2, p. 349-353, 1996.

GASPARRINI, B. In vitro embryo production in buffalo species: state of the art. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 237-256, 2002.

GASPARRINI, B.; BOCCIA, L.; MARCHANDISE, J.; DI PALO, R.; GEORGE, F.; DONNAY, I.; ZICARELLI, L. Enrichment of in vitro maturation medium for buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes with thiol compounds: Effects of cystine on glutathione synthesis and embryo development. **Theriogenology**, v. 65, n. 2, p. 275-287, 2006.

GASPARRINI, B.; NEGLIA, G.; DI PALO, R.; VECCHIO, D.; ALBERO, G.; ESPOSITO, L.; CAMPANILE, G.; ZICARELLI, L. Influence of oocyte donor on in vitro embryo production in buffalo. **Animal Reproduction Science**, v. 144, n. 3-4, p. 95-101, 2014.

GAUVREAU, D.; MOISAN, V.; ROY, M.; FORTIER, M. A.; BILODEAU, J. F. Expression of prostaglandin E synthases in the bovine oviduct. **Theriogenology**, v. 73, n. 1, p. 103-111, 2010.

GERENA, R. L.; KILLIAN, G. J. Electrophoretic characterization of proteins in oviduct fluid of cows during the estrous cycle. **Journal of Experimental Zoology**, v. 256, n. 1, p. 113-120, 1990.

GIBBONS, B. H.; GIBBONS, I. R. Calcium-induced quiescence in reactivated sea urchin sperm. **The Journal of Cell Biology**, v. 84, n. 1, p. 13-27, 1980.

GIMENES, L. U. **Estudo da divergência folicular e da capacidade ovulatória em bubalinos (*Bubalus bubalis*) e zebuínos (*Bos indicus*)**. 2006. 113 f. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

GIMENES, L. U.; CARVALHO, N. A. T.; SÁ FILHO, M. F.; TORRES JÚNIOR, J. R. S.; AYRES, H.; VANNUCCI, F. S.; BIANCONI, L. L.; BISINOTTO, R. S.; REICHERT, R. H.; BELTRAN, M. P.; NOGUEIRA, G. P.; BARUSELLI, P. S. Follicle selection by ultrasonography and plasmatic characteristics and ovulatory capacity in buffaloes. **Italian Journal of Animal Science**, v. 6, p. 629-631, 2007.

GIMENES, L. U.; SÁ FILHO, M. F.; CARVALHO, N. A. T.; TORRES-JÚNIOR, J. R. S.; SOUZA, A. H.; MADUREIRA, E. H.; TRINCA, L. A.; SARTORELLI, E. S.; BARROS, C. M.; CARVALHO, J. B. P.; MAPLETOFT, R. J.; BARUSELLI, P. S. Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. **Theriogenology**, v. 69, n. 7, p. 852-858, 2008.

GIMENES, L. U.; FANTINATO NETO, P.; ARANGO, J. S. P.; AYRES, H.; BARUSELLI, P. S. Follicular dynamics of *Bos indicus*, *Bos taurus* and *Bubalus bubalis* heifers treated with norgestomet ear implant associated or not to injectable progesterone. **Animal Reproduction**, v. 6, p., 2009.

GIMENES, L. U.; CARVALHO, N. A. T.; SÁ FILHO, M. F.; VANNUCCI, F. S.; TORRES-JÚNIOR, J. R. S.; AYRES, H.; FERREIRA, R. M.; TRINCA, L. A.; SARTORELLI, E. S.; BARROS, C. M.; BELTRAN, M. P.; NOGUEIRA, G. P.; MAPLETOFT, R. J.; BARUSELLI, P. S. Ultrasonographic and endocrine aspects of follicle deviation, and acquisition of ovulatory capacity in buffalo (*Bubalus bubalis*) heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 123, n. 3-4, p. 175-179, 2011.

GINTHER, O. J.; KASTELIC, J. P.; KNOPF, L. Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. **Animal Reproduction Science**, v. 20, n. 3, p. 187-200, 1989.

GINTHER, O. J.; KNOPF, L.; KASTELIC, J. P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 87, n. 1, p. 223-230, 1989.

GINTHER, O. J.; WILTBANK, M. C.; FRICKE, P. M.; GIBBONS, J. R.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 55, n. 6, p. 1187-1194, 1996.

GINTHER, O. J.; BERGFELT, D. R.; BEG, M. A.; KOT, K. Follicle Selection in Cattle: Role of Luteinizing Hormone. **Biology of Reproduction**, v. 64, n. 1, p. 197-205, 2001.

GIRARD, P. R.; KENNEDY, J. R. Calcium regulation of ciliary activity in rabbit tracheal epithelial explants and outgrowth. **European Journal of Cell Biology**, v. 40, n. 2, p. 203-209, 1986.

GONCALVES, R. F.; WAY, A. L.; KILLIAN, G. J. Influence of osteopontin and lipocalin-type prostaglandin D synthase in sperm-egg binding and fertilization in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 111, 2001.

GONCALVES, R. F.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN, G. J. Effect of osteopontin on in vitro bovine embryo development. **Biology of Reproduction**, v. 68, n. 1, p.336, 2003.

GRIFFIN, G. D.; FLANAGAN-CATO, L. M. Estradiol and progesterone differentially regulate the dendritic arbor of neurons in the hypothalamic ventromedial nucleus of the female rat (*Rattus norvegicus*). **The Journal of Comparative Neurology**, v. 510, n. 6, p. 631-640, 2008.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. São Paulo: Manole, 2004, v.7, 513 p.

HALBERT, S. A.; TAM, P. Y.; ADAMS, R. J.; BLANDAU, R. J. An analysis of the mechanisms of egg transport in the ampulla of the rabbit oviduct. **Gynecologic and Obstetric Investigation**, v. 7, n. 5, p. 306-320, 1976.

HALBERT, S. A.; TAM, P. Y.; BLANDAU, R. J. Egg transport in the rabbit oviduct: the roles of cilia and muscle. **Science**, v. 191, n. 4231, p. 1052-1053, 1976.

HALBERT, S. A.; BECKER, D. R.; SZAL, S. E. Ovum transport in the rat oviductal ampulla in the absence of muscle contractility. **Biology of Reproduction**, v. 40, n. 6, p. 1131-1136, 1989.

