

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

JÚLIO CÉSAR BARBOZA DA SILVA

**“Sazonalidade reprodutiva em búfalas: efeitos na
produção *in vitro* de embriões e nas taxas de concepção
utilizando embriões criopreservados.”**

JÚLIO CÉSAR BARBOZA DA SILVA

**“Sazonalidade reprodutiva em búfalas: efeitos na
produção *in vitro* de embriões e nas taxas de concepção
utilizando embriões criopreservados.”**

“Versão corrigida”

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos da Universidade de São
Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção
do título de Doutor em Ciências do programa de
Pós-graduação em Biociência Animal.

Área de
Concentração:
Biociência
Animal

Orientador:
Prof. Dr. Felipe Perecin

Pirassununga

2020

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S586s Silva, Júlio César Barboza
Sazonalidade reprodutiva em búfalas: efeitos na
produção *in vitro* de embriões e nas taxas de
concepção utilizando embriões criopreservados /
Júlio César Barboza Silva ; orientador Felipe
Perecin. -- Pirassununga, 2020.
88 f.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em
Bióciência Animal) -- Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

1. Búfala. 2. Embrião. 3. Sazonalidade. 4.
Competência oocitária. 5. Receptividade uterina. I.
Perecin, Felipe, orient. II. Título.

Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte - o autor

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Júlio César Barboza da Silva

Título: “Sazonalidade reprodutiva em búfalas: efeitos na produção *in vitro* de

embriões e nas taxas de concepção utilizando embriões criopreservados.”

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências do programa de Pós-graduação em Biociência Animal.

Data: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito do método de criopreservação de embriões bubalinos na taxa de concepção durante a estação reprodutiva favorável e desfavorável", protocolada sob o CEUA nº 3571250818, sob a responsabilidade de **Júlio César Barboza da Silva** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo - FZEA/USP (CEUA/FZEA) na reunião de 04/12/2018.

We certify that the proposal "Effect of buffalo embryos' cryopreservation methods on the conception rate during the favorable and unfavorable reproductive season", utilizing 300 Buffalos (300 females), protocol number CEUA 3571250818, under the responsibility of **Júlio César Barboza da Silva** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Animal Science and Food Engineering - (São Paulo University) (CEUA/FZEA) in the meeting of 12/04/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **10/2018 a 12/2019**

Área: **Biociência Animal**

Origem: **Animais de proprietários**

Espécie: **Bubalinos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **2 a 10 anos**

N: **300**

Linhagem: **Murrah**

Peso: **400 a 800 kg**

Resumo: A espécie bubalina destaca-se no cenário atual da pecuária por sua rusticidade e pelas qualidades nutricionais do leite e da carne. Nesta espécie, o emprego de biotecnologias reprodutivas como a produção in vitro de embriões (PIVE) ainda é incipiente e quando utilizada, dois fatores limitantes devem ser considerados: a transferência de embriões frescos ou vitrificados e a estacionalidade reprodutiva das búfalas. Reduzir a necessidade de utilizar embriões frescos ou vitrificados, pelo uso de embriões congelados para transferência direta; e utilizar receptoras na estação reprodutiva desfavorável, removendo o efeito sazonal das parições e da produção de leite, permitiria intensificar a exploração zootécnica e intensificar o desenvolvimento de programas de melhoramento nesta espécie. Assim, esse projeto propõe investigar a eficiência da produção in vitro de embriões (PIVE) durante a estação reprodutiva favorável (ERF) comparada com a estação reprodutiva desfavorável (ERD). O estudo propõe ainda, comparar as taxas de concepção entre embriões vitrificados (VT) e congelados para transferência direta (TD), produzidos na ERF e ERD. Embriões produzidos na ERF serão transferidos para receptoras na ERF e ERD, mesmo procedimento a ser adotado para os embriões produzidos na ERD. Espera-se, a partir dos resultados deste projeto, mostrar o efeito da estação reprodutiva (ERF ou ERD) das doadoras de oócitos sobre o sucesso da PIVE e comparar as taxas de gestação dos embriões criopreservados (VT e TD) transferidos para receptoras na ERF e ERD. A partir dos resultados deste projeto espera-se determinar se há efeitos oocitários (doadora em ERF e ERD) ou endometriais (receptora em ERF e ERD) influenciando o sucesso reprodutivo na espécie bubalina submetida à PIVE; espera-se também verificar o efeito do método de criopreservação.

Local do experimento: **Fazenda Sesmaria**

Pirassununga, 04 de dezembro de 2018

Prof. Dra. Daniele dos Santos Martins
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo - FZEA/USP

Prof. Dra. Cristiane Gonçalves Titto
Vice-Cordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo - FZEA/USP

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho ao meu avô Pedro Altamiro Prado (*in memoriam*), aos meus pais Joaquim e Wilma, grandes responsáveis por eu ter chegado até aqui e à minha esposa Andrea, companheira de sempre. Mateus e Tiago, meus queridos filhos, que essa obra seja uma inspiração para que vocês estudem e exerçam suas profissões com amor, durante toda a vida!

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por ter me iluminado na execução desse projeto e ao meu orientador, Felipe Perecin, pela clareza e recomendações precisas do início ao fim desse estudo.

Agradeço aos criadores Maria Cecília Almeida Prado e Otávio Bernardes por cederem gentilmente os animais e a estrutura das fazendas para os estudos iniciais desse projeto. A todos da Fazenda Sesmária, iniciando pelo proprietário Fábio Cotrim que acreditou na nossa proposta de conduzir um trabalho científico em um rebanho comercial. Agradecimento especial ao Ramiro Madeira, meu ex-aluno, por ter facilitado minha chegada na fazenda, ao colega Walter Binotti pela imensa ajuda na lida, ao Jota pelo apoio sempre prestativo no escritório, além do Danilo, responsável pelo manejo das doadoras de oócitos e receptoras de embriões.

Agradeço o patrocínio da ABS e seu time incrível! À Andrea Basso pela viabilização do projeto, ao José Henrique F. Pontes pelo apoio de sempre, além do trabalho incansável do Rodrigo Bohrer e Gabriela Lamberti na recepção dos oócitos, produção e criopreservação dos embriões no laboratório de Uberaba/MG e da Júnia Bernardes no fornecimento dos meios para a aspiração folicular e para reaquecimento dos embriões, no laboratório de Mogi Mirim/SP. Fundamental também o apoio dos colegas Rafael Moreira no início do projeto e Kléber Menegon, meu ex-colega de pós-graduação e atual representante técnico da Boheringer-Ingelheim, empresa patrocinadora responsável pelo fornecimento e logística dos medicamentos envolvidos no protocolo para transferência de embriões em tempo fixo (TETF) das receptoras bubalinas.

Agradeço aos professores e amigos Ed Hoffmann e Pietro Baruselli pela viabilização inicial do projeto junto aos patrocinadores, além dos professores Rúbens Arruda, na análise do sêmen, Guilherme Pugliesi, nos trabalhos com a ultrassonografia Doppler, Anneliese Traldi (Kiki), Flávio Meirelles, Juliano Silveira e Roberto Sartori, pela amizade e pelo conhecimento que transmitiram nas conversas informais e durante as disciplinas. Aos colegas da USP que me apoiaram nos manejos e na escrita: Jorge (Colômbia), Alessandra, Bárbara, Damiana, Priscila, Carlos (Colômbia). Em especial ao Carlos Godoy pela enorme colaboração em momentos decisivos!

Meu reconhecimento à colaboração dos colegas de profissão Bruno Bonamichi, Nélcio Carvalho, Júlia Soares, Roberta Ferreira e Maíra Bianchi, além da minha ex-aluna Andresa Oliveira.

Um agradecimento especialíssimo aos meus amigos Antônio Augusto, Débora e Leninha pela hospitalidade genuinamente mineira!

“Se podemos sonhar, também podemos
tornar nossos sonhos realidade.”

Walt Disney

RESUMO

DA SILVA, J. C. B. **Sazonalidade reprodutiva em búfalas: efeitos na produção *in vitro* de embriões e nas taxas de concepção utilizando embriões criopreservados.** 2020. 111f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2020.

A atividade reprodutiva da búfala é influenciada pela sazonalidade, sendo que dias curtos favorecem a ciclicidade e a concepção, impactando a produção leiteira ao longo do ano. A desestacionalização, por meio da produção *in vitro* de embriões (PIVE), criopreservação e ultrassonografia Doppler, são alternativas viáveis para distribuir homoganeamente os partos ao longo do ano. Assim, no **Capítulo I**, aspectos da fisiologia reprodutiva da búfala, PIVE e criopreservação de embriões foram revisados. No **Capítulo II** foram avaliados os efeitos da sazonalidade reprodutiva (SR) de búfalas sobre as taxas de PIVE e de concepção (TCs) com os objetivos de: (I) avaliar o efeito da SR de doadoras de oócitos na recuperação oocitária e produção de embriões; (II) avaliar o efeito da SR de doadoras de oócitos e receptoras de embrião nas TCs; (III) comparar a eficiência da VT e do congelamento em curva lenta para transferência direta (TD) na criopreservação de embriões bubalinos. Para isso, foram realizadas 136 OPUs (*ovum pick-up*) em 102 doadoras. Dessas, 62 OPUs em doadoras na estação reprodutiva favorável (dERF; junho e julho) e 74 OPUs em doadoras na estação reprodutiva desfavorável (dERD; dezembro e janeiro). Os oócitos foram levados para laboratório comercial, embriões foram produzidos *in vitro* e criopreservados por VT ou TD. As receptoras em estação reprodutiva favorável (rERF) ou desfavorável (rERD) foram sincronizadas com protocolo hormonal. A recuperação oocitária foi maior por OPU em dERD comparados às dERF (10,0 vs 7,6, $p=0,0262$), não havendo diferença na produção de embriões por OPU (2,3 vs 1,5; $p=0,6813$). A TC foi maior para embriões originados em dERF comparado às dERD (46,5% vs 22,4%; $p=0,0013$) independentemente da estação reprodutiva da receptora. Não houve diferença na TC entre rERF e rERD (38,0% vs 33,0%; $p=0,5033$, respectivamente) nem entre VT vs TD (30,4% vs 41,4%; $p=0,1466$, respectivamente). No **Capítulo III** foi avaliado o emprego da ultrassonografia Doppler na avaliação de receptoras bubalinas. Os objetivos foram investigar a relação (I) da área e (II) da perfusão sanguínea (PS) do corpo lúteo (CL) nas TCs de rERF e rERD. Para isso, 151 receptoras avaliadas previamente à transferência de embriões (TE) foram agrupadas conforme a área do CL em: pequeno (1,05 – 1,80 cm²), médio (1,81 – 2,20 cm²) e grande (2,22 – 3,26 cm²); e 146 receptoras avaliadas previamente à TE foram agrupadas conforme a PS do CL em: 35-45%, 50-55% e 60-80%. A área do CL foi maior em

rERF em relação à rERD ($2,19 \pm 0,051 \text{ cm}^2$ vs $1,88 \pm 0,049 \text{ cm}^2$; $p < 0,0001$; respectivamente), não havendo efeito da área do CL nas TCs. As TCs foram menores em rERF com baixa PS (TC=19,2%) comparada com rERF com média (TC=47,6%; $p=0,0379$) e alta PS (TC=50,0%; $p=0,0218$). Conclui-se que a melhor época para realizar a PIVE em búfalas é a dERF, sendo que os embriões podem ser criopreservados por VT ou TD e serem transferidos para receptoras tanto em rERF quanto rERD; e que o uso da ultrassonografia Doppler se mostra eficiente em prever receptoras que potencialmente apresentarão TCs superiores.

Palavras-chave: Búfala. Embrião. Sazonalidade. Competência oocitária. Receptividade uterina.

ABSTRACT

DA SILVA, J. C. B. **Reproductive seasonality in buffaloes: effects on *in vitro* embryo production and conception rate using cryopreserved embryos.** 2020. 111P. Ph.D Thesis - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2020.