- HARD, R.; RIEDER, C. L. Muciliary transport in newt lungs: The ultrastructure of the ciliary apparatus in isolated epithelial sheets and in functional Tritonextracted models. **Tissue and Cell**, v. 15, n. 2, p. 227-243, 1983.
- HARPER, M. J. K. Gamete and zygote transport In: KNOBIL, E., NEIL, J. (Ed.). **The Physiology of Reproduction**. New York: Raven Press, 1988, p.103-134.
- HELM, G.; OWMAN, C.; SJÖBERG, N.-O.; WALLES, B. Motor activity of the human Fallopian tube in vitro in relation to plasma concentration of oestradiol and progesterone, and the influence of noradrenaline. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 64, n. 1, p. 233-242, 1982.
- HENRICKS, D. M.; R. B. HARRIS, J. Cytoplasmic Estrogen Receptors and Estrogen Concentrations in Bovine Uterine Endometrium. **Endocrinology**, v. 103, n. 1, p. 176-185, 1978.
- HERMOSO, M.; BARRERA, N.; MORALES, B.; PÉREZ, S.; VILLALÓN, M. Platelet activating factor increases ciliary activity in the hamster oviduct through epithelial production of prostaglandin E2. **Pflügers Archiv**, v. 442, n. 3, p. 336-345, 2001.
- HIZAKI, H.; SEGI, E.; SUGIMOTO, Y.; HIROSE, M.; SAJI, T.; USHIKUBI, F.; MATSUOKA, T.; NODA, Y.; TANAKA, T.; YOSHIDA, N.; NARUMIYA, S.; ICHIKAWA, A. Abortive expansion of the cumulus and impaired fertility in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP(2). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 18, p. 10501-10506, 1999.
- HODGSON, B. J. Effects of Indomethacin and ICI 46,474 Administered During Ovum Transport on Fertility in Rabbits. **Biology of Reproduction**, v. 14, n. 4, p. 451-457, 1976.
- HORTON, E. W.; MAIN, I. H.; THOMPSON, C. J. Effects of prostaglandins on the oviduct, studied in rabbits and ewes. **The Journal of Physiology**, v. 180, n. 3, p. 514-528, 1965.
- HUFANA-DURAN, D.; PEDRO, P. B.; VENTURINA, H. V.; HUFANA, R. D.; SALAZAR, A. L.; DURAN, P. G.; CRUZ, L. C. Post-warming hatching and birth of live calves following transfer of in vitro-derived vitrified water buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. **Theriogenology**, v. 61, n. 7-8, p. 1429-1439, 2004.
- HUNTER, R. H. F. **The fallopian tubes: their role in fertility and infertility**. Berlim: Springer-Verlag, 1988. 185 p.
- HUNTER, R. H. F. The Fallopian tubes in domestic mammals: how vital is their physiological activity? **Reproduction Nutrition Development**, v. 45, n. 3, p. 281-290, 2005.

HYDE, B. A.; BLACK, D. L. Synthesis and secretion of sulphated glycoproteins by rabbit oviduct explants in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 78, n. 1, p. 83-91, 1986.

IRELAND, J.; WARD, F.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; IRELAND, J. L. H.; SMITH, G. W.; LONERGAN, P.; EVANS, A. C. O. Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. **Human Reproduction**, v. 22, n. 6, p. 1687-1695, 2007.

IRELAND, J. J.; ROCHE, J. F. Development of Nonovulatory Antral Follicles in Heifers: Changes in Steroids in Follicular Fluid and Receptors for Gonadotropins. **Endocrinology**, v. 112, n. 1, p. 150-156, 1983.

IRELAND, J. J.; SMITH, G. W.; SCHEETZ, D.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; FOLGER, J. K.; IRELAND, J. L. H.; MOSSA, F.; LONERGAN, P.; EVANS, A. C. O. Does size matter in females? An overview of the impact of the high variation in the ovarian reserve on ovarian function and fertility, utility of anti-Müllerian hormone as a diagnostic marker for fertility and causes of variation in the ovarian reserve in cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 23, n. 1, p. 1-14, 2010.

IZADYAR, F.; ZEINSTRA, E.; BEVERS, M. M. Follicle-stimulating hormone and growth hormone act differently on nuclear maturation while both enhance developmental competence of in vitro matured bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 51, n. 3, p. 339-345, 1998.

IZADYAR, F.; HAGE, W. J.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M. M. The promotory effect of growth hormone on the developmental competence of in vitro matured bovine oocytes is due to improved cytoplasmic maturation. **Molecular Reproduction and Development**, v. 49, n. 4, p. 444-453, 1998.

JANSEN, R. Fallopian tube isthmic mucus and ovum transport. **Science**, v. 201, n. 4353, p. 349-351, 1978.

JANSEN, R. P. S. Endocrine Response in the Fallopian Tube. **Endocrine Reviews**, v. 5, n. 4, p. 525-551, 1984.

JEPPESEN, J. V.; KRISTENSEN, S. G.; NIELSEN, M. E.; HUMAIDAN, P.; DAL CANTO, M.; FADINI, R.; SCHMIDT, K. T.; ERNST, E.; YDING ANDERSEN, C. LH-receptor gene expression in human granulosa and cumulus cells from antral and preovulatory follicles. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 97, n. 8, p. 1524-1531, 2012.

JOYCE, I. M.; PENDOLA, F. L.; O'BRIEN, M.; EPPIG, J. J. Regulation of Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 2 Messenger Ribonucleic Acid Expression in Mouse Granulosa Cells during Ovulation. **Endocrinology**, v. 142, n. 7, p. 3187-3197, 2001.

KAMWANJA, L. A.; HANSEN, P. J. Regulation of Proliferation of Bovine Oviductal Epithelial Cells by Estradiol. **Hormone and Metabolic Research**, v. 25, n. 9, p. 500-502, 1993.

KAPUR, R. P.; JOHNSON, L. V. An oviductal fluid glycoprotein associated with ovulated mouse ova and early embryos. **Developmental Biology**, v. 112, n. 1, p. 89-93, 1985.

KAPUR, R. P.; JOHNSON, L. V. Ultrastructural evidence that specialized regions of the murine oviduct contribute a glycoprotein to the extracellular matrix of mouse oocytes. **The Anatomical Record**, v. 221, n. 3, p. 720-729, 1988.

KARAIVANOV, C. Comparative studies on the superovulatory effect of PMSG and FSH in water buffalo (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, v. 26, n. 1, p. 51-59, 1986.

KARAIVANOV, C.; VLAHOV, K.; PETROV, M.; KACHEVA, D.; STOJANOVA, M.; ALEXIEV, A.; POLIHRONOV, O.; DANEV, A. Studies on preimplantation development of buffalo embryos. **Theriogenology**, v. 28, n. 5, p. 747-753, 1987.

KARTERIS, E.; ZERVOU, S.; PANG, Y.; DONG, J.; HILLHOUSE, E. W.; RANDEVA, H. S.; THOMAS, P. Progesterone Signaling in Human Myometrium through Two Novel Membrane G Protein-Coupled Receptors: Potential Role in Functional Progesterone Withdrawal at Term. **Molecular Endocrinology**, v. 20, n. 7, p. 1519-1534, 2006.

KASTELIC, J. P.; KNOPF, L.; GINTHER, O. J. Effect of day of postaglandin F2a treatment on selection and development of the ovulatory follicle in heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 23, p. 169-180, 1990.

KILLIAN, G. J.; CHAPMAN, D. A.; KAVANAUGH, J. F.; DEAVER, D. R.; WIGGIN, H. B. Changes in phospholipids, cholesterol and protein content of oviduct fluid of cows during the oestrous cycle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 86, n. 2, p. 419-426, 1989.

KILLIAN, G. J.; GONCALVES, R. F. Negative affect of antibodies to bovine osteopontin, lipocalin prostaglandin D synthase and serum albumin on in vitro embryo development of oocytes exposed to oviduct fluid. **Theriogenology**, v. 57, p. 520, 2002.

KILLIAN, G. J. Evidence for the role of oviduct secretions in sperm function, fertilization and embryo development. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, n. 0, p. 141-153, 2004.

KIM, I. H.; SON, D. S.; YEON, S. H.; CHOI, S. H.; PARK, S. B.; RYU, I. S.; SUH, G. H.; LEE, D. W.; LEE, H. J.; YOON, J. T. Effect of dominant follicle removal before superstimulation of follicular growth, ovulation and embryo production in Holstein cows. **Theriogenology**, v. 55, n. 4, p. 937-945, 2001.