Reproductive activity in buffalo is influenced by seasonality, in which short days favor cyclicity and conception. This factor is limiting, specially concerning milking activity, because deliveries are less in summer and calves are concentrated in autumn and winter. An alternative would be in order to use *in vitro* embryo production, cryopreservation and Doppler ultrasound to obtain better distribution of deliveries throughout the year. Thus, aspects related to reproductive physiology of female buffalos, IVEP and embryo cryopreservation were revised in **chapter I**. In **chapter II**, the influences of female buffalos 'reproductive seasonality on embryo production and conception rates (CR) with the objectives: I) determine the effect of reproductive seasonality of oocytes donors on oocyte recovery and on embryo production; II) determine the effect of reproductive seasonality of oocytes donors and embryo recipients on CR; III) compare the efficiency of vitrification (VT) and slow freezing for direct transfer (DT). For this, 136 follicular aspirations were carried out (ovum pick up – OPU) in 102 donors, being 62 OPUs were carried out in donors in favorable breeding season (dFBS; June and July) and 74 OPUs in donors in unfavorable breeding season (dNBS; December and January). Oocytes were taken to a commercial laboratory and *in vitro*-produced embryos were cryopreserved by VT or DT. Recipients, in favorable (rFBS) or unfavorable (rNBS) reproductive seasons, were

synchronized with a hormonal protocol. Oocyte recovery by OPU was higher in dNBS in comparison to dFBS (10,0 vs 7,6; $p=0,0262$), and similar for embryo production (2,3 vs 1,5; $p=0,6813$). However, CR was higher when embryos originated from dFBS in comparison to dNBS (46,5% vs 22,4%; $p=0,0013$, respectively) regardless of reproductive season of the recipient. No differences in CR were found comparing rFBS to rNBS (38,0% vs 33,0%; $p=0,5033$, respectively) nor between VT vs DT (30,4% vs 41,4%; $p=0,1466$, respectively). In **chapter III**, the use of Doppler ultrasonography in the evaluation of female buffalo recipients was investigated. Objectives were: verify associations between the (I) area of the *corpus luteum* (CL) and the (II) blood perfusion (BP) of the CL with the CR of rFBS and rNBS. For that, 151 recipients had the CL's area determined, previously to embryo transfer (ET) and divided into three groups: (1), 1,05 – 1,80 cm², (2), 1,81 – 2,20 cm² and (3) 2,22 – 3,26 cm². In order to verify the effects of PS, 146 recipients were evaluated and divided into three groups, according to the percentage of CL with blood flow: 35-45%, 50-55%, and 60-80%. The CL area was larger in rFBS when compared to rNBS ($2,19 \pm 0,051$ cm vs $1,88 \pm 0,049$ cm; $p<0,0001$; respectively), but there was no effect of CL area on CR. Considering BP, if the CR was lower in group of low perfusion (CR=19,2%) compared to CR in rFBS group with medium perfusion (CR=47,6%; $p=0,0379$) and high perfusion (CR=50,0%; $p=0,0218$). It is concluded that the best season for IVEP in female buffalos is dFBS, and cryopreserved embryos may be transferred to recipients in both reproductive seasons resulting in similar CR. Finally, the use of doppler ultrasonography to detect recipients with BP similar or larger than 50% proves efficient to predict recipients that show higher CRs.

Key words: Buffalo. Embryo. Seasonality. Oocyte competence. Uterine receptivity

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Fluxograma referente ao delineamento experimental do projeto. Fêmeas bubalinas em estação reprodutiva favorável (ERF) e desfavorável (ERD) foram submetidas a OPU. Os CCOs resultantes foram utilizados para produção *in vitro* de embriões (PIVE)..... 34
- Figura 2 - Esquema indicando as aspirações foliculares, desvitrificação ou reaquecimento e descongelação para TD realizadas ao longo do experimento, levando-se em consideração a ERF e ERD, distribuídas durante as estações do ano. 35
- Figura 3 - Variação da luminosidade em número de horas ao longo do ano na região de Amparo/SP. As faixas coloridas indicam a luz solar total, crepúsculo (civil, náutico e astronômico) e noite 37
- Figura 4 - Diagramas de Venn representando o número de doadoras submetidas à aspiração folicular.....38
- Figura 5 - Protocolo para transferência de embriões em tempo fixo (TETF), descongelados ou reaquecidos, em receptoras bubalinas. 43
- Figura 6 - Comparação da recuperação oocitária e a produção *in vitro* de embriões bubalinos 46
- Figura 7 - Taxa de concepção de embriões bubalinos produzidos *in vitro* a partir de doadoras de oócitos aspiradas na ERF (dERF) ou ERD (dERD) e transferidos para receptoras em embriões na ERF (rERF) ou ERD (rERD). 47
- Figura 8 - Taxa de concepção aos 30 dias a partir embriões bubalinos criopreservados por vitrificação (VT) ou em curva lenta para transferência direta (TD)..... 49
- Figura 9 - Protocolo para transferência de embriões em tempo fixo (TETF), descongelados ou reaquecidos, em receptoras bubalinas. 60
- Figura 10 - Imagem ultrassonográfica em modos B e doppler das estruturas ovarianas (folículo dominante e corpo lúteo cavitário) de fêmeas bubalinas previamente à TE. 61
- Figura 11 - Distribuição das frequências (histograma) de corpos lúteos (CL) de acordo com a área do CL. No histograma superior está apresentada a distribuição de todas as receptoras avaliadas. Nos histogramas inferiores as frequências estão decompostas para receptoras na estação reprodutiva favorável (ERF) ou desfavorável (ERD)..... 62
- Figura 12 - Média e erro padrão da média da área do CL (cm²) em receptoras bubalinas na estação reprodutiva (rERF) ou desfavorável (rERD). Os números entre parênteses representam o número amostral por grupo..... 63
- Figura 13 - Taxa de concepção (TC) aos 30 dias em receptoras bubalinas dos tercis inferior (1,05 – 1,80 cm²), médio (1,81 – 2,20 cm²) e superior (2,22 – 3,26 cm²) de área do corpo lúteo (CL). 63

Figura 14 - Taxa de concepção (TC) aos 30 dias em receptoras bubalinas na estação reprodutiva favorável (ERF) ou desfavorável (ERD). As receptoras foram agrupadas de acordo com a área do corpo lúteo (CL) nos tercís inferior (1,05 – 1,80 cm ²), médio (1,81 – 2,20 cm ²) e superior (2,22 – 3,26 cm ²)	64
Figura 15 - Taxa de concepção (TC) aos 30 dias em receptoras bubalinas na estação reprodutiva favorável (ERF) ou desfavorável (ERD). As receptoras foram agrupadas de acordo com a perfusão do corpo lúteo (CL) nos tercís inferior (35-45%), médio (50-55%) e superior (60-80%)	65
Figura 16 - Taxa de concepção (TC) aos 30 dias em receptoras bubalinas na estação reprodutiva favorável (rERF). As receptoras foram agrupadas de acordo com a perfusão do corpo lúteo (CL) nos tercís inferior (35-45%), médio (50-55%) e superior (60-80%).	65
Figura 17 - Taxa de concepção (TC) aos 30 dias em receptoras bubalinas na estação reprodutiva desfavorável (rERD). As receptoras foram agrupadas de acordo com a perfusão do corpo lúteo (CL) nos tercís inferior (35-45%), médio (50-55%) e superior (60-80%).	66
Figura 18 - Taxa de produção de embriões dos 4 reprodutores envolvidos no experimento... ..	86
Figura 19 - Desempenho dos touros na produção de embriões, desmembrando suas atuações na ERD e ERF.	86
Figura 20 - Taxa de concepção de embriões produzidos após a FIV, utilizando-se sêmen de 4 diferentes reprodutores bubalinos, durante o experimento.....	87
Figura 21 - Taxa de concepção de embriões produzidos após a fertilização utilizando sêmen de 4 diferentes búfalos, ao longo de 6 sessões de OPU.	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Receptoras utilizadas de acordo com a categoria, novilha ou vaca, na rERF e rERD, recebendo embriões de dERF e dERD.....	43
Tabela 2 - Resultados da recuperação oocitária e produção <i>in vitro</i> de embriões de doadoras bubalinas aspiradas em dia aleatório do ciclo estral na estação reprodutiva favorável (dERF) ou desfavorável (dERD).	45
Tabela 3 - Taxa de concepção aos 30 dias após transferência de embriões bubalinos produzidos <i>in vitro</i> e criopreservados. Os embriões foram produzidos a partir de oócitos de doadoras na ERF (dERF) ou na ERD (dERD) e transferidos para receptoras bubalinas na ERF (rERF) ou na ERD (rERD).	46
Tabela 4 - Taxa de concepção (TC) de embriões bubalinos produzidos <i>in vitro</i> e transferidos para receptoras de embrião de duas diferentes categorias: vacas e novilhas. Os embriões foram produzidos a partir de oócitos de doadoras na ERF (dERF) ou na ERD (dERD) e transferidos para receptoras bubalinas na ERF (rERF) ou na ERD (rERD)	48
Tabela 5 - Taxa de concepção aos 30 dias após transferência de embriões bubalinos produzidos <i>in vitro</i> e criopreservados por vitrificação (VT) ou por congelção em curva lente para transferência direta (TD). Os embriões foram produzidos a partir de oócitos de doadoras na ERF (dERF) ou na ERD (dERD) e transferidos para receptoras bubalinas na ERF (rERF) ou na ERD (rERD)	49
Tabela 6 - Análise por microscopia e uso de sondas fluorescentes de amostras de sêmen provenientes de 4 diferentes búfalos, utilizados na FIV para a produção de embriões.....	85
Tabela 7 - Taxa de produção de embriões e não aptos à criopreservação, em relação aos oócitos destinados ao cultivo <i>in vitro</i> (CIV) utilizando sêmen de 4 diferentes búfalos, sendo que 2 deles foram utilizados na ERF e ERD.	85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMH	hormônio <i>anti-Mülleriano</i>
BE	benzoato de estradiol
BI	blastocisto inicial
BX	blastocisto expandido
BE	blastocisto eclodido
CASA	análise computadorizada da motilidade
CIV	cultivo <i>in vitro</i>
CL	corpo lúteo
COC	complexo <i>cumulus</i> oócito
dERD	doadora em estação reprodutiva desfavorável
dERF	doadora em estação reprodutiva favorável
ECC	escore de condição corporal
eCG	gonadotrofina coriônica equina
ERD	estação reprodutiva desfavorável
ERF	estação reprodutiva favorável
FD	folículo dominante
FIV	fecundação <i>in vitro</i>
GnRH	hormônio liberador de gonadotrofinas
hCG	gonadotrofina coriônica humana
IA	inseminação artificial
IVB	In Vitro Brasil
µl	microlitros
MIV	maturação <i>in vitro</i>
OPS	<i>open pulled straw</i>
OPU	<i>ovum pick-up</i> – aspiração follicular
P4	progesterona
PFA	população de folículos antrais
PGF	prostaglandina F2α
PIV	produzidos <i>in vitro</i>
PIVE	produção <i>in vitro</i> de embriões
PS	perfusão sanguínea
rERD	receptoras em estação reprodutiva desfavorável
rERF	receptora em estação reprodutiva favorável
SOD	superóxido dismutase
TC	taxa de concepção
TD	transferência direta
TE	transferência de embriões
TETF	transferência de embriões em tempo fixo
vs	<i>versus</i>
VT	vitrificação

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	graus <i>Celsius</i>
----	----------------------

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	17
1. REVISÃO DA LITERATURA	17
1.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS BUBALINOS	17
1.2. CARACTERÍSTICAS REPRODUTIVAS DAS BÚFALAS	18
1.2.1. Sazonalidade e melatonina	19
1.3. EFEITOS DO MEIO AMBIENTE NA REPRODUÇÃO.....	21
1.4. PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES	22
1.5. DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO	24
1.6. CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES	26
1.6.1. Métodos de criopreservação	28
1.6.1 Vitrificação e Reaquecimento	28
1.6.1.2 <i>Congelação em curva lenta para transferência direta</i>	29
CAPÍTULO 2	31
2. A SAZONALIDADE REPRODUTIVA INFLUENCIA A COMPETÊNCIA OÓCITÁRIA E EMBRIONÁRIA, MAS NÃO A RECEPTIVIDADE UTERINA EM BÚFALAS”	31
2.1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	31
2.2. HIPÓTESES.....	33
2.3. OBJETIVOS	33
2.4. DESENHO EXPERIMENTAL	34
2.5. MATERIAL E MÉTODOS	35
2.5.1. Local e duração do experimento	35
2.5.2. Definição das estações reprodutivas favorável e desfavorável e período de execução do experimento	36
2.5.3. Doadoras de oócitos	37
2.5.4. Produção in vitro dos embriões bubalinos	38
2.5.4.1. <i>Recuperação oocitária</i>	38
2.5.4.2. <i>Classificação, envase e maturação oocitária</i>	40
2.5.4.3. <i>Preparo do sêmen para a fecundação in vitro (FIV)</i>	40
2.5.4.4. <i>Fecundação in vitro (FIV)</i>	40
2.5.4.5. <i>Cultivo in vitro (CIV)</i>	41
2.5.5. Criopreservação dos embriões	41
2.5.6. Receptoras de embriões	42
2.5.6.1. <i>Características das receptoras</i>	42
2.5.6.2. <i>Sincronização das receptoras</i>	42
2.5.7. Transferência dos embriões	44
2.5.8. Análise estatística	44
2.6. RESULTADOS	45
2.6.1. Efeito da sazonalidade reprodutiva sobre a recuperação oocitária e produção in vitro de embriões bubalinos	45
2.6.2. Efeito da sazonalidade reprodutiva no estabelecimento da gestação: “influências da doadora de oócitos e da receptora de embriões”	46
2.6.3. Efeito da sazonalidade reprodutiva no estabelecimento da gestação: “influências da categoria (vaca versus novilha) da receptora de embriões”	48
2.6.4. Taxas de concepção de embriões criopreservados por vitrificação ou em curva lenta para transferência direta	48

2.7.	DISCUSSÃO.....	50
2.7.1.	Efeito da sazonalidade reprodutiva sobre a recuperação oocitária e produção in vitro de embriões bubalinos	50
2.7.2.	Efeito da sazonalidade reprodutiva no estabelecimento da gestação: “influências da doadora de oócitos e da receptora de embriões”	51
2.7.2.1.	<i>Efeito da sazonalidade reprodutiva no estabelecimento da gestação: “influências da categoria (vaca versus novilha) da receptora de embrião”</i>	<i>54</i>
2.7.2.2.	<i>Taxas de concepção de embriões criopreservados por vitrificação ou em curva lenta para transferência direta</i>	<i>55</i>
2.8.	CONCLUSÃO.....	56
	CAPÍTULO 3	57
	3. O USO DA ULTRASSONOGRAFIA DOPPLER NA AVALIAÇÃO DO CORPO LÚTEO DE RECEPTORAS BUBALINAS NA ESTAÇÃO REPRODUTIVA FAVORÁVEL (rERF) OU DESFAVORÁVEL (rERD).....	57
3.1.	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	57
3.2.	HIPÓTESE.....	58
3.3.	OBJETIVOS.....	58
3.4.	DESENHO EXPERIMENTAL.....	58
3.5.	MATERIAL E MÉTODOS	59
3.5.1.	Local do experimento	59
3.5.2.	Definição das estações reprodutivas favorável e desfavorável e período de execução do experimento	59
3.5.3.	Protocolo de TETF	59
3.5.4.	Avaliação das receptoras utilizando ultrassonografia doppler	60
3.5.4.1	<i>Área do CL.....</i>	<i>61</i>
3.5.4.2.	<i>Perfusão sanguínea</i>	<i>61</i>
3.5.5.	Análise Estatística.....	61
3.6.	RESULTADOS	62
3.6.1.	Área do corpo lúteo	62
3.6.1.1.	<i>Efeito da área do CL na TC em receptoras na rERF e rERD</i>	<i>62</i>
3.6.2.	Perfusão do corpo lúteo	64
3.6.2.1.	<i>Efeito da PS do CL na TC em receptoras na rERF e rERD</i>	<i>64</i>
3.7.	DISCUSSÃO	66
3.7.1.	Uso do Doppler na avaliação da área do corpo lúteo	66
3.7.2.	Uso do Doppler na avaliação da perfusão sanguínea (PS) do corpo lúteo	67
3.8.	CONCLUSÃO	68
	CAPÍTULO 4	68
4.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	68
4.1.	INTRODUÇÃO	68
4.2.	SEGURANÇA E BUSCA DE EFICIÊNCIA NO PROCESSO.....	70
4.3.	OTIMIZAÇÃO DA TAXA DE CONCEPÇÃO.....	69
4.4.	ALTERNATIVAS PARA AGREGAÇÃO DE VALOR	69
4.5.	ESTOQUE DE EMBRIÕES CRIOPRESERVADOS.....	70
4.6.	CUIDADOS NA ESCOLHA DO TOURO	70
4.7.	LIMITAÇÕES E ALTERNATIVAS	70
	REFERÊNCIAS.....	71
	APÊNDICE.....	85

CAPÍTULO 1

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1. Características gerais dos bubalinos

Segundo Chen e Li (1989), acredita-se que o Búfalo de Rio moderno (*Bubalus bubalis*) tenha sido domesticado na China, na região do Rio Yangtzi, durante o período neolítico por volta de 7.000 anos atrás. Os búfalos domésticos podem ser divididos em dois grupos cariotípicos com diferentes características: “búfalos de rio” $2n=50$ cromossomos, composto por 18 raças e “búfalos de pântano” $2n=48$, composto por apenas uma raça. Ainda é conhecido a existência de um grupo de búfalos híbridos (rio x pântano) com $2n=49$ cromossomos (DEGRANDI, et al., 2014).

O rebanho bubalino está constituído por cerca de 207 milhões de cabeças, distribuídas ao redor do mundo e responsáveis pelo fornecimento de 10 a 15% da produção mundial de leite (FAO, 2020).

A maioria dos bubalinos encontra-se no continente asiático. A Índia possui o maior rebanho, com aproximadamente 113.330.000 animais. Logo a seguir estão o Paquistão com 37.700.000 e a China com 23.469.000 (FAO, 2017). O Brasil alcançou mais de 1.300.000 cabeças em 2017 (MATOS et al., 2020), distribuídas em todo o território nacional, destacando-se entre os países da América do Sul, produzindo leite ao lado dos bovinos. Contudo, os bovinos são capazes de produzir leite durante todo o ano, enquanto os bubalinos apresentam sazonalidade reprodutiva, apresentando a condição de anestro durante o verão com consequências na produção leiteira (BORGHESE et al., 2007).

Alguns fatores viabilizam o crescimento atual dessa espécie, dentre elas, as vantajosas características químicas do leite e da carne, maior resistência às infecções parasitárias, incluindo carrapatos da espécie *Boophilus microplus*, maior resistência às intoxicações por plantas tóxicas (BARBOSA et al, 2003; OLIVEIRA et al, 2004) e à infecções no trato reprodutivo, na glândula mamaria e nos cascos, em comparação às vacas.

Outra característica mais marcante dessa espécie é a rusticidade e a adaptabilidade, além da eficiência reprodutiva. As búfalas produzem e reproduzem até a idade entre 15 e 20 anos, apresentando taxa de natalidade acima de 80% e taxa de mortalidade abaixo de 3% ao ano (MOREIRA et al., 1994). A duração da gestação na búfala corresponde, em média, a 315 dias

(FONSECA, 1986).

Há um grande número de publicações que comparam bubalinos e bovinos em relação à produtividade, comprovando a superioridade dos bubalinos em regiões de clima adverso e solo de baixa qualidade. Búfalos criados em diferentes sistemas de manejo, seja a pasto ou recebendo dietas com alto teor de matéria seca, apresentam rendimentos superiores aos bovinos, como ganho de peso e produção de derivados lácteos por litro de leite, tornando-se uma alternativa economicamente viável (MIRANDA,1986; NASCIMENTO e CARVALHO, 1993). Neste contexto, em regiões amazônicas, que permanecem inundadas durante seis meses do ano, bubalinos se adaptam bem contrapondo-se, aos bovinos que apresentam vários problemas neste tipo de clima. A alta umidade, por exemplo, parece afetar menos os bubalinos do que os bovinos. Da mesma forma, havendo sombra e aspersão de água, os bubalinos se adaptam melhor que os bovinos (VALE, 1996).

Embora apresentem maior habilidade em se adaptarem a climas adversos, a atividade reprodutiva dos bubalinos é fortemente influenciada por questões ambientais como a disponibilidade de alimentos e o fotoperíodo. Em áreas próximas à linha do Equador, onde a duração do dia é semelhante ao longo do ano, a escassez de alimento é o fator que mais afeta a reprodução (VALE et al. 1996), resultando em atraso da puberdade e aumentando o intervalo entre partos. Ao contrário, regiões com latitude elevada, onde ocorre uma maior variação na duração da luminosidade diária ao longo do ano, o fotoperíodo exerce uma influência na atividade ovariana, aumentando a fertilidade em meses com dias de menor duração da luminosidade (CAMPANILE et al. 2010).

1.2. Características reprodutivas das búfalas

Em adição à atividade reprodutiva da búfala ser influenciada positivamente pela estação reprodutiva favorável (dias curtos), a manifestação de cio nas búfalas é difícil de ser observada, pois além da estacionalidade não é comum a homossexualidade em relação à aceitação de monta (OHASHI, 1994; BARUSELLI, 1994a). O início da ciclicidade ovariana está relacionada à fertilidade pós-parto, que depende de fatores genéticos e fisiológicos como raça, produção de leite, estágio da lactação e presença do bezerro, além de outros fatores como manejo, nutrição e estação reprodutiva (ERF e ERD) (ROY et al., 2003).

Em relação à fisiologia ovariana, as búfalas apresentam ondas de crescimento folicular semelhante às vacas durante o ciclo estral (BARUSELLI et al., 1997a). As características da dinâmica ovariana como recrutamento, seleção, dominância e atresia folicular são similares às

descritas por SIROIS e FORTUNE, (1988) e GINTHER et al., (1989). Em bubalinos, são relatadas de uma a três, sendo mais comum o padrão de duas ondas de crescimento folicular (MANIK; MADAN; SINGLA, 1994; BARUSELLI et al., 1997; ALI et al., 2003; PRESICCE et al., 2004)

1.2.1. Sazonalidade e melatonina

Na espécie bubalina, as características reprodutivas sofrem influência dos fatores ambientais como o clima, o manejo e a nutrição e, em menor grau, dos fatores genéticos (OBIREDDY et al., 1999; SHAH et al., 1990). Tem sido observado que a influência sazonal interfere de forma relevante no comportamento reprodutivo, pois a produção e a liberação dos hormônios sexuais se baseiam nas variações de luminosidade diária ao longo do ano (PHOGAT et al., 2016). As búfalas são, portanto, poliéstricas estacionais de dias curtos, mas na zona equatorial podem demonstrar cio o ano todo. Entretanto, o fator limitante para um bom desempenho reprodutivo nas regiões equatoriais é a nutrição (CAMPANILE, 2010).

A duração da luminosidade solar em relação à noite, ao longo das 24 horas do dia, é conhecida como fotoperíodo (MOREIRA; RODRIGUES, 2015). A percepção desta duração é captada pela retina e transformada em sinal endócrino pela glândula pineal, responsável pela modulação da secreção de melatonina, que influencia diretamente a atividade reprodutiva (PHOGAT et al., 2016). Na búfala, a duração da luminosidade tem relação negativa com a manifestação do estro (SINGH et al., 2000), sendo a melatonina um hormônio fundamental na regulação da secreção das gonadotrofinas e liberação do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) (ZICARELLI, 1997). A melatonina é um neurotransmissor que age no eixo hipotalâmico-hipofisário, aumentando a concentração do hormônio liberador das gonadotrofinas (GnRH) na búfala, causando crescimento folicular e a ovulação (MISZTAL et al., 2002).

Parmeggiani et al. (1993) observaram que a concentração plasmática de melatonina em búfalas da raça Mediterrânea, medidas por radioimunoensaio, é influenciada pelo fotoperíodo, aumentando consistentemente com a diminuição da luminosidade dos dias, estando relacionado com a estação do ano e não com a fase do ciclo estral, demonstrando que o bubalino é um animal fotossensitivo e a melatonina é um sinal transducional para o escuro. A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é uma indolamina sintetizada a partir do triptofano, na glândula pineal e em outros locais como a retina, glândula lacrimal extra-orbitária, trato gastrointestinal, pele e ovário (ITOH et al., 1999), possuindo atividade antioxidante, como sugeriram de forma pioneira

IANAS et al. (1991). Além da ação sistêmica, pode atuar no ovário, pois estudos com mulheres detectaram concentrações elevadas desse hormônio no fluido folicular (RONNBERG et al., 1990). Constatou-se também a presença de receptores de melatonina em células foliculares de ratas e camundongas (SOARES et al., 2003) e precursores desse hormônio em extratos de ovário humano, o que leva a crer que seja possível a sua produção no ovário (ITOH et al., 1999). Ainda assim, a ação antioxidante da melatonina pode ter relação com o desenvolvimento folicular e a qualidade dos oócitos, podendo interferir no processo de maturação oocitária e ovulação (TAMURA et al., 2008). Woo et al. (2001) demonstraram que a melatonina pode regular a produção de progesterona (P₄) e a expressão gênica para receptores de GnRH e LH.

As novilhas búfalas possuem tendência de apresentar anestro na ERD e a melatonina tem sido utilizada para corrigir essa deficiência, induzindo a ciclicidade ovariana. Nesse sentido, o tratamento com implante de melatonina em novilhas é eficiente para induzir a ovulação do folículo dominante, originando a formação de um corpo lúteo (CL) com consequente produção de P₄ na ERD (GHUMAN et al., 2010). Em outro estudo, Ramadan et al. (2014) utilizaram implante de melatonina seguido da colocação e retirada nove dias depois de dispositivo com liberação de P₄, associado à aplicação de eCG um dia antes e GnRH um dia depois. Observou-se que os animais tratados com melatonina adquiriram maior habilidade para manter o corpo lúteo 21 dias após a inseminação artificial (IA) e apresentaram maior taxa de concepção (TC), além de aumentar o diâmetro do folículo dominante (FD) durante a ERD, em condições tropicais. Esse mesmo grupo observou melhor função do CL e melhores TC associados ao aumento da atividade da superóxido dismutase (SOD) em búfalas em lactação utilizando o mesmo tratamento realizado nas novilhas (RAMADAN et al., 2016). Outro grupo conduziu experimento para verificar o uso do implante de melatonina para induzir o cio e melhorar a TC, utilizando protocolo de *Ovsynch*. Entre novilhas tratadas e grupo controle, nenhuma apresentou cio até 28 dias após a inserção, mas todas responderam à indução de cio após o protocolo de *Ovsynch* (KAVITA et al., 2018).