KISSLER, S.; WILDT, L.; SCHMIEDEHAUSEN, K.; KOHL, J.; MUELLER, A.; RODY, A.; AHR, A.; KUWERT, T.; KAUFMANN, M.; SIEBZEHRUEBL, E. Predictive value of impaired uterine transport function assessed by negative hysterosalpingoscintigraphy (HSSG). **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 113, n. 2, p. 204-208, 2004.

KÖLLE, S.; DUBIELZIG, S.; REESE, S.; WEHREND, A.; KÖNIG, P.; KUMMER, W. Ciliary Transport, Gamete Interaction, and Effects of the Early Embryo in the Oviduct: Ex Vivo Analyses Using a New Digital Videomicroscopic System in the Cow. **Biology of Reproduction**, v. 81, n. 2, p. 267-274, 2009.

KÜNZEL, J.; GEISLER, K.; MALTARIS, T.; MÜLLER, A.; HOFFMANN, I.; SCHNEIDER, H.; BECKMANN, M. W.; DITTRICH, R.; OPPELT, P. G. Effects of Interactions Between Progesterone and Prostaglandin on Uterine Contractility in a Perfused Swine Uterus Model. **In Vivo**, v. 28, n. 4, p. 467-475, 2014.

LASTER, D. B. DISAPPEARANCE AND UPTAKE OF [125I]FSH IN THE RAT, RABBIT, EWE AND COW. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 30, n. 3, p. 407-415, 1972.

LEE, W. I.; VERDUGO, P.; SCHURR, J. M.; BLANDAUI, R. J. Control of oviductal ciliary activity: effect of extracellular $[Ca^{2+}]$. **Biophysical Journal**, v. 16, p. 120, 1976.

LEE, W. I.; VERDUGO, P. Laser light-scattering spectroscopy: a new application in the study of ciliary activity. **Biophysical Journal**, v. 16, n. 9, p. 1115-1119, 1976.

LEMAIRE, W. J.; MARSH, J. M. Interrelationships between prostaglandins, cyclic AMP and steroids in ovulation. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 22, p. 53-74, 1975.

LIM, H.; PARIA, B. C.; DAS, S. K.; DINCHUK, J. E.; LANGENBACH, R.; TRZASKOS, J. M.; DEY, S. K. Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. **Cell**, v. 91, n. 2, p. 197-208, 1997.

LINDBLOM, B.; HAMBERGER, L.; WIKVIST, N. Differentiated contractile effects of prostaglandins E and F on the isolated circular and longitudinal smooth muscle of the human oviduct. **Fertility and Sterility**, v. 30, n. 5, p. 553-559, 1978.

LIU, J.; SIROIS, J. Follicle size-dependent induction of prostaglandin G/H synthase-2 during superovulation in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 58, n. 6, p. 1527-1532, 1998.

LIVINGSTONE, C.; COLLISON, M. Sex steroids and insulin resistance. **Clinical Science**, v. 102, n. 2, p. 151-166, 2002.

LOONEY, C. R.; BOUTTE, B. W.; ARCHBALD, L. F.; GODKE, R. A. Comparison of once daily and twice daily FSH injections for superovulating beef cattle. **Theriogenology**, v. 15, n. 1, p. 13-22, 1981.

LUCY, M. C.; SAVIO, J. D.; BADINGA, L.; DE LA SOTA, R. L.; THATCHER, W. W. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 70, n. 11, p. 3615-3626, 1992.

LUCY, M. C. Regulation of Ovarian Follicular Growth by Somatotropin and Insulin-Like Growth Factors in Cattle1. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 7, p. 1635-1647, 2000.

LYONS, R. A.; DJAHANBAKHCH, O.; MAHMOOD, T.; SARIDOGAN, E.; SATTAR, S.; SHEAFF, M. T.; NAFTALIN, A. A.; CHENOY, R. Fallopian tube ciliary beat frequency in relation to the stage of menstrual cycle and anatomical site. **Human Reproduction**, v. 17, n. 3, p. 584-588, 2002.

LYONS, R. A.; SARIDOGAN, E.; DJAHANBAKHCH, O. The reproductive significance of human Fallopian tube cilia. **Human Reproduction Update**, v. 12, n. 4, p. 363-372, 2006a.

LYONS, R. A.; SARIDOGAN, E.; DJAHANBAKHCH, O. The effect of ovarian follicular fluid and peritoneal fluid on Fallopian tube ciliary beat frequency. **Human Reproduction**, v. 21, n. 1, p. 52-56, 2006b.

MADAN, M. L. Factors limiting superovulation response in embryo transfer programme in buffalo. **Theriogenology**, v. 33, p. 280, 1990.

MADAN, M. L.; DAS, S. K.; PALTA, P. Application of reproductive technology to buffaloes. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 299-306, 1996.

MAGUINESS, S. D.; SHRIMANKER, K.; DJAHANBAKHCH, O.; DEEKS, J. J.; TEISNER, B.; GRUDZINSKAS, J. G. In-vitro synthesis of total protein and placental protein PP14 by the Fallopian tube mucosa: variation in relation to anatomical site, the ovarian cycle and the menopause. **Human Reproduction**, v. 8, n. 5, p. 678-683, 1993a.

MAGUINESS, S. D.; SHRIMANKER, K.; DJAHANBAKHCH, O.; TEISNER, B.; GRUDZINSKAS, J. G. Immunology: Evidence for the in-vitro de-novo synthesis of immunoglobulin and a previously undescribed 17 kDa protein (TEP-2) by the mucosa of the Fallopian tube. **Human Reproduction**, v. 8, n. 8, p. 1199-1202, 1993b.

MAHMOOD, T.; SARIDOGAN, E.; SMUTNA, S.; HABIB, A. M.; DJAHANBAKHCH, O. The effect of ovarian steroids on epithelial ciliary beat frequency in the human Fallopian tube. **Human Reproduction**, v. 13, n. 11, p. 2991-2994, 1998.

MALYSZ-CYMBORSKA, I.; ZIECIK, A. J.; WACLAWIK, A.; ANDRONOWSKA, A. Effect of hCG and eCG Treatments on Prostaglandins Synthesis in the Porcine Oviduct. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 48, n. 6, p. 1034-1042, 2013.

MANIK, R. S.; MADAN, M. L.; SINGLA, S. K. Ovarian follicular dynamics in water buffaloes (*Bubalus bubalis*): ultrasonically monitoring individual follicles for wave hypothesis. **Theriogenology**, v. 41, p. 247, 1994.

MAPLETOFT, R. J.; BENNETT STEWARD, K.; ADAMS, G. P. Recent advances in the superovulation in cattle. **Reproduction Nutrition Development**, v. 42, n. 6, p. 601-611, 2002.

MASTROIANNI, L., JR.; URZUA, M.; STAMBAUGH, R. Protein patterns in monkey oviductal fluid before and after ovulation. **Fertility and Sterility**, v. 21, n. 12, p. 817-820, 1970.

MCCOMB, P. F.; MOON, Y. Prostaglandin E and F concentration in the fimbria of the rabbit fallopian tube increases at the time of ovulation. **Acta Europaea Fertilitatis**, v. 16, n. 6, p. 423-426, 1985.