Como consequência da sazonalidade, a parição em determinada época do ano para a produção de carne, é uma característica que facilita o manejo dos nascimentos, do desmame, da recria, da terminação e do abate. Entretanto, em criações voltadas para a produção leiteira, esta concentração da parição faz com que a produção de leite seja heterogênea ao longo do ano (BARUSELLI et al., 2003). Estabelecendo-se a gestação na ERF, a produção de leite no auge da safra é praticamente o triplo da observada, caso esse fato ocorra na ERD. No entanto, no mercado brasileiro, a demanda por derivados de leite é relativamente constante durante todo o ano. Em virtude disso, a produção leiteira durante a fase desfavorável é uma das alternativas

que visa padronizar a oferta de produtos no mercado (BERNARDES, 2007).

1.3. Efeitos do meio ambiente na reprodução

De acordo com Jochle e Lammond (1980), os fatores relacionados ao meio ambiente podem influenciar o desempenho reprodutivo, dividindo-se em inanimados e animados. Os fatores inanimados são classificados em fatores meteorológicos, climáticos, mudanças no fotoperíodo, temperatura, umidade, precipitação e a nutrição. Já os fatores animados são as formas de interação com a saúde animal, como as infecções, as interações com os endo- e ectoparasitas, interações entre membros da mesma espécie (fatores sociais) e a interação com o homem. Exemplificando a importância do fator climático, a detecção de cio nas búfalas ocorre com maior frequência e se manifesta de maneira mais intensa na época fria. Além disso, pelos efeitos do fotoperíodo é acompanhada por mudanças nos padrões de P₄ e estradiol, na frequência e amplitude dos pulsos de LH em comparação às épocas quentes (SHAFIE, 1993). Altas temperaturas também podem influenciar o desempenho reprodutivo.

O estresse térmico, decorrente de altas temperaturas, é o maior fator limitante no tocante aos animais de produção criados em clima tropical. Os bubalinos possuem baixa capacidade de tolerância ao calor comparado com outros ruminantes domésticos. Isso ocorre devido à má distribuição das glândulas sudoríparas na superfície corporal, coloração escura corporal e presença de poucos pelos na superfície corporal (DAYAL et al., 2017). Neste contexto, a detecção de cio nas búfalas ocorre com maior frequência e se manifesta de maneira mais intensa na época fria. Além disso, esse processo é acompanhado por mudanças nos padrões de P₄ e estradiol, na frequência e amplitude dos pulsos de LH em comparação às épocas quentes (SHAFIE, 1993). Em adição, também constatou-se que a elevação da temperatura ambiental causa um efeito prejudicial na produção, qualidade e desenvolvimento da competência de oócitos bubalinos coletados em ovários de abatedouro (NANDI et al., 2001). Segundo Mishra et al. (2007), embriões bubalinos produzidos a partir de oócitos recuperados em ovários de abatedouro, nos dias em que a temperatura máxima ambiente era menor ou igual a 40° C apresentaram maior taxa de clivagem que aqueles coletados em dias de temperatura a 40° C ou mais (33,6% vs 17,6%; P<0,05) e também na taxa de produção de blastocistos (9,8% vs 0,0%; P<0,05), sugerindo que a temperatura influencia a competência dos oócitos.

Ainda, segundo Abdoon et al. (2014), a estação quente é a principal limitação para a produção e reprodução dos bubalinos e a competência oocitária foi prejudicada durante a estação desfavorável, indicado por uma pobre maturação, baixas taxas de clivagem e de

produção de blastocistos, além da alteração na expressão gênica, com a maior expressão do gene HSP70, conhecido por agir como fator pró-apoptótico, nos complexos *cumulus*-oócitos (CCOs) e nos oócitos maturados *in vitro*. Esse fato pode indicar uma função relacionada ao estresse térmico, pois sua expressão está aumentada nas células do *cumulus* de CCOs bovinos expostos à elevadas temperaturas (PAYTON *et al.* 2011).

No sentido de investigar a influência da época do ano na fertilidade, novilhas búfalas foram submetidas à OPU e seus oócitos aspirados durante o inverno e o verão, sendo em seguida submetidos a análises moleculares. Foram observados efeitos causados pelo estresse térmico, afetando pelo menos dez genes relacionados com importantes funções biológicas (FERREIRA *et al.*, 2013). Verificou-se ainda, nesse estudo, que a temperatura cutânea ($35,0 \pm 0,4$ vs $23,8 \pm 0,5$ °C), a temperatura retal ($38,7 \pm 0,1$ °C vs $38,0 \pm 0$ °C), além da frequência respiratória ($21,3 \pm 1,2$ vs $15,4 \pm 1,1$) foram maiores durante o verão em comparação ao inverno, nas novilhas bubalinas.

Shahzad *et al.* (2020) concluíram que as variações sazonais e o fotoperíodo causam profundos efeitos na PIVE (produção *in vitro* de embriões) de búfalas, notadamente na qualidade do oócito e no desenvolvimento embrionário subsequente. Nesse estudo, ao analisar a expressão gênica, observaram genes associados à pluripotência durante o pico da ERF (OCT-4) aumentado e a proteína relacionada ao choque térmico (HSP90) diminuída, comparado à ERD. Portanto, recomenda-se adequadas suplementações na maturação *in vitro* dos oócitos minimizar os efeitos sazonais. Em outro experimento, foi observada gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase diminuído na MIV em oócitos de búfalas durante a ERD, enzima envolvida com o metabolismo energético (WESSEL *et al.*, 2002).

No entanto, embora o estresse térmico cause notáveis prejuízos às funções reprodutivas, muitas vezes seus efeitos podem ser confundidos com os efeitos da estacionalidade reprodutiva.

1.4. Produção *in vitro* de embriões

Nandi (2002) demonstrou que nas últimas décadas houve uma evolução significativa na produção *in vitro* de embriões na espécie bovina. Contudo, a morte de neonatos imediatamente após o parto e a alta taxa de fetos com deformidades representaram problemas de importância econômica e ética. Antes que esses problemas fossem resolvidos totalmente surgiram ainda vários questionamentos como: quais são os critérios de avaliação dos oócitos de boa ou má qualidade? Quais são os fatores intrínsecos que determinam oócitos competentes? Por que nem todos os blastocistos se desenvolvem a termo? Os blastocistos morfológicamente normais são realmente normais? Por que algumas descendências são normais e outras não? Essas questões

pertinentes à PIVE em bovinos não podem ser satisfatoriamente respondidas no presente. Melhorias no sistema da PIVE em bubalinos requerem desenhos experimentais dos especialistas nos próximos anos frente aos desafios (NANDI, 2002). Para isso, é importante conhecer os aspectos que envolvem o crescimento folicular, além do início e final do processo de maturação oocitária (MERTON et al. 2003).

Os oócitos dos mamíferos, recuperados durante a OPU, dependem de componentes estocados no ooplasma durante a oogênese para culminar com o blastocisto viável. Esses componentes incluem mRNAs, proteínas, organelas e substratos energéticos e são necessários durante as fases iniciais do desenvolvimento embrionário, momento em que a atividade transcricional do embrião é limitada (MEIRELLES et al., 2004).

Além da qualidade oocitária, inúmeros fatores podem interferir na eficiência da produção de embriões *in vivo* e *in vitro* em búfalos (MISRA et al., 1999; CHAUHAN et al., 1998). Segundo GASPARINI (2002), pouca diferença é detectada na maturação de oócitos bubalinos e bovinos (87% vs 94%) e menores taxas de clivagem podem indicar um papel crítico na fecundação, pois pequena porcentagem dos reprodutores apresenta boa capacidade nos procedimentos *in vitro*, devido ao próprio processamento do sêmen para a PIVE (KRUIP et al., 1994). Outros fatores podem justificar a baixa taxa de embriões produzidos, como a quantidade e a qualidade de oócitos recuperados e submetidos à PIVE (NANDI et al., 2002), uma vez que fêmeas bubalinas possuem uma reserva ovariana em torno de aproximadamente 19.000 folículos pré-antrais o que contrasta com uma população em torno de 150.000 em fêmeas zebuínas (GASPARRINI, 2002; SANTOS et al., 2013).

1.4.1. OPU (*ovum pick up*) e LOPU (*laparoscopy ovum pick up*)

A obtenção de oócitos *in vivo* por meio de laparoscopia (LOPU) ou aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassom (OPU) para a PIVE possibilita um melhor aproveitamento do potencial genético de fêmeas consideradas superiores ao longo de todo ano (NAGAI, 2001) e o número de embriões produzidos por sessão de aspiração será um importante fator que definirá o sucesso do procedimento. Além de ser pouco invasiva, a OPU pode ser realizada em todas as fases do ciclo estral, em animais nulíparos (pré-púberes e púberes), primíparos e múltíparos, sem necessidade de estimulação hormonal prévia (BOUSQUET et al., 1999) e ainda no início da gestação, até quando for possível manipular os ovários com segurança, sem uma tração exagerada (MERTON et al. 2003). A aspiração folicular por via laparoscópica (LOPU - *laparoscopy ovum pick up*) também pode ser utilizada para a PIVE em bezerras bubalinas entre

2 e 6 meses de idade (BALDASSARRE, 2018; BARUSELLI et al., 2018).

1.4.2. Efeito do sêmen

Analisando o efeito do touro na eficiência do processo, a avaliação do sêmen para a fecundação *in vitro* (FIV) (MAHMOUD et al., 2004; SCHOLKAMY et al., 2009) combinada com a avaliação da morfologia espermática (ABDEL DAYEM et al., 2009) são técnicas úteis para prever a fertilidade dos touros. A motilidade dos espermatozoides, a morfologia, a porcentagem de membrana plasmática e acrossomo íntegros são informações preditivas para o sucesso da FIV (ZHANG et al., 1998).

O impacto do sêmen utilizado na produção *in vitro* de embriões foi objeto de um estudo em Nelore (*Bos indicus*), mostrando que touros considerados superiores alcançaram taxas de blastocisto superior a 30% (18 de 48 touros). Em contraste, os piores (5 de 48 touros) produziram taxas muito baixas de blastocisto, que foram inferiores a 20%. Estes resultados destacam a importância da exclusão de touros com resultados inadequados na produção de blastocistos durante os procedimentos de PIVE (WATANABE et al., 2017).

Em um trabalho recente realizado no Egito (SOLIMAN et al., 2018) foi avaliado o efeito do tipo de processamento do sêmen (*in natura* e criopreservado) na capacidade de desenvolvimento e criotolerância de embriões de búfalos. O sêmen congelado reduziu significativamente as taxas de sobrevivência de mórula e blastocisto em relação ao sêmen *in natura* após 24 horas de cultivo enquanto o melhor desenvolvimento e viabilidade foram detectados em embriões derivados de sêmen *in natura*. Ainda assim, o sêmen congelado é amplamente utilizado na fecundação *in vitro* por facilitar a logística e evitar a transmissão de doenças, equilibrando as vantagens de utilizar sêmen *in natura* (ENGLERT et al., 1989).

Resultados comparativos demonstraram que usar sêmen de diferentes touros na FIV pode influenciar os resultados de fertilidade e de produção de embriões (BARUSELLI et al., 2020). Os touros de melhor qualidade obtiveram excelentes taxas de blastocisto, enquanto os de pior qualidade foram muito ruins de produção. A taxa de produção de embriões variou de 6,4% para o pior desempenho até 37,7% para o touro mais eficiente.

1.5. Desenvolvimento embrionário

A primeira transferência de embriões em búfalas foi realizada com sucesso nos EUA (DROST et al., 1983). Em seguida, outros trabalhos na área foram feitos com sucesso em outros

países. No entanto, a taxa de sucesso na búfala é muito baixa devido a resposta pobre à superovulação, por fatores inerentes à espécie como falha na captura dos oócitos pela fímbria e/ou no transporte do oócito no oviduto (MISRA et al., 1990; CARVALHO et al., 2002). A média de embriões transferíveis é menor do que um por búfala superovulada.

Em função dos baixos resultados, uma alternativa que se apresenta é a PIVE, apesar das búfalas possuírem baixo número de folículos primordiais e grande incidência de atresia folicular (TY et al., 1989), além de baixa população de folículos antrais (BARUSELLI et al., 1997; BALDRIGHI et al., 2014; GIMENES et al., 2015) e baixas taxas de clivagem, conforme descrito em outros estudos conduzidos em bubalinos (GASPARRINI, 2002; FERRAZ et al., 2007; SÁ FILHO et al., 2009; SALIBA et al., 2009). No sentido de buscar maior eficiência, o AMH é uma alternativa capaz de selecionar animais com maior capacidade para a produção de oócitos e embriões, podendo ser utilizada potencialmente nos bubalinos (TY VAN et al., 1989; BALDRIGHI et al., 2014). A baixa produção de embriões *in vitro* ainda está relacionada à baixa qualidade do oócito e à capacidade de sofrer adequadas maturações nuclear e citoplasmática, além da qualidade do sêmen congelado utilizado na FIV (GASPARRINI, 2002). Deve-se destacar que, em relação aos bovinos, os bubalinos possuem algumas particularidades. Dentre elas, a maior capacidade de acumular lipídeos durante a maturação oocitária e o menor tempo para completá-la (NEGLIA et al., 2003), além de apresentar o desenvolvimento mais rápido dos embriões durante o cultivo (BARKAWI et al., 2007).