MCNUTT, T.; ROGOWSKI, L.; VASILATOS-YOUNKEN, R.; KILLIAN, G. Adsorption of oviductal fluid proteins by the bovine sperm membrane during in vitro capacitation. **Molecular Reproduction and Development**, v. 33, n. 3, p. 313-323, 1992.

MESIANO, S. Myometrial Progesterone Responsiveness. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 25, n. 01, p. 005-013, 2007.

MISRA, A. K.; JOSHI, B. V.; AGRAWALA, P. L.; KASIRAJ, R.; SIVAIA, S.; RANGAREDDI, N. S.; SIDDIQUI, M. U. Multiple ovulation and embryo transfer in Indian buffalo (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, v. 33, n. 5, p. 1131-1141, 1990.

MISRA, A. K.; KASIRAJ, R.; MUTHA RAO, M.; RANGAREDDY, N. S.; JAISWAL, R. S.; PANT, H. C. Rate of transport and development of preimplantation embryo in the superovulated buffalo (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, v. 50, n. 4, p. 637-649, 1998.

MISRA, A. K.; TYAGI, S. In vivo embryo production in buffalo: present and perspectives. **Italian Journal of Animal Science**, v. 6, n. 2, p. 74-91, 2007.

MONNIAUX, D.; CHUPIN, D.; SAUMANDE, J. Superovulatory responses of cattle. **Theriogenology**, v. 19, n. 1, p. 55-81, 1983.

MONNIAUX, D.; DROUILHET, L.; RICO, C.; ESTIENNE, A.; JARRIER, P.; TOUZÉ, J.-L.; SAPA, J.; PHOCAS, F.; DUPONT, J.; DALBIÈS-TRAN, R.; FABRE, S. Regulation of anti-Müllerian hormone production in domestic animals. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 25, n. 1, p. 1-16, 2012.

MORIKAWA, H.; OKAMURA, H.; TAKENAKA, A.; MORIMOTO, K.; NISHIMURA, T. Physiological study of the human mesotubarium ovarica. **Obstetrics & Gynecology**, v. 55, n. 4, p. 493-496, 1980.

MORISHITA, T.; NOZAKI, M.; SANO, M.; YOKOYAMA, M.; NAKAMURA, G.; NAKANO, H. Changes in phospholipase A2 activity of the rabbit ampullary epithelium by ovarian steroids. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 48, n. 4, p. 315-318, 1993.

MURAKAMI, A.; TAKAHASHI, K. The role of calcium in the control of ciliary movement in Mytilus-II. **Journal of the Faculty of Science, the University of Tokyo**, v. 13, Section IV Zoology, p. 6, 1975.

NAITOH, Y.; KANEKO, H. Control of Ciliary Activities by Adenosinetriphosphate and Divalent Cations in Triton-Extracted Models of Paramecium Caudatum. **Journal of Experimental Biology**, v. 58, n. 3, p. 657-676, 1973.

NAKAHARI, T.; NISHIMURA, A.; SHIMAMOTO, C.; SAKAI, A.; KUWABARA, H.; NAKANO, T.; TANAKA, S.; KOHDA, Y.; MATSUMURA, H.; MORI, H. The regulation of ciliary beat frequency by ovarian steroids in the guinea pig Fallopian tube: interactions between oestradiol and progesterone. **Biomedical Research**, v. 32, n. 5, p. 321-328, 2011.

NANCARROW, C. D.; HILL, J. L. Oviduct proteins in fertilization and early embryo development. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement**, v. 49, p. 3-13, 1995.

NARUMIYA, S.; SUGIMOTO, Y.; USHIKUBI, F. **Prostanoid Receptors: Structures, Properties, and Functions**, 1999, v.79. 1193-1226 p.

NASSER, L. F.; SÁ FILHO, M. F.; REIS, E. L.; REZENDE, C. R.; MAPLETOFT, R. J.; BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S. Exogenous progesterone enhances ova and embryo quality following superstimulation of the first follicular wave in Nelore (*Bos indicus*) donors. **Theriogenology**, v. 76, n. 2, p. 320-327, 2011.

NEGISHI, M.; SUGIMOTO, Y.; ICHIKAWA, A. Molecular mechanisms of diverse actions of prostanoid receptors. **Biochim Biophys Acta**, v. 26, n. 1, p. 109-119, 1995.

NEGLIA, G.; GASPARRINI, B.; CARACCILO DI BRIENZA, V.; DI PALO, R.; CAMPANILE, G.; ANTONIO PRESICCE, G.; ZICARELLI, L. Bovine and buffalo in vitro embryo production using oocytes derived from abattoir ovaries or collected by transvaginal follicle aspiration. **Theriogenology**, v. 59, n. 5–6, p. 1123-1130, 2003.

NEGLIA, G.; GASPARRINI, B.; CARACCILO DI BRIENZA, V.; DI PALO, R.; ZICARELLI, L. First pregnancies carried to term after transfer of vitrified buffalo embryos entirely produced in vitro. **Veterinary Research Communications**, v. 1, p. 233-236, 2004.

NEGLIA, G.; GASPARRINI, B.; VECCHIO, D.; RUBESSA, M.; PALO, R.; ZICARELLI, L.; CAMPANILE, G. Progesterone supplementation during multiple ovulation treatment in buffalo species (*Bubalus bubalis*). **Tropical Animal Health and Production**, v. 42, n. 6, p. 1243-1247, 2010.

NIEDER, J.; AUGUSTIN, W. Prostaglandin E and F profiles in human fallopian tubes during different phases of the menstrual cycle. **Gynecologic and Obstetric Investigation**, v. 21, n. 4, p. 202-207, 1986.

NISHIMURA, A.; SAKUMA, K.; SHIMAMOTO, C.; ITO, S.; NAKANO, T.; DAIKOKU, E.; OHMICH, M.; USHIROYAMA, T.; UEKI, M.; KUWABARA, H.; MORI, H.; NAKAHARI, T. Ciliary beat frequency controlled by oestradiol and progesterone during ovarian cycle in guinea-pig Fallopian tube. **Experimental Physiology**, v. 95, n. 7, p. 819-828, 2010.

NUTU, M.; WEIJDEGÅRD, B.; THOMAS, P.; BERGH, C.; THURIN-KJELLBERG, A.; PANG, Y.; BILLIG, H.; LARSSON, D. G. J. Membrane progesterone receptor gamma: Tissue distribution and expression in ciliated cells in the fallopian tube. **Molecular Reproduction and Development**, v. 74, n. 7, p. 843-850, 2007.

NUTU, M.; WEIJDEGARD, B.; THOMAS, P.; THURIN-KJELLBERG, A.; BILLIG, H.; LARSSON, D. G. Distribution and hormonal regulation of membrane progesterone receptors beta and gamma in ciliated epithelial cells of mouse and human fallopian tubes. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 7, n. 89, p. 1477-7827, 2009.

OBA, E.; COELHO, K. M.; VIEIRA, R. J.; PINTO, N. F.; CHACUR, M. G. M.; FERREIRA, J. C. P.; KANAGAWA, H. Estudo preliminar de superovulação e colheita de embriões em búfalas. **Zootecnia**, v. 32, p. 23, 1994.

OKAMURA, H.; MORIKAWA, H.; OSHIMA, M.; MAN-I, M.; NISHIMURA, T. A morphologic study of mesotubarium ovarica in the human. **Obstetrics & Gynecology**, v. 49, n. 2, p. 5, 1977.