Ao comparar as taxas de produção de blastocistos entre três diferentes grupos genéticos verificou-se que o *Bos indicus* apresentou melhor resultado ($28,3 \pm 2,8\%$; $P < 0,01$) do que *Bos taurus* ($14,1 \pm 2,9\%$) e *Bubalus bubalis* ($10,2 \pm 2,0\%$) (GIMENES et al., 2015). Nesse sentido, é possível aspirar búfalas em intervalos de 7 ou 14 dias (FERRAZ et al., 2015) para otimizar a produção de embriões. O desenvolvimento embrionário nas búfalas é 12 a 24 horas mais acelerado que na vaca, considerando-se tanto os embriões produzidos *in vitro* (GASPARRINI, 2002) como *in vivo* (NEGLIA et al., 2001). Parece que a inter-relação entre o desenvolvimento precoce do conceito, a funcionalidade do corpo lúteo, a preparação do útero e o reconhecimento materno da gestação estão mais intimamente vinculados em bubalinos do que em bovinos (CAMPANILE et al., 2010). Esse último autor também afirma que mórulas compactas são observadas no útero de búfalas cinco dias após o cio e os blastocistos no dia seguinte, sendo que a TC em búfalas pode estar relacionada com a concentração de P_4 observada cinco dias após o cio (CAMPANILE et al., 2007).

Segundo MONDADORI et al. (2010), os CCOs oriundos de folículos antrais de 1 mm de diâmetro possuem um núcleo excêntrico, corona radiata compacta e vilosidades

ooplamásticas totalmente envolvidas com a zona pelúcida, onde uma junção bem definida pode ser observada. As mitocôndrias estão distribuídas ao longo do ooplasma, da mesma forma que pequenas vesículas lipídicas. Já nos CCOs com 2 mm de diâmetro são observados o início da formação do espaço perivitelínico, além do núcleo localizado perifericamente e do aumento no número de mitocôndria. As vesículas lipídicas também aumentam em número e tamanho. Nos CCOs derivados de folículos antrais com 6 mm de diâmetro, as organelas estão localizadas principalmente na região perinuclear. Os complexos de Golgi e o retículo endoplasmático estão mais desenvolvidos e as mitocôndrias migram para a região cortical, ao contrário dos vacúolos lipídicos que migram para a região medular nessa fase.

Mondadori et al. (2010) também observaram que o ovário da búfala possui em torno de 19.819 folículos pré-antrais (FPA), número inferior ao observado nos animais *Bos taurus* (ERICKSON, 1966) e *Bos indicus* (LUCCI et al., 2002). Nesses estudos, os autores concluíram também que o número de FPA é semelhante entre taurinos e zebuínos. Pode-se inferir, portanto, que o baixo número de folículos antrais no ovário da búfala deve-se principalmente ao baixo número de folículos pré-antrais presentes na espécie (TY et al., 1989). O ovário da búfala possui menor população de folículos recrutáveis a qualquer tempo. Na média, são cerca de 12.000 folículos primários reportados (DANELL, 1987), comparado com 133.000 na vaca (ERICKSON, 1966).

Mondadori et al. (2010) relataram que o número de folículos primários é maior do que os primordiais e secundários, característica muito provavelmente inerente à búfala. Esse fato também foi observado por Santos et al. (2006) e de modo contrário em cabras (LUCCI et al., 2001), vacas (LUCCI et al. 2002), ovelhas (RONDINA et al., 2005) e macacas (LOPES et al., 2006). Além disso, estes autores citam que os ovários utilizados no experimento pertenciam às fêmeas em mesma idade reprodutiva, o que permite inferir que as diferenças intrínsecas quanto à população folicular são responsáveis por variações observadas na produção de oócitos entre animais da mesma espécie.

1.6. Criopreservação de embriões

Ao longo das últimas 5 décadas duas abordagens de criopreservação foram propostas, o congelamento lento, que consiste no resfriamento gradual a 0,5° C/min e a vitrificação (VT), que consiste na imersão direta em nitrogênio líquido. Segundo Rall (1992) existem três fatores que influenciam no sucesso do congelamento lento, a adição de glicerol ou outro crioprotetor à suspensão com embrião, controle eficiente do decréscimo da temperatura até a estocagem em

nitrogênio líquido e a mudança característica do volume osmótico dos blastômeros ao longo do processo de criopreservação. A VT também possui três pilares para obter sucesso: não pode haver formação de cristais de gelo dentro das células durante o resfriamento, estocagem ou reaquecimento; é necessária alta concentração de crioprotetores para desidratação osmótica; e a mudança característica do volume osmótico dos blastômeros ao longo do processo de criopreservação, assim como no congelamento lento, também deve ocorrer (RALL, 1992; ARAV, 2014). Muitos fatores parecem estar envolvidos em melhorar a sobrevivência de embriões PIV (produzidos *in vitro*) congelados e descongelados. No entanto, pesquisas são necessárias para melhorar a tolerância à criopreservação e obter resultados semelhantes aos embriões frescos (DOCHI, 2019).

Apesar de não estar claro como e por que a acumulação lipídica ocorre no citoplasma dos embriões PIV, tal acúmulo tem sido atribuído à presença de soro fetal bovino. De fato, o aumento de gotas lipídicas está moderadamente correlacionado com a apoptose em blastocistos PIV vitrificados (SUDANO et al., 2012), sendo que embriões cultivados em sistemas livres de soro têm uma redução no acúmulo de gotas de lipídeos citoplasmáticas e maior resistência à criopreservação (PEREIRA e MARQUES, 2008). Outra alternativa para diminuir o conteúdo de gotas lipídicas é a delipidação, pelo tratamento com Forskolin. Esse efeito foi observado em embriões bovinos e bubalinos PIV, com o aumento da taxa de sobrevivência embriões criopreservados (PANYABORIBAN et al., 2018). Já Murillo et al. (2017) constataram que meios livres de proteína entre os dias 6 e 7 do cultivo resultaram em elevação das taxas de prenhez e nascimento após a criopreservação. A adição de L-Carnitina ao meio de cultivo proporciona uma melhora a competência no desenvolvimento e na criotolerância por meio de um efeito antioxidativo (TAKAHASHI et al., 2013).

Embora diversos protocolos de criopreservação tenham sido adotados e adaptados para embriões PIV, ainda não se tem uma técnica prática que resulte em altas taxas de concepção. A VT, por apresentar melhores taxas, é a mais utilizada. Entretanto, apresenta desvantagens em relação ao processo de reaquecimento e cuidados com a toxicidade do crioprotetor. Assim, outros métodos têm sido estudados e desenvolvidos.

1.6.1. Métodos de criopreservação

1.6.1.1. Vitrificação e Reaquecimento

A VT é definida como um processo fisiológico no qual uma solução de crioprotetores altamente concentrada solidifica durante o congelamento, sem a formação de cristais de gelo (NIEMANN, 1991). Existem três aspectos que devem ser observados no processo de VT: a taxa de abaixamento da temperatura, a viscosidade do meio no qual os embriões ficarão suspensos, que está relacionada com a concentração de um ou mais crioprotetores e o volume da gota, que quanto menor, melhor proporciona a transferência de calor, facilitando o rápido abaixamento da temperatura (ARAV et al., 2002). A combinação de crioprotetores é frequentemente utilizada para aumentar a viscosidade e reduzir o nível de toxicidade, apesar de haver a possibilidade de embriões criopreservados pela VT poderem sofrer injúrias por sua toxicidade, possibilidade de fraturas pelo gelo extracelular e efeitos osmóticos adversos (KASAI et al., 1996).

Com base nisso, diferentes estratégias foram desenvolvidas para permitir que essa solução, contendo o embrião, entrasse em contato com o nitrogênio líquido, dos quais destacamos: *open pulled straw* - OPS (VAJTA et al., 1998) e *cryotop* (KUWAYAMA et al., 2005), também utilizado para a VT de oócitos humanos.

Com relação ao melhor estágio de desenvolvimento para o embrião bovino ser vitrificado, Morato et al. (2010) ao avaliarem a taxa de eclosão após a VT com *cryotop* de embriões PIV no sétimo e oitavo dia de cultivo, nos estágios de blastocisto inicial (BI), blastocisto expandido (BX) e blastocisto eclodido (BE), observaram que os mais avançados no desenvolvimento tiveram melhor taxa de eclosão em relação aos menos desenvolvidos. Adicionalmente, estudo conduzido por Stinshoff et al., (2011) demonstrou que a criopreservação afeta a qualidade dos embriões em nível molecular, o que pode causar alterações na expressão de alguns genes, menor nos embriões vitrificados do que nos submetidos ao congelamento clássico.

Para concluir, apesar de apresentar resultados satisfatórios, a VT apresenta limitações para uso comercial devido ao reaquecimento demandar o uso do estereomicroscópio e soluções para a remoção dos crioprotetores (FERRÉ et al., 2020), além de técnico habilitado. Além disso, utiliza altas concentrações de crioprotetores que são tóxicas se não forem bem conduzidas durante o procedimento.

Sobre o reaquecimento, Vajta et al. (1997), acompanharam as mudanças ultraestruturais que ocorrem após o reaquecimento de embriões vitrificados aos sete dias de desenvolvimento

na fase de blastocisto expandido. Esses embriões foram vitrificados em método de equilíbrio em duas etapas, utilizando etilenoglicol e dimetilsulfóxido como crioprotetores. Os embriões foram avaliados por microscopia eletrônica de transmissão verificando os achados imediatamente, 4 horas e 24 horas após o reaquecimento. Na hora zero foi observada apenas um colapsamento da blastocele utilizando o estereomicroscópio. Contudo, ultraestruturalmente sinais de extensa injúria foram vistos, incluindo uma distensão geral ou encolhimento da mitocôndria, desintegração das adesões celulares entre as células adjacentes do trofoblasto e completa ruptura de algumas células. Após quatro horas do reaquecimento observou-se ao estereomicroscópio encolhimento da blastocele e aparência de grânulos escuros na massa celular. A nível estrutural sinais de regeneração foram observados como células com menor injúria que foram remontadas na área central, formando uma pequena blastocele, as estruturas celulares de adesão foram restabelecidas e os danos da mitocôndria eram menos severos. A maioria das células danificadas irreversivelmente ou debris celulares foram acumulados no espaço perivitelino. Às 24 horas após o reaquecimento, ao estereomicroscópio, não foi observado sinais de injúrias nos blastocistos sobreviventes. Na investigação a nível ultraestrutural debris celulares no espaço perivitelino e algumas células degeneradas na blastocele foram os únicos sinais de crioinjúria. Esse estudo concluiu que alguns sinais de danos extensos e inesperados foram observados, seguido de uma regeneração e reorganização da estrutura embrionária.

Yang et al. (2012) concluíram que blastocistos jovens e os embriões com desenvolvimento tardio apresentaram baixa criotolerância em relação aos blastocistos expandidos ou aqueles que se desenvolveram mais cedo. Portanto, blastocistos expandidos com cinco a sete dias de desenvolvimento parecem os mais adequados para a VT, apesar de blastocistos expandidos com 8 a 9 dias de desenvolvimento foram também criopreservados com sucesso.

1.6.1.2 Congelação em curva lenta para transferência direta

Um método para TD foi descrito por Willadsen et al. (1978), mas somente uma receptora tornou-se gestante, entre vinte utilizadas no experimento. Em 1984 outro método de TD foi descrito, onde os embriões foram congelados em solução contendo 1,4 M de glicerol e 0,25 M de sacarose (MASSIP et al., 1984). Em seguida, foi reportada taxa de 51,8% de gestação, utilizando essa técnica, possibilitando que fosse aplicada em condições de campo (MASSIP et al., 1987). Nova abordagem, utilizando etilenoglicol (EG) 1,5 M para embriões bovinos foi

descrito para o método TD (VOELKEL & HU, 1992a). Embriões criopreservados no EG puderam ser reidratados diretamente no meio holding e atingir TC ao redor de 50%.

Segundo estudos, a sobrevivência de embriões PIV após congelamento pode ser afetada pelos meios de cultura (LEIBO, et al.; 1993). Embriões PIV têm uma aparente sensibilidade associado aos seus lipídeos quando o meio de cultura é suplementado com SFB (LEIBO et al., 1993; IMAI et al., 1997). Estudo que examinou o congelamento e descongelamento de embriões cultivados na presença de lipossomos, que podem melhorar a estabilidade da membrana, demonstrou que a composição do meio de cultura pode afetar a estrutura da membrana de embriões bovinos e a sensibilidade ao congelamento (PUGH et al., 1996).

Outros estudos relataram ainda, o aumento significativo da taxa de sobrevivência de embriões PIV congelados-descongelados pela adição de Albumina de Ácido Linoleico ao meio de cultivo contendo soro fetal proporcionando o aumento da criotolerância (IMAI et al., 1997; DOCHI, 2019).