ORLICKY, D. J.; WILLIAMS-SKIPP, C. Immunohistochemical localization of PGF₂ alpha receptor in the rat oviduct. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 48, n. 2, p. 185-192, 1993.

OSADA, H.; KIYOSHI FUJII, T.; TSUNODA, I.; TAKAGI, K.; SATOH, K.; KANAYAMA, K.; ENDO, T. Fimbrial Capture of the Ovum and Tubal Transport of the Ovum in the Rabbit, with Emphasis on the Effects of $\beta(2)$ -Adrenoreceptor Stimulant and Prostaglandin F(2) α on the Intraluminal Pressures of the Tubal Ampullae. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 16, n. 7, p. 373-379, 1999.

PACE, M. C.; THOMAS, P. Activation of a pertussis toxin-sensitive, inhibitory G-protein is necessary for steroid-mediated oocyte maturation in spotted seatrout. **Developmental Biology**, v. 285, n. 1, p. 70-79, 2005.

PALTIELI, Y.; EIBSCHITZ, I.; ZISKIND, G.; OHEL, G.; SILBERMANN, M.; WEICHSELBAUM, A. High Progesterone Levels and Ciliary Dysfunction—A Possible Cause of Ectopic Pregnancy. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 17, n. 2, p. 103-106, 2000.

PAPATHANASIOU, A.; DJAHANBAKHCH, O.; SARIDOGAN, E.; LYONS, R. A. The effect of interleukin-6 on ciliary beat frequency in the human fallopian tube. **Fertility and Sterility**, v. 90, n. 2, p. 391-394, 2008.

PAUERSTEIN, C. J.; HODGSON, B. J.; FREMMING, B. D.; MARTIN, J. E. Effects of sympathetic denervation of the rabbit oviduct on normal ovum transport and on transport modified by estrogen and progesterone. **Gynecology and Obstetric Investigation**, v. 5, n. 3, p. 121-132, 1974.

PAVLOK, A.; KOUTECKÁ, L.; KREJČÍ, P.; SLAVÍK, T.; CERMAN, J.; SLABA, J.; DORN, D. Effect of recombinant bovine somatotropin on follicular growth and quality of oocytes in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 41, n. 3-4, p. 183-192, 1996.

POLLOW, K.; INTHRAPHUVASAK, J.; MANZ, B.; GRILL, H. J.; POLLOW, B. A comparison of cytoplasmic and nuclear estradiol and progesterone receptors in human fallopian tube and endometrial tissue. **Fertility and Sterility**, v. 36, n. 5, p. 615-622, 1981.

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. Ovarian follicular dynamics and hormonal profiles in heifer and mixed-parity Mediterranean Italian buffaloes (*Bubalus bubalis*) following an estrus synchronization protocol. **Theriogenology**, v. 61, n. 7-8, p. 1343-1355, 2004.

PRIEDKALNS, J. Female reproductive system. In: Dellmann, H. D., BROWN, E. M. (Ed.). **Histologia Veterinária** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982, p.255-278.

PRIYADARSANA, M.; WIJAYAGUNAWARDANE, B.; MIYAMOTO, A. Endothelin-1 System in the Bovine Oviduct: a Regulator of Local Contraction and Gamete Transport. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 44, p. S248-S251, 2004.

QIU, H. B.; LU, S. S.; JI, K. L.; SONG, X. M.; LU, Y. Q.; ZHANG, M.; LU, K. H. Membrane progesterin receptor beta (mPR-beta): a protein related to cumulus expansion that is involved in in vitro maturation of pig cumulus-oocyte complexes. **Steroids**, v. 73, n. 14, p. 1416-1423, 2008.

RAJKUMAR, K.; GARG, S. K.; SHARMA, P. L. Relationship between concentration of prostaglandins E and F in the regulation of ovum transport in rabbits. **Prostaglandins and Medicine**, v. 2, n. 6, p. 445-454, 1979.

RASOLOMBOAHANGINJATOVO, H. S.; CHORFI, Y.; DUPRAS, R.; MILLS, L.; LEFEBVRE, R. Effect of superovulation on uterine and serum biochemical parameters and its potential association with transferable embryos in Holstein dairy cows. **Journal of Veterinary Science**, v. 15, n. 2, p. 273-281, 2014.

REICHENBACH, H. D.; OLIVEIRA, M. A. L.; LIMA, P. F.; SANTOS FILHO, A. S.; ANDRADE, J. C. O. Transferência e criopreservação de embriões bovinos. In: GONÇALVES, P. B. D., FIGUEIREDO, J. R., FREITAS, V. J. F. (Ed.). **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. São Paulo: Ed. Varela, 2002. v.1ª ed., p.153-160.

RHODES, F. M.; DE'ATH, G.; ENTWISTLE, K. W. Animal and temporal effects on ovarian follicular dynamics in Brahman heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 38, n. 4, p. 265-277, 1995.

RICHARDS, J. S. Ovulation: new factors that prepare the oocyte for fertilization. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 234, n. 1-2, p. 75-79, 2005.

RIEHL, R. M.; HARPER, M. J. K. Changes in Prostaglandin Binding Capacity to Single Oviductal Smooth Muscle Cells after Ovulation in the Rabbit. **Endocrinology**, v. 109, n. 4, p. 1011-1016, 1981.

RITTLING, S. R.; MATSUMOTO, H. N.; MCKEE, M. D.; NANJI, A.; AN, X.-R.; NOVICK, K. E.; KOWALSKI, A. J.; NODA, M.; DENHARDT, D. T. Mice Lacking Osteopontin Show Normal Development and Bone Structure but Display Altered Osteoclast Formation In Vitro. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 13, n. 7, p. 1101-1111, 1998.

- ROBERSON, M. S.; WOLFE, M. W.; STUMPF, T. T.; KITTOCK, R. J.; KINDER, J. E. Luteinizing hormone secretion and corpus luteum function in cows receiving two levels of progesterone. **Biology of Reproduction**, v. 41, n. 6, p. 997-1003, 1989.
- ROBITAILLE, G.; ST-JACQUES, S.; POTIER, M.; BLEAU, G. Characterization of an oviductal glycoprotein associated with the ovulated hamster oocyte. **Biology of Reproduction**, v. 38, n. 3, p. 687-694, 1988.
- RODRÍGUEZ, C.; KILLIAN, G. Identification of ampullary and isthmic oviductal fluid proteins that associate with the bovine sperm membrane. **Animal Reproduction Science**, v. 54, n. 1, p. 1-12, 1998.
- ROMERO, A.; ALBERT, J.; BRINK, Z.; SEIDEL JR, G. E. Numbers of small follicles in ovaries affect superovulation response in cattle. **Theriogenology**, v. 35, p. 265, 1991.
- ROSSELLI, M.; IMTHURN, B.; MACAS, E.; KELLER, P. J. Endothelin production by bovine oviduct epithelial cells. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 101, n. 1, p. 27-30, 1994.
- RUCKEBUSCH, Y.; BAYARD, F. MOTILITY OF THE OVIDUCT AND UTERUS OF THE COW DURING THE OESTROUS CYCLE. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 43, n. 1, p. 23-32, 1975.
- SAKSENA, S. K.; HARPER, M. J. K. Relationship Between Concentration of Prostaglandin F (PGF) in the Oviduct and Egg Transport in Rabbits. **Biology of Reproduction**, v. 13, n. 1, p. 68-76, 1975.
- SALIBA, W. P.; DRUMOND, R. M.; BAYÃO, E. X.; ALVIM, M. T.; BARUSELLI, P. S.; GIMENES, L. U.; LEITE, R. L.; BASTIANETTO, E.; GASPARRINI, B. Efficiency of OPU-IVF-ET of fresh and vitrified embryos in buffalo. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, p. 404, 2011.
- SANTOS, J. E. P.; CERRI, R. L. A.; SARTORI, R. Nutritional management of the donor cow. **Theriogenology**, v. 69, n. 1, p. 88-97, 2008.
- SANTOS, S. S. D.; BIONDI, F. C.; CORDEIRO, M. S.; MIRANDA, M. S.; DANTAS, J. K.; FIGUEIREDO, J. R.; OHASHI, O. M. Isolation, follicular density, and culture of preantral follicles of buffalo fetuses of different ages. **Animal Reproduction Science**, v. 95, n. 1-2, p. 1-15, 2006.
- SARIDOGAN, E.; DJAHANBAKHCH, O.; PUDDEFOOT, J. R.; DEMETROULIS, C.; COLLINGWOOD, K.; MEHTA, J. G.; VINSON, G. P. Angiotensin II receptors and angiotensin II stimulation of ciliary activity in human fallopian tube. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 81, n. 7, p. 2719-2725, 1996.