Kizil et al. (2014) estudaram a capacidade de embriões congelados em curva lenta, utilizando-se etilenoglicol como crioprotetor de se desenvolver após o descongelamento. Os embriões foram produzidos a partir de oócitos aspirados em ovários de matadouro de folículos com diâmetro entre 2 e 8 mm. Os resultados demonstraram que o etilenoglicol pode ser utilizado efetivamente como crioprotetor para congelar embriões bovinos produzidos *in vitro*.

Protocolos para transferência direta (TD) de embriões congelados produzidos *in vitro* foram utilizados com bons resultados por Sanches et al. (2016). O estudo realizado demonstrou que embriões produzidos e congelados após fecundação dos oócitos com espermatozoides sexados podem ser transferidos diretamente para as receptoras, alcançando taxas de concepção semelhantes aos embriões vitrificados. Essa evidência contribui enormemente para facilitar a logística de utilização dos embriões, principalmente em fazendas de exploração leiteira.

CAPÍTULO 2

2. A SAZONALIDADE REPRODUTIVA INFLUENCIA A COMPETÊNCIA OÓCITÁRIA E EMBRIONÁRIA, MAS NÃO A RECEPTIVIDADE UTERINA EM BÚFALAS”

2.1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A búfala tem se destacado por sua rusticidade, fertilidade, longevidade e adaptabilidade em diferentes regiões do Brasil e do mundo. A composição do leite da búfala é característica e diferente do leite da vaca, proporcionando alto valor nutritivo e maior rendimento industrial (PATIÑO, 2011). No panorama mundial, 12,8% do leite produzido é originado da búfala (FAO, 2011). Com relação à carne, a de origem bubalina é sensorialmente similar à carne bovina, considerada de boa qualidade, possuindo maior presença de ácidos graxos, como o ômega 3, considerada mais saudável em relação à carne bovina (GIORDANO, 2010).

O búfalo (*Bubalus bubalis*) se comporta como um animal poliéstrico sazonal de dias curtos, dependendo da proximidade com a linha do Equador, coincidindo a atividade reprodutiva com a diminuição das horas do dia (GARCIA, 2006; VALE e RIBEIRO, 2005). Os meses do ano que compreendem o outono e o inverno representam a estação reprodutiva favorável (ERF), período em que estudos demonstram haver aumento da competência oocitária (FRANCESCO et al., 2011). Já nos meses de primavera e verão encontra-se a estação reprodutiva desfavorável (ERD), na qual as búfalas se encontram em anestro.

Por razões não totalmente esclarecidas, na espécie bubalina, a superovulação seguida da colheita dos embriões é menos eficiente quando comparada à bovina, tanto na quantidade, quanto na qualidade das estruturas recuperadas, mesmo com boa resposta à superovulação (BARUSELLI et al., 2007; DROST, 2007; CAMPANILE et al., 2010). Com isso, a associação da aspiração transvaginal (OPU = *Ovum pick-up*) e a PIVE representa um método alternativo, desenvolvido com base nos conhecimentos adquiridos a partir destes procedimentos em bovinos. Essas tecnologias são mais eficientes para produzir embriões, aumentando a progressão genética na linhagem materna (GALLI et al., 2001; GASPARRINI, 2002; BARUSELLI et al., 2018). Entretanto, vários fatores limitam a eficiência de OPU/PIVE como a população de folículos antrais (PFA), o diâmetro folicular, os efeitos do meio ambiente, da fazenda e a categoria da doadora (BARUSELLI et al., 2018).

Dados da IETS demonstram como a PIVE tem crescido e o enorme mercado que essa

biotecnologia da reprodução representa no mundo, além da importância do Brasil nesse cenário (VIANNA, 2018). Entretanto, existem poucas informações disponíveis nessa área sobre bubalinos, o que pode representar uma oportunidade de crescimento desse mercado. Na última década, a demanda por embriões produzidos *in vitro* tem aumentado, devido à efetividade da sua utilização no melhoramento genético. Contudo, esses embriões são menos resistentes às injúrias se comparados aos embriões produzidos *in vivo*. Entre outros fatores, isso tem impedido o desenvolvimento do mercado internacional e a formação de bancos genéticos (SANCHES et al., 2016). Os embriões PIV geralmente apresentam uma reduzida qualidade, se comparados aos colhidos por meio da lavagem uterina (RIZOS et al., 2002), sendo mais sensíveis à criopreservação, fato associado ao alto conteúdo lipídico presente no citoplasma desses embriões (ABE et al., 2002; MUCCI et al., 2007). Isso pode ser atribuído às condições de cultivo, especialmente a presença de soro, que tem sido responsabilizado pelo aumento no acúmulo de lipídeos no citoplasma (ABE et al., 2002; MOORE et al., 2007). Em relação à sazonalidade, embora existam evidências que embriões produzidos na ERD apresentam menor qualidade que embriões produzidos na ERF, pouco se sabe se resultam em taxas de concepção diferentes.

Apesar das vantagens da PIVE, a criopreservação representa um desafio para os laboratórios comerciais, devido à baixa criotolerância dos embriões PIV (SUDANO et al., 2011). Na técnica de VT, altas concentrações de crioprotetores, que formam uma solução viscosa, inibem a formação de cristais de gelo, ocasionando um estado semelhante ao vítreo em que a água é solidificada e não expandida. Contudo, a toxicidade dessas soluções é muito alta e as células devem ser expostas ao meio por um período muito curto, no menor volume possível (VAJTA et al., 1998; ARAV et al., 2002; VAJTA & NAGY, 2006). A congelação em curva lenta para transferência direta (TD) tem a vantagem de usar baixas concentrações de crioprotetores, o que pode ser associado à baixa toxicidade química e baixo choque osmótico, mas a sua capacidade de prevenir cristais de gelo é limitada (KASAI, 2002). Segundo Sanches et al. (2016), a TC de embriões bovinos de FIV, produzidos com sêmen sexado, *in natura*, vitrificados e para TD foi de 51,35±1,87% (133/259), 35,89±3,87% (84/234) e 40,19±4,65%, respectivamente.

Recentemente a técnica foi adaptada pela técnica de TD e apresenta maior praticidade e boas taxas. No entanto, pouco se sabe sobre os efeitos desses métodos nas taxas de concepção de búfalas.

Levando-se em consideração que os efeitos da sazonalidade reprodutiva das búfalas são pouco conhecidos em relação as taxas de concepção dos embriões PIV transferidos para as

receptoras bem como pouco se sabe sobre a eficiência dos métodos de criopreservação por vitrificação ou por TD, esse estudo investigou a influência da sazonalidade em búfalas doadoras de oócitos e receptoras de embriões, além de comparar a VT e a congelação de embriões em curva lenta para TD.

2.2. HIPÓTESES

A hipótese central deste estudo é que a sazonalidade influencia o desempenho reprodutivo de búfalas em programas de PIVE. As hipóteses específicas são:

- (I) doadoras em ERF (dERF) têm melhor desempenho reprodutivo (recuperação oocitária e produção de embriões) que doadoras em ERD (dERD);
- (II) a TC é maior para receptoras na ERF (rERF) em relação à ERD (rERD);
- (III) a TC de embriões criopreservados por VT é semelhante ao TD.

2.3. OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo foram:

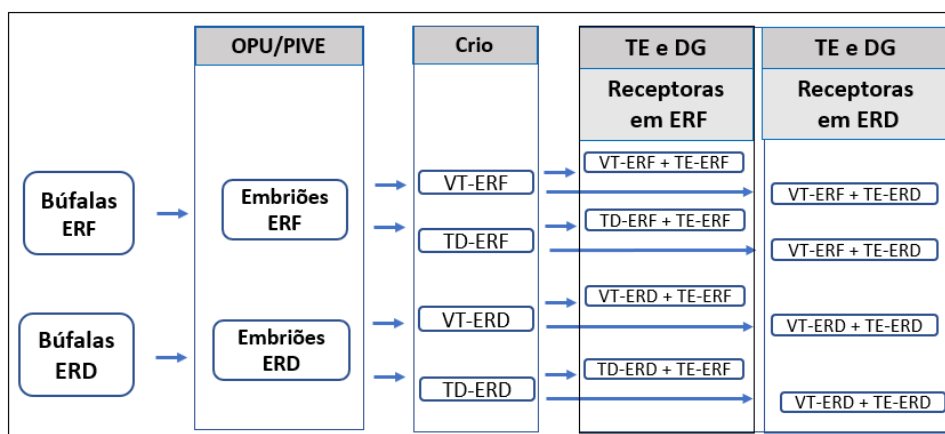
- (a) avaliar o efeito da sazonalidade reprodutiva na recuperação oocitária e na produção *in vitro* de embriões de doadoras bubalinas na estação reprodutiva favorável (dERF) ou desfavorável (dERD);
- (b) avaliar o efeito da sazonalidade reprodutiva das doadoras (dERF ou dERD) nas taxas de concepção;
- (c) avaliar o efeito da sazonalidade reprodutiva das receptoras de embrião (rERF ou rERD) nas taxas de concepção;
- (d) comparar a eficiência de dois métodos de criopreservação embrionária – VT ou TD – nas taxas de concepção de embriões bubalinos produzidos *in vitro* a partir de dERF ou dERD e transferidos para rERF ou rERD;
- (e) avaliar se a categoria animal (novilha ou vaca) das receptoras de embrião em ERF ou ERD influencia as taxas de concepção.

2.4. DESENHO EXPERIMENTAL

Para avaliar o efeito da sazonalidade reprodutiva sobre as doadoras de oócitos, foram realizadas aspirações foliculares nas doadoras bubalinas na ERF (dERF) na ERD (dERD). Os grupos dERF e dERD foram comparados quanto: (I) número de oócitos recuperados por OPU, (II) número de embriões por OPU e (III) taxa de produção de embriões. As doadoras em dERF ou dERD foram também comparadas quanto ao status gestacional, vazias ou gestantes e à categoria, novilhas ou vacas.

Para avaliar o efeito do método de criopreservação, embriões VT e TD produzidos na dERF e dERD foram transferidos para rERF e rERD. Embriões entre seis e meio e sete dias de desenvolvimento, produzidos na dERF foram transferidos para receptoras sete dias pós-cio, na rERF e na rERD, assim como os embriões produzidos na dERD também foram transferidos para receptoras nas 2 estações, conforme demonstrado na Figura 1. Dessa forma, em todos os procedimentos de desvitrificação/descongelamento e TD, sempre havia embriões produzidos nas 2 estações, de forma balanceada para os 2 grupos (ERF e ERD), além de embriões criopreservados nos 2 métodos (VT e TD), também divididos entre as receptoras da mesma forma. O diagnóstico de gestação (DG) foi realizado aos 30 e 60 dias de gestação para determinar da TC e as perdas embrionárias/fetais (PEF).

Figura 1 - Fluxograma referente ao desenho experimental do projeto. Fêmeas bubalinas em estação reprodutiva favorável (ERF) e desfavorável (ERD) foram submetidas a OPU. Os CCOs resultantes foram utilizados para produção *in vitro* de embriões (PIVE).



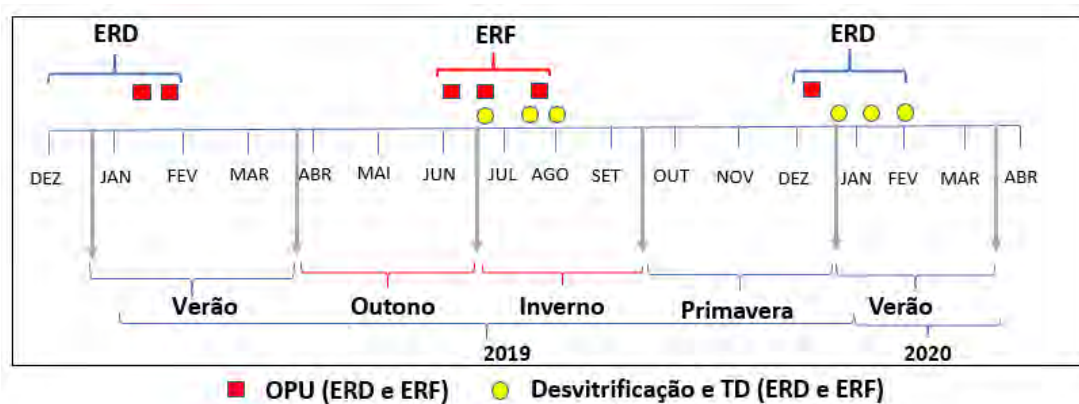
Fonte: Própria autoria

Legenda: Lab = laboratório; OPU = *ovum pick-up*; PIVE = produção *in vitro* de embriões; TE = transferência de embriões; ERF = estação reprodutiva favorável; ERD = estação reprodutiva desfavorável; VT-ERF = embriões vitrificados na estação reprodutiva favorável; TD-ERF = embriões

congelados para transferência direta na estação reprodutiva favorável; VT-ERD = embriões vitrificados na estação reprodutiva desfavorável; TD-ERD = embriões congelados para transferência direta na estação reprodutiva desfavorável.

As doadoras foram aspiradas e os embriões produzidos entre janeiro e dezembro de 2019. Já as desvitrificações, descongelações e transferência dos embriões ocorreram entre junho de 2019 e início de fevereiro de 2020, conforme mostrado na figura 2.

Figura 2 - Esquema indicando as aspirações foliculares, desvitrificação ou reaquecimento e descongelação para TD realizadas ao longo do experimento, levando-se em consideração a ERF e ERD, distribuídas durante as estações do ano.



Fonte: Própria autoria

Legenda: ERF = estação reprodutiva favorável; ERD = estação reprodutiva desfavorável; OPU = *Ovum Pick Up*); VT = embriões vitrificados; TD = embriões congelados para transferência direta.

2.5.MATERIAL E MÉTODOS

Esse estudo foi realizado com aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade de São Paulo (protocolo n° 3571250818).

2.5.1. Local e duração do experimento

Os experimentos foram conduzidos na Fazenda Sesmaria, localizada no município de Amparo/SP (coordenadas 22 35 49S/46 51 13 W – altitude 695m), onde permaneceram as doadoras de oócitos e as receptoras de embriões. O experimento foi realizado entre os meses de janeiro de 2019 e março de 2020.

2.5.2. Definição das estações reprodutivas favorável e desfavorável e período de execução do experimento

O presente estudo foi realizado em dois períodos distintos, com relação à duração das horas do dia, correspondentes ao final do outono e início do inverno (junho/julho), época do ano com menor número de horas de luz, considerado estação reprodutiva favorável (ERF). Já, o final da primavera e início do verão (dezembro/janeiro) referem-se à estação reprodutiva desfavorável (ERD), caracterizado pelo aumento do número de horas do dia.

As aspirações foliculares nas búfalas foram realizadas entre 29.08.18 e 04.12.19 em sessões que variaram de 12 a 35 doadoras (21, 24, 22, 20, 24, 19, 20, 20, 30, 12 e 15). De 11 sessões, 3 foram realizadas na ERF (junho/julho) e 3 na ERD (dezembro/janeiro), consideradas para o presente estudo. As 5 sessões restantes foram realizadas em períodos intermediários (agosto, setembro, outubro e novembro) aos meses de eleição para esse estudo ERF (junho e julho) e ERD (dezembro e janeiro).

Levando-se em consideração a ERF, no mês de junho, as temperaturas máximas diárias ficaram por volta de 23 °C (variação de 19 a 27°C). Já as mínimas diárias ficam por volta de 13 °C (variação de 9 a 16°C). Em julho, as temperaturas máximas diárias ficam por volta de 24 °C (variação de 19 a 29°C). Já as mínimas diárias ficam por volta de 12 °C (variação de 8 a 15°C). Na ERD, no mês de dezembro e janeiro, as temperaturas máximas diárias ficam por volta de 28 °C (variação de 24 a 32°C). As temperaturas mínimas diárias ficam por volta de 19 °C (variação de 16 a 21°C). Ao longo do ano, em geral a temperatura varia de 12°C a 29°C e raramente é inferior a 8 °C ou superior a 33 °C (<https://pt.weatherspark.com/y/30333/Clima-característico-em-Amparo-Brasil-durante-o-ano>).

A Figura 3 apresenta a variação do período luminoso ao longo do ano na região de Amparo/SP, onde foi conduzido o experimento. O dia em que o sol nasce mais cedo é 28 de novembro, às 05:13. O nascer do Sol mais tarde ocorre 1 hora e 35 minutos depois, às 06:48 em 5 de julho. O dia em que o Sol se põe mais cedo é 6 de junho, às 17:29. O dia em que o Sol se põe mais tarde ocorre 1 hora e 28 minutos depois, às 18:57 em 14 de janeiro (<https://pt.weatherspark.com/y/30333/Clima-característico-em-Amparo-Brasil-durante-o-ano>).

Figura 3- Variação da luminosidade em número de horas ao longo do ano na região de Amparo/SP. As faixas coloridas indicam a luz solar total, crepúsculo (civil, náutico e astronômico) e noite



Fonte: (<https://pt.weatherspark.com/y/30333/Clima-característico-em-Amparo-Brasil-durante-o-ano>).

2.5.3. Doadoras de oócitos

O grupo de doadoras de oócitos foi constituído por novilhas púberes entre 18 e 27 meses, animais em lactação ou secas não gestantes ou com até 90 dias de gestação. As lactantes são ordenhadas duas vezes ao dia, produzindo ao redor de 10 litros de leite por dia, sendo aspiradas acima de 30 dias pós-parto. As doadoras são resultado do cruzamento entre as raças Murrah x Mediterrâneo, com escore de condição corporal (ECC) entre 3,0 e 4,0 e idade variando de 2 a 10 anos. As vacas costumam permanecer em piquetes com pastagem de Tifton 85 (*Cynodon nlemfuensis*) e as novilhas em piquetes de Mombaça (*Panicum maximum*), ocupando uma área mínima de 20 m²/animal. Somente as vacas em lactação são suplementadas, recebendo 2 kg de concentrado, administrado duas vezes ao dia, contendo 22% de proteína. Todas as vacas e novilhas têm acesso à água *ad libitum* e mistura mineral, à vontade.

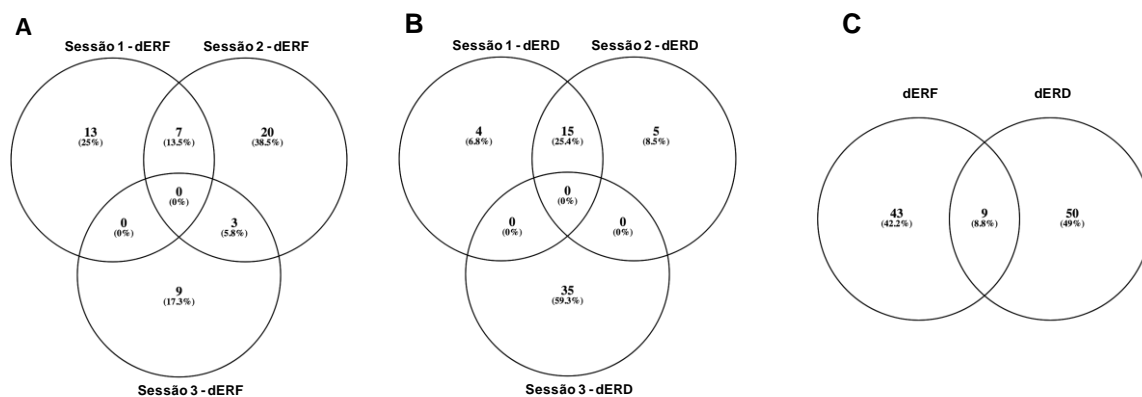
Para avaliação do ECC utilizou-se o sistema de pontuação de 1 a 5 (ECC 1 = muito magra e ECC 5 = obesa) (FERGUSON et al., 1994). As candidatas a doadoras foram submetidas, previamente, a um exame clínico para verificar sua condição uterina e ovariana, sem que houvesse nenhuma seleção baseada na população de folículos antrais. As fêmeas em idade reprodutiva são vacinadas para a IBR/BVD (Cattle Master Gold, Zoetis, USA), anualmente.

As doadoras foram aspiradas em dia aleatório do ciclo estral por via transvaginal, em intervalos que variaram de uma semana até um mês, dependendo da disponibilidade da fazenda para a realização do trabalho.

No período de 14 de janeiro de 2019 a 04 de dezembro de 2020 foram realizadas as sessões de OPU (3 na ERF e 3 na ERD). Já as 6 sessões de desvitrificação e as descongelações, seguidos da TE ocorreram entre 25 de junho de 2019 e 07 fevereiro de 2020 (3 na ERF e 3 na ERD).

Foram realizadas 136 aspirações foliculares (OPU) em 102 búfalas doadoras de oócitos, sendo que 62 OPU foram realizadas na estação reprodutiva favorável (ERF – meses de junho e julho) em três sessões e 74 OPU na estação reprodutiva desfavorável (ERD – meses de dezembro e janeiro), também em três sessões. Na ERF (dERF) foram aspiradas 52 búfalas, sendo 10 delas aspiradas duas vezes e outras 42 doadoras apenas uma vez. Já na ERD (dERD), foram aspiradas 59 búfalas, sendo que 15 delas duas vezes e outras 44 doadoras apenas uma vez. Das 102 doadoras, nove foram aspiradas tanto na ERF quanto na ERD, enquanto 43 foram aspiradas exclusivamente na ERF e 50 exclusivamente na ERD (Figura 4). Ainda, Das 74 OPU realizadas na ERD, 28 doadoras encontravam-se com CL, 26 estavam gestantes, 11 não apresentavam CL e 9 não foram observadas.

Figura 4 - Diagramas de Venn representando o número de doadoras submetidas à aspiração folicular:



Fonte: Própria autoria

Legenda: (A) nas três sessões de OPU de doadoras de oócito em ERF (dERF); (B) três sessões de OPU de doadoras de oócito em ERD (dERD); e (C) no total de OPU em dERF ou dERD.

2.5.4. Produção *in vitro* dos embriões bubalinos

2.5.4.1. Recuperação oocitária

Previamente à OPU, foi observada a categoria da doadora (novilha, vaca em lactação ou seca), a situação reprodutiva (vazia ou gestante) e anotada a presença ou não de CL nos ovários

e o lado em que se localizavam. Foi anotado também a presença de cistos foliculares ou qualquer outra observação. A ordem de entrada das doadoras para serem aspiradas foi estabelecida de acordo com os acasalamentos recomendados pelo criador, no sentido de observar uma “janela” de no máximo 4 horas para a fertilização com uma mesma dose de sêmen. As sessões de OPU se iniciavam entre 9:00h e 10:00h tendo as vacas em lactação preferência em relação à novilhas ou vacas secas para serem aspiradas em função do seu compromisso com a ordenha da tarde.

O procedimento foi realizado conforme a técnica modificada de humanos para a espécie bovina, descrita por Pieterse et al. (1988). Os CCOs das búfalas doadoras foram aspirados do interior do folículo por via transvaginal guiada por ultrassom. Foi utilizado aparelho de ultrassom Mindray (Mindray® China), modelo DP 2200, equipado com transdutor microconvexo de 5MHz acoplado a uma guia de aspiração folicular protegida por uma camisa sanitária, com presença de gel entre a extremidade da guia e a camisa. Para facilitar a operação, foi realizada anestesia epidural entre a última vértebra sacral e a primeira coccígea ou entre a primeira e segunda coccígeas, com 5 ml de lidocaína 2% (Lidovet: Bravet, RJ, Brasil). Para a aspiração folicular foram utilizadas agulhas descartáveis de 20 Gauge, acopladas a um mandril e conectadas a uma mangueira de polietileno que atinge o fundo de saco vaginal. Após fixar o ovário contra o transdutor por manipulação retal, a agulha alcança os folículos, após atravessar a parede vaginal.

Os CCOs foram removidos utilizando-se a pressão negativa de 70 a 80 mmHg (15 a 20 ml de solução /min), gerada por uma bomba de vácuo (WTA, Cravinhos, SP, Brasil). O conteúdo proveniente dos folículos aspirados foi armazenado em um tubo cônico de 50 ml (Corning, Corning, NY, EUA) conectado ao sistema com o auxílio de uma rolha metálica (WTA, Cravinhos, SP, Brasil). Foi utilizado o meio Dulbecco (PBS) acrescido de heparina sódica (10 UI/ml) na solução utilizada no tubo Falcon (50 ml) e no meio de lavagem, para evitar a formação de coágulos na linha de aspiração. O tubo cônico foi mantido no interior de um aquecedor portátil (WTA, Cravinhos, SP, Brasil) à temperatura de 36°C durante a aspiração cuja, duração foi de 10 minutos, em média. A solução resultante da aspiração completa foi transferida para um filtro de colheita de embriões com malha de 75 micra (WTA, Cravinhos, SP, Brasil) e imediatamente lavado com solução de PBS sem heparina, para melhorar as condições de visualização dos oócitos, na placa de Petri (90 x 15). Após a sedimentação, os CCOs foram localizados e removidos, utilizando-se um microscópio estereoscópico binocular (Opton).

2.5.4.2. Classificação, envase e maturação oocitária

Os critérios considerados para a avaliação dos CCOs foram a presença e o número de camadas, o grau de compactação das células do *Cumulus*, assim como o aspecto do citoplasma quanto à cor, homogeneidade e integridade (LEIBFRIED; FIRST, 1979). Oócitos atresícos ou degenerados foram desprezados. Após passagem em 3 gotas de meio TCM lavagem, os CCOs classificados como grau I, II e III foram considerados como viáveis e seguiram para o laboratório, juntamente com os oócitos desnudos e com citoplasma irregular (CI), em meio de maturação, sob óleo mineral, em tubos de vidro de 5 ml que receberam uma mistura gasosa com 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de N₂ por 10 a 15 segundos, antes de serem vedados e colocados na transportadora de oócitos (WTA, Cravinhos, SP, Brasil) a 38.5°C. A maturação oocitária foi realizada por um período de 24h em meio de maturação composto por TCM-199, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 0,20 mM de piruvato de sódio, 83,4 µg/mL de amicacina, 1 µg/mL FSH, 50 µg/mL hCG e estradiol (1 µg/mL). Durante esse período, os oócitos foram encaminhados para o laboratório de pesquisa da IVB Technologies (Genus PLC), localizado em Uberaba/MG.