SARTORELLI, E. S.; CARVALHO, L. M.; BERGFELT, D. R.; GINTHER, O. J.; BARROS, C. M. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. **Theriogenology**, v. 63, n. 9, p. 2382-2394, 2005.

SATIR, P. Ionophore-mediated calcium entry induces mussel gill ciliary arrest. **Science**, v. 190, n. 4214, p. 586-588, 1975.

SCHALLENBERGER, E.; WAGNER, H. G.; PAPA, R.; HARTL, P.; TENHUMBERG, H. Endocrinological evaluation of the induction of superovulation with PMSG in water buffalo (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, v. 34, n. 2, p. 379-392, 1990.

SCHÄTZ, G.; SCHNEITER, M.; RIČKA, J.; KÜHNI-BOGHENBOR, K.; TSCHANZ, S. A.; DOHERR, M. G.; FRENZ, M.; STOFFEL, M. H. Ciliary Beating Plane and Wave Propagation in the Bovine Oviduct. **Cells Tissues Organs**, v. 198, n. 6, p. 457-469, 2013.

SENIOR, J.; MARSHALL, K.; SANGHA, R.; CLAYTON, J. K. In vitro characterization of prostanoid receptors on human myometrium at term pregnancy. **British Journal of Pharmacology**, v. 108, n. 2, p. 501-506, 1993.

SHAW, D. W.; FARIN, P. W.; WASHBURN, S. P.; BRITT, J. H. Effect of retinol palmitate on ovulation rate and embryo quality in superovulated cattle. **Theriogenology**, v. 44, n. 1, p. 51-58, 1995.

SIEMIENIUCH, M. J.; WOCLAWEK-POTOCKA, I.; DEPTULA, K.; OKUDA, K.; SKARZYNSKI, D. J. Effects of Tumor Necrosis Factor- α and Nitric Oxide on Prostaglandins Secretion by the Bovine Oviduct Differ in the Isthmus and Ampulla and Depend on the Phase of the Estrous Cycle. **Experimental Biology and Medicine**, v. 234, n. 9, p. 1056-1066, 2009.

SILVA, J. C. C.; ALVAREZ, R. H.; ZANENGA, C. A.; PEREIRA, G. T. Factors affecting embryo production in superovulated Nelore cattle. **Animal Reproduction**, v. 6, n. 3, p. 440-445, 2009.

SINGH, J.; DOMÍNGUEZ, M.; JAISWAL, R.; ADAMS, G. P. A simple ultrasound test to predict the superstimulatory response in cattle. **Theriogenology**, v. 62, n. 1-2, p. 227-243, 2004.

SIROIS, J.; SAYASITH, K.; BROWN, K. A.; STOCK, A. E.; BOUCHARD, N.; DORÉ, M. Cyclooxygenase-2 and its role in ovulation: a 2004 account. **Human Reproduction Update**, v. 10, n. 5, p. 373-385, 2004.

SLEITER, N.; PANG, Y.; PARK, C.; HORTON, T. H.; DONG, J.; THOMAS, P.; LEVINE, J. E. Progesterone Receptor A (PR(A)) and PR(B)-Independent Effects of Progesterone on Gonadotropin-Releasing Hormone Release. **Endocrinology**, v. 150, n. 8, p. 3833-3844, 2009.

- SMITH, W. L.; DEWITT, D. L.; GARAVITO, R. M. CYCLOOXYGENASES: Structural, Cellular, and Molecular Biology. **Annual Review of Biochemistry**, v. 69, n. 1, p. 145-182, 2000.
- SONGSASEN, N.; YIENGVISAVAKUL, V.; BUNTARACHA, B.; PHAREE, S.; APIMETEETUMRONG, M.; SUKWONGS, Y. Effect of treatment with recombinant bovine somatotropin on responses to superovulatory treatment in swamp buffalo (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, v. 52, n. 3, p. 377-384, 1999.
- SOUZA, A. H.; SILVA, E. P.; CUNHA, A. P.; GUMEN, A.; AYRES, H.; BRUSVEEN, D. J.; GUENTHER, J. N.; WILTBANK, M. C. Ultrasonographic evaluation of endometrial thickness near timed AI as a predictor of fertility in high-producing dairy cows. **Theriogenology**, v. 75, n. 4, p. 722-733, 2011.
- SPILMAN, C. H.; HARPER, M. J. K. Effect of Prostaglandins on Oviduct Motility in Estrous Rabbits. **Biology of Reproduction**, v. 9, n. 1, p. 36-45, 1973.
- SPILMAN, C. H.; HARPER, M. J. Effects of prostaglandins on oviductal motility and egg transport. **Gynecology and Obstetric Investigation**, v. 6, n. 3-4, p. 186-205, 1975.
- STAROS, A. L.; KILLIAN, G. J. In vitro association of six oviductal fluid proteins with the bovine zona pellucida. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 112, n. 1, p. 131-137, 1998.
- STERIN-SPEZIALE, N.; GIMENO, M. F.; ZAPATA, C.; BAGNATI, P. E.; GIMENO, A. L. The effect of neurotransmitters, bradykinin, prostaglandins, and follicular fluid on spontaneous contractile characteristics of human fimbriae and tubo-ovarian ligaments isolated during different stages of the sexual cycle. **International Journal of Fertility & Sterility**, v. 23, n. 1, p. 1-11, 1978.
- STOCK, A. E.; FORTUNE, J. E. Ovarian follicular dominance in cattle: relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. **Endocrinology**, v. 132, n. 3, p. 1108-1114, 1993.
- STOMMEL, E. W.; STEPHENS, R. E. Cyclic AMP and calcium in the differential control of *Mytilus* gill cilia. **J Comp Physiol A**, v. 157, n. 4, p. 451-459, 1985.
- STRINGFELLOW, D. A.; SEIDEL, S. M. **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões**: secondary title. Illinois, 1998. 3, 180 p.
- SUKOCHEVA, O. A.; YANG, Y.; GIERTHY, J. F. Estrogen and progesterone interactive effects in postconfluent MCF-7 cell culture. **Steroids**, v. 74, n. 4-5, p. 410-418, 2009.

SUTTON, R.; NANCARROW, C. D.; WALLACE, A. L. C.; RIGBY, N. W. Identification of an oestrus-associated glycoprotein in oviducal fluid of the sheep. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 72, n. 2, p. 415-422, 1984.

SUTTON, R.; NANCARROW, C. D.; WALLACE, A. L. C. Oestrogen and seasonal effects on the production of an oestrus-associated glycoprotein in oviducal fluid of sheep. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 77, n. 2, p. 645-653, 1986.

TALBOT, P.; GEISKE, C.; KNOLL, M. Oocyte Pickup by the Mammalian Oviduct. **Molecular Biology of the Cell**, v. 10, n. 1, p. 5-8, 1999.

TALBOT, P.; SHUR, B. D.; MYLES, D. G. Cell Adhesion and Fertilization: Steps in Oocyte Transport, Sperm-Zona Pellucida Interactions, and Sperm-Egg Fusion. **Biology of Reproduction**, v. 68, n. 1, p. 1-9, 2003.

TAMM, S. L.; TAMM, S. Ciliary reversal without rotation of axonemal structures in ctenophore comb plates. **The Journal of Cell Biology**, v. 89, n. 3, p. 495-509, 1981.

TANEJA, M.; TOTEY, S. M.; ALI, A. Seasonal variation in follicular dynamics of superovulated Indian water buffalo. **Theriogenology**, v. 43, n. 2, p. 451-464, 1995.

TANEJA, M.; SINGH, G.; TOTEY, S. M.; ALI, A. Follicular dynamics in water buffalo superovulated in presence or absence of a dominant follicle. **Theriogenology**, v. 44, n. 4, p. 581-597, 1995.

TASH, J. S.; MEANS, A. R. Regulation of protein phosphorylation and motility of sperm by cyclic adenosine monophosphate and calcium. **Biology of Reproduction**, v. 26, n. 4, p. 745-763, 1982.

TEILMANN, S. C.; CLEMENT, C. A.; THORUP, J.; BYSKOV, A. G.; CHRISTENSEN, S. T. Expression and localization of the progesterone receptor in mouse and human reproductive organs. **Journal of Endocrinology**, v. 191, n. 3, p. 525-535, 2006.

THATCHER, W. W.; BILBY, T. R.; BARTOLOME, J. A.; SILVESTRE, F.; STAPLES, C. R.; SANTOS, J. E. P. Strategies for improving fertility in the modern dairy cow. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 30-44, 2006.

THOMAS, J. A.; JONES, E. J. Anticoncepcionais Orais. In: Bevan, J. A. (Ed.). **Fundamentos de Farmacologia: introdução aos princípios de ação de drogas**. São Paulo: Harper & Row do Brasil, 1979, p.336-341.

TUBBS, C.; THOMAS, P. Progesterone Signaling through an Olfactory G Protein and Membrane Progesterone Receptor- α in Atlantic Croaker Sperm: Potential Role in Induction of Sperm Hypermotility. **Endocrinology**, v. 150, n. 1, p. 473-484, 2009.

VAN TY, L.; CHUPIN, D.; DRIANCOURT, M. A. Ovarian follicular populations in buffaloes and cows. **Animal Reproduction Science**, v. 19, n. 3-4, p. 171-178, 1989.

VECCHIO, D.; NEGLIA, G.; DI PALO, R.; CAMPANILE, G.; BALESTRIERI, M. L.; GIOVANE, A.; KILLIAN, G.; ZICARELLI, L.; GASPARRINI, B. Ion, Protein, Phospholipid and Energy Substrate Content of Oviduct Fluid During the Oestrous Cycle of Buffalo (*Bubalus bubalis*). **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, n. 5, p. e32-e39, 2010.

VERDUGO, P.; RUMERY, R. E.; LEE, W. I. Calcium-induced activation of ciliary activity in mammalian ciliated cells. **The Journal of Cell Biology**, v. 75, p. 293, 1977.

VERDUGO, P.; RUMERY, R. E.; TAM, P. Y. Hormonal control of oviductal ciliary activity: effect of prostaglandins. **Fertility and Sterility**, v. 33, n. 2, p. 193-196, 1980.

VERDUGO, P. Ca^{2+} -dependent hormonal stimulation of ciliary activity. **Nature**, v. 283, n. 5749, p. 764-765, 1980.

VERHAGE, H. G.; FAZLEABAS, A. T.; DONNELLY, K. The in Vitro Synthesis and Release of Proteins by the Human Oviduct. **Endocrinology**, v. 122, n. 4, p. 1639-1645, 1988.

VERHAGE, H. G.; FAZLEABAS, A. T. The in Vitro Synthesis of Estrogen-Dependent Proteins by the Baboon (*Papio anubis*) Oviduct. **Endocrinology**, v. 123, n. 1, p. 552-558, 1988.

VILLALON, M.; VERDUGO, P. Hormonal regulation of ciliary function in the oviduct: the effect of beta-adrenergic agonists. **Progress in Clinical & Biological Research**, v. 80, p. 59-65, 1982.

VILLALÓN, M.; HINDS, T. R.; VERDUGO, P. Stimulus-response coupling in mammalian ciliated cells. Demonstration of two mechanisms of control for cytosolic $[\text{Ca}^{2+}]$. **Biophysical Journal**, v. 56, n. 6, p. 1255-1258, 1989.

VOS, P. L. A. M.; VAN DER SCHANS, A.; DE WIT, A. A. C.; BEVERS, M. M.; WILLEMSE, A. H.; DIELEMAN, S. J. Effects of neutralization of pregnant mares' serum gonadotrophin (PMSG) shortly before or at the preovulatory LH surge in PMSG-superovulated heifers on follicular function and development. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 100, n. 2, p. 387-393, 1994.

WÅNGGREN, K.; LALITKUMAR, P. G.; STAVREUS-EVERS, A.; STÅBI, B.; GEMZELL-DANIELSSON, K. Prostaglandin E2 and F2 α receptors in the human Fallopian tube before and after mifepristone treatment. **Molecular Human Reproduction**, v. 12, n. 9, p. 577-585, 2006.

WAY, A.; GONCALVES, R. F.; KILLIAN, G. J. Influence of osteopontin, lipocalin prostaglandin d synthase and bovine serum albumin on sperm-oocyte binding and in vitro fertilization **Theriogenology**, v. 57, p. 669, 2002.

WEBER, J. A.; FREEMAN, D. A.; VANDERWALL, D. K.; WOODS, G. L. Prostaglandin E2 hastens oviductal transport of equine embryos. **Biology of Reproduction**, v. 45, n. 4, p. 544-546, 1991.

WESSEL, T.; SCHUCHTER, U.; WALT, H. Ciliary Motility in Bovine Oviducts for Sensing Rapid Non-genomic Reactions upon Exposure to Progesterone. **Hormone and Metabolic Research**, v. 36, n. 03, p. 136-141, 2004.

WIJAYAGUNAWARDANE, M.; MIYAMOTO, A.; TAQUAHASHI, Y.; GABLER, C.; ACOSTA, T.; NISHIMURA, M.; KILLIAN, G.; SATO, K. In vitro regulation of local secretion and contraction of the bovine oviduct: stimulation by luteinizing hormone, endothelin-1 and prostaglandins, and inhibition by oxytocin. **Journal of Endocrinology**, v. 168, n. 1, p. 117-130, 2001.

WIJAYAGUNAWARDANE, M. P. B.; MIYAMOTO, A.; CERBITO, W. A.; ACOSTA, T. J.; TAKAGI, M.; SATO, K. Local distributions of oviductal estradiol, progesterone, prostaglandins, oxytocin and endothelin-1 in the cyclic cow. **Theriogenology**, v. 49, n. 3, p. 607-618, 1998.

WIJAYAGUNAWARDANE, M. P. B.; MIYAMOTO, A.; SATO, K. Prostaglandin E2, prostaglandin f2 α and endothelin-1 production by cow oviductal epithelial cell monolayers: Effect of progesterone, estradiol 17 β , oxytocin and luteinizing hormone. **Theriogenology**, v. 52, n. 5, p. 791-801, 1999.

WIJAYAGUNAWARDANE, M. P. B.; CHOI, Y. H.; MIYAMOTO, A.; KAMISHITA, H.; FUJIMOTO, S.; TAKAGI, M.; SATO, K. Effect of ovarian steroids and oxytocin on the production of prostaglandin E2, prostaglandin F2 α and endothelin-1 from cow oviductal epithelial cell monolayers in vitro. **Animal Reproduction Science**, v. 56, n. 1, p. 11-17, 1999.

WIJAYAGUNAWARDANE, M. P. B.; MIYAMOTO, A.; TAQUAHASHI, Y.; ACOSTA, T. J.; NISHIMURA, M.; SATO, K. Angiotensin II and Atrial Natriuretic Peptide in the Cow Oviductal Contraction In Vitro: Direct Effect and Local Secretion of Prostaglandins, Endothelin-1, and Angiotensin II. **Biology of Reproduction**, v. 65, n. 3, p. 799-804, 2001.

WIJAYAGUNAWARDANE, M. P. B.; GABLER, C.; KILLIAN, G.; MIYAMOTO, A. Tumor Necrosis Factor α in the Bovine Oviduct During the Estrous Cycle: Messenger RNA Expression

and Effect on Secretion of Prostaglandins, Endothelin-1, and Angiotensin II. **Biology of Reproduction**, v. 69, n. 4, p. 1341-1346, 2003.

WIJAYAGUNAWARDANE, M. P. B.; MIYAMOTO, A. Tumor Necrosis Factor alpha System in the Bovine Oviduct: A Possible Mechanism for Embryo Transport. **Journal of Reproduction and Development**, v. 50, n. 1, p. 57-62, 2004.

WIJAYAGUNAWARDANE, M. P. B.; KODITHUWAKKU, S. P.; YAMAMOTO, D.; MIYAMOTO, A. Vascular endothelial growth factor system in the cow oviduct: A possible involvement in the regulation of oviductal motility and embryo transport. **Molecular Reproduction and Development**, v. 72, n. 4, p. 511-520, 2005.

WIJAYAGUNAWARDANE, M. P. B.; KODITHUWAKKU, S. P.; DE SILVA, N. T.; MIYAMOTO, A. Angiotensin II Secretion by the Bovine Oviduct is Stimulated by Luteinizing Hormone and Ovarian Steroids. **Journal of Reproduction and Development**, v. 55, n. 5, p. 570-575, 2009.

WILLIS, P.; SEKHAR, K. N.; BROOKS, P.; FAYRER-HOSKEN, R. A. Electrophoretic characterization of equine oviductal fluid. **Journal of Experimental Zoology**, v. 268, n. 6, p. 477-485, 1994.

WILTBANK, M. C.; SOUZA, A. H.; CARVALHO, P. D.; BENDER, R. W.; NASCIMENTO, A. B. Improving fertility to timed artificial insemination by manipulation of circulating progesterone concentrations in lactating dairy cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 24, n. 1, p. 238-243, 2011.

WLODAWER, P.; KINDAHL, H.; HAMBERG, M. Biosynthesis of prostaglandin F2 α from arachidonic acid and prostaglandin endoperoxides in the uterus. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism**, v. 431, n. 3, p. 603-614, 1976.

XU, Z.; GARVERICK, H. A.; SMITH, G. W.; SMITH, M. F.; HAMILTON, S. A.; YOUNGQUIST, R. S. Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. **Biology of Reproduction**, v. 53, n. 4, p. 951-957, 1995.

YAZAWA, T.; UESAKA, M.; INAOKA, Y.; MIZUTANI, T.; SEKIGUCHI, T.; KAJITANI, T.; KITANO, T.; UMEZAWA, A.; MIYAMOTO, K. Cyp11b1 is induced in the murine gonad by luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin and involved in the production of 11-ketotestosterone, a major fish androgen: conservation and evolution of the androgen metabolic pathway. **Endocrinology**, v. 149, n. 4, p. 1786-1792, 2008.

YAZAWA, T.; KAWABE, S.; KANNO, M.; MIZUTANI, T.; IMAMICHI, Y.; JU, Y.; MATSUMURA, T.; YAMAZAKI, Y.; USAMI, Y.; KURIBAYASHI, M.; SHIMADA, M.;

KITANO, T.; UMEZAWA, A.; MIYAMOTO, K. Androgen/androgen receptor pathway regulates expression of the genes for cyclooxygenase-2 and amphiregulin in periovulatory granulosa cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 369, n. 1-2, p. 42-51, 2013.

ZHU, Y.; BOND, J.; THOMAS, P. Identification, classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progesterin receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 5, p. 2237-2242, 2003.

ZHU, Y.; RICE, C. D.; PANG, Y.; PACE, M.; THOMAS, P. Cloning, expression, and characterization of a membrane progesterin receptor and evidence it is an intermediary in meiotic maturation of fish oocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 5, p. 2231-2236, 2003.

ZICARELLI, L. Recenti acquisizioni sull'attività riproduttiva nella bufala. . In: Meeting Nazionale, 4, 1992, Bergamo, p. 9-39.

ZICARELLI, L.; BONI, R.; PACELLI, C.; ESPOSITO, L.; SPADETTA, M. Superovulation in Italian Mediterranean buffaloes using FSH-p with different treatments. In: World Buffalo Congress, 4, 1994a, São Paulo, p. 462-464.

ZICARELLI, L.; DI PAOLO, R.; CAMPANILE, E.; BONI, R.; LANGELLA, M. RBST +FSH-p in superovulatory treatment of Italian Mediterranean buffaloes. In: World Buffalo Congress, 4, 1994b, São Paulo, p. 459-461.

ZICARELLI, L. Superovulatory response in buffalo bred in Italy **Bubalus bubalis**, v. 4, p. 167-188, 1997a.

ZICARELLI, L. **Reproductive seasonality in buffalo**: secondary title. Caserta, Italy, 1997b, 29-52 p.

ZICARELLI, L.; P.S., B.; CAMPANILE, G.; DI PAOLO, R.; GASPARRINI, B.; NEGLIA, G.; D'OCCHIO, M. J. Embryo recovery in buffalo with timed ovulation and insemination subsequent to follicle superstimulation. In: International Congress of Animal Reproduction, 14, 2000, Stockholm:Repro Print AB, p. 125.