2.5.4.3. Preparo do sêmen para a fecundação in vitro (FIV)

Previamente, duas doses de cada partida dos quatro touros utilizados na FIV foram analisadas pelo Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia (FMVZ–VRA), sob responsabilidade do Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda, utilizando como ferramentas de avaliação espermática as sondas fluorescentes e o Sistema Computadorizado (CASA - *Computer Assisted dayem Sperm Analysis*) (ARRUDA et al., 2011). O objetivo dessa análise foi certificar que o sêmen possuía qualidade adequada para serem utilizados na FIV

2.5.4.4. Fecundação in vitro (FIV)

A FIV ocorreu entre 23 e 25 horas após a OPU utilizando-se sêmen convencional de touros da raça Mediterrânea, distribuídos de forma aleatória, descongelado (36° C por 30 s). A seleção dos espermatozoides seguiu o método de Gradiente de Percoll, usando 2 ml de Percoll 45% e 2 ml de Percoll de 90% conforme descrito por Parrish et al. (1995). A concentração do sêmen foi ajustada para 25 x 10⁶ espermatozoides (sptz) móveis/mL e um volume inseminante de 10 µl foi adicionado em cada gota de 90 µL de TALP-FIV (TALP suplementado com 10

g/mL de heparina, 18 M de penicilamina, 10 M de hipotaurina e 8 M de epinefrina) sob óleo mineral contendo até 30 oócitos.

O período de co-incubação foi de 20 h em incubadora a 38,5° C com 5% CO₂ em ar e umidade máxima. Após esse período, as células do *cumulus* e o excesso de espermatozoides foram removidos por agitação em vórtex, lavados uma vez com meio de cultivo de fluido sintético de oviduto suplementado com aminoácidos essenciais e não essenciais (SOFaa) e colocados na gota final de cultivo.

2.5.4.5. Cultivo *in vitro* (CIV)

Os prováveis zigotos foram cultivados em grupos de 25 a 30 em 100 µl de meio de cultivo embrionário (IVB Technologies, Genus PLC) sob óleo mineral em incubadora contendo 5% de O₂, 5% CO₂ e 90% N a 38,5° C e umidade saturada. Considerando-se a FIV como tendo ocorrido no Dia zero (D0), no D4 foi realizada a substituição de 50% do volume das gotas de cultivo pelo meio *feeding* conforme o protocolo estabelecido pela IVB Technologies (Genus PLC). A taxa de clivagem foi avaliada no D4, quando o embrião estava com 8 a 16 células. A taxa de produção foi determinada e a criopreservação dos embriões realizada entre os dias seis e meio e sete do cultivo.

2.5.5. Criopreservação dos embriões

Os embriões foram classificados segundo os normas estabelecidas no manual da International Embryo Transfer Society (IETS) (STRINGFELLOW and GIVENS, 2010) e criopreservados utilizando-se dois métodos: VT e a TD dos embriões.

Entre vários métodos possíveis para a VT de embriões, foi utilizado para esse experimento a OPS (*open pulled straw*), desenvolvido por VAJTA et al. (1997;1998).

Anterior à criopreservação os embriões foram classificados com relação ao grau de desenvolvimento e qualidade embrionária. Somente os embriões qualidade 1 e 2 que atingiram o estágio de blastocisto (BL) e blastocisto expandido (BX) foram criopreservados. Os protocolos de criopreservação embrionária foram realizados seguindo os protocolos desenvolvidos pela IVB Technologies (Genus PLC) e conforme descritos por Sanches et al (2016). Resumidamente, durante a VT os embriões foram incubados por 1 minuto em solução contendo 10% de EG e 10% de DMSO. Logo em seguida, os embriões foram incubados por 20 segundos em solução de 20% EG e 20% DMSO, colocados nas OPS (*Open Pulled Straw*) e

mergulhados em nitrogênio líquido. Durante o congelamento lento (TD) os embriões foram incubados em meio de congelamento lento contendo 1.5M de EG por 10 minutos e envazados em palhetas de 0.25ml e congelados em equipamento com descida da curva programada para congelamento lento de embriões conforme protocolo desenvolvido pela IVB Technologies (Genus PLC).

Para avaliar o efeito do método de criopreservação, 162 embriões foram transferidos, dos quais 92 VT e 70 TD. Dos 92 embriões VT transferidos, 51 foram de dERF e 41 dERD. Dos 70 TD transferidos, 35 foram produzidos em cada estação (dERF e dERD).

2.5.6. *Receptoras de embriões*

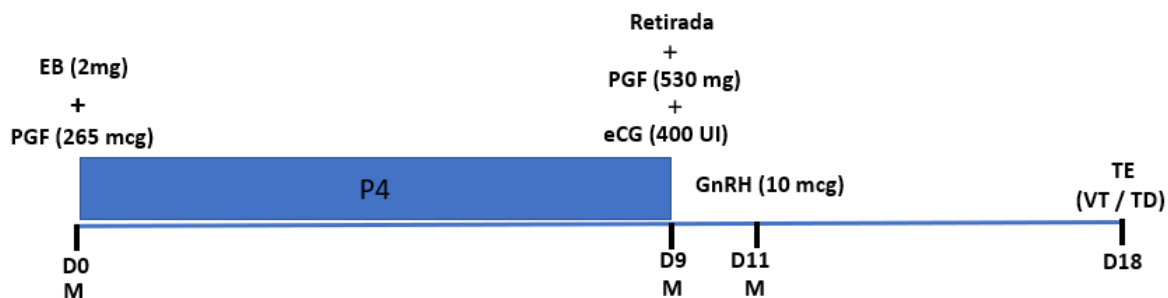
2.5.6.1. Características das receptoras

As receptoras utilizadas eram novilhas púberes, animais em lactação, primíparas ou pluríparas, acima de 30 dias pós-parto, ou secas não gestantes. O peso das receptoras variou de 400 a 500 kg para novilhas e 500 a 700 kg para vacas. As receptoras que não gestaram após a segunda tentativa, foram excluídas do programa. Algumas receptoras também se comportaram como doadoras de oócitos.

2.5.6.2. Sincronização das receptoras

O protocolo de sincronização das receptoras para transferência em tempo fixo (TETF) foi iniciado em dia aleatório do ciclo estral, considerado Dia zero do protocolo (D0), quando as búfalas receberam um dispositivo monodose intravaginal contendo 0,96g de P₄ (Progestar, Boehringer, Brasil) associado à administração i.m. de 2 mg de benzoato de estradiol (Estrovulinn, Boehringer, Brasil) e 265 mcg de cloprostenol sódico (Cioprostinn, Boehringer, Brasil). No Dia 9 (D9) o dispositivo intravaginal foi retirado, administrando-se 530 mcg de Cloprostenol Sódico (Cioprostinn, Boehringer, Brasil) e 400 UI de eCG (Novormon, MSD Saúde Animal, Brasil), via i.m. No Dia 11 (D11) 10 µg de Acetato de Buserelina (Prorelinn, Boehringer, Brasil), por via i.m. Os embriões foram transferidos no Dia 18 (D18), 7 dias após o cio, conforme demonstrado na figura 5.

Figura 5 - Protocolo para transferência de embriões em tempo fixo (TETF), descongelados ou reaquecidos, em receptoras bubalinas.



Fonte: Própria autoria

Legenda: D0, D9, D11 e D18 = manejo ou atividade durante o protocolo; BE = Benzoato de Estradiol; PGF = Prostaglandina F2alfa; eCG = Gonadotrofina Coriônica Equina; GnRH = Hormônio Liberador das Gonadotrofinas; TE = Transferência de Embriões; VT = embriões vitrificados; TD = embriões congelados para transferência direta.

Durante o experimento foram sincronizadas 193 receptoras, das quais 104 (53,9%) vacas e 89 novilhas (46,1%). Entre as 193 receptoras avaliadas, 165 (85,5%) apresentavam CL e 162(83,9%) foram utilizadas. Em relação à categoria das receptoras que apresentaram CL, 88,5% (92/104) correspondeu às vacas e 82,0% (73/89) às novilhas. Uma vaca (1,1%) não foi utilizada por não ter sido possível a transposição dos anéis cervicais. Já entre as novilhas duas (2,8%) não foram utilizadas pelo mesmo motivo. Entre as receptoras protocoladas, não foi observada nenhuma queda do dispositivo introduzido por via intravaginal ao ser realizado o manejo no dia 9 (D9) do protocolo.

Para avaliar o efeito da sazonalidade reprodutiva sobre a TC também foi testado o efeito da categoria animal. Dos 162 embriões transferidos, 91 foram transferidos para vacas e 71 para novilhas. (Tabela 1).

Tabela 1 – Receptoras utilizadas de acordo com a categoria, novilha ou vaca, na rERF e rERD, recebendo embriões de dERF e dERD.

Doadora	Receptora	TE - Vacas	TE - Novilhas
dERF	rERF	15	23
dERF	rERD	13	20
dERD	rERF	33	15
dERD	rERD	30	13
Total		91	71

Fonte: Autoria Própria

Legenda: TE = transferência de embriões; dERF = doadoras aspiradas na estação reprodutiva favorável; dERD = doadoras aspiradas na estação reprodutiva desfavorável; rERF = receptoras que receberam embriões na estação reprodutiva favorável; rERD = receptoras que receberam embriões na estação reprodutiva desfavorável

2.5.7. *Transferência dos embriões*

Para desvitrificação, as OPS foram retiradas do N líquido e expostas a temperatura ambiente por 4 segundos antes de serem mergulhadas em solução de descongelamento (IVB Technologies, Genus PLC) e lavados por duas vezes em solução contendo 0.3M e 0.15M de sacarose por 5 minutos cada e mantidos em solução de manutenção (IVB Technologies, Genus PLC) até serem envazados para transferência embrionária.

Para descongelamento dos embriões TD, as palhetas foram mantidas em ar por 10 segundos e mergulhadas em banho-maria a 35 C por 30 segundos. As palhetas foram secas em papel toalha, agitadas para promover a mistura dos meios dentro da palheta e os embriões imediatamente transferidos para receptoras previamente sincronizadas. O DG foi realizado em torno de 30 dias do desenvolvimento embrionário, por ultrassonografia modo B, levando-se em conta o desenvolvimento da vesícula embrionária e presença do embrião, sendo a confirmação do diagnóstico detectada ao redor de 60 dias de gestação, observando-se o batimento cardíaco fetal, verificando-se a perda embrionária/fetal no período.

2.5.8. *Análise estatística*

Os dados referentes à recuperação de oócito e produção de embriões foram submetidos a análise de variância. Foram consideradas como variáveis a (I) categoria animal da doadora (novilha ou vaca); (II) status gestacional (gestante ou não-gestante); (III) acasalamento; e (IV) a estação reprodutiva da doadora (dERF ou dERD).

Os resultados de taxa de concepção foram comparados por qui-quadrado. Foram considerados os efeitos da estação reprodutiva da doadora (dERF ou dERD), a estação reprodutiva da receptora (rERF ou rERD), a categoria animal da receptora (novilha ou vaca) e o método de criopreservação (VT ou TD). Foi considerado como nível de significância o valor referente de 5% para todas as análises.

2.6. RESULTADOS

2.6.1. Efeito da sazonalidade reprodutiva sobre a recuperação oocitária e produção *in vitro* de embriões bubalinos

As 136 aspirações resultaram na recuperação de 1.213 oócitos dos quais 772 (63,6%) foram considerados viáveis. Um total de 948 (78,2%) prováveis zigotos (oócitos possivelmente fertilizados) foram cultivados *in vitro* (CIV), e destes 590 clivaram (62,2% = taxa em relação a CIV) resultando em 264 (27,8%) embriões. Dos 264 embriões produzidos, 241 (91,3%) foram considerados viáveis para serem criopreservados, enquanto 23 foram desprezados (8,7%) por não serem embriões grau 1 e não estarem aptos à criopreservação. Dos 264, 134 foram vitrificados (50,8%) e 107 foram congelados para TD (40,5%) (Tabela 2).

Tabela 2 - Resultados da recuperação oocitária e produção *in vitro* de embriões de doadoras bubalinas aspiradas em dia aleatório do ciclo estral na estação reprodutiva favorável (dERF) ou desfavorável (dERD).

ER	n.OPU	TO	TO/OPU	OV	OV/OPU	CIV	CIV/OPU	CLIV	%CLIV	CLIV/OPU	EMB	%EMB	EMB/OPU	VT	TD	ÑAP
dERF	30	215	7.2	141	4.7	187	6.2	165	88.2%	5.5	36	19.3%	1.2	20	16	0
dERF	12	90	7.5	63	5.3	78	6.5	44	56.4%	3.7	22	28.2%	1.8	14	7	1
dERF	20	168	8.4	109	5.5	132	6.6	67	50.8%	3.4	36	27.3%	1.8	20	16	0
Total dERF	62	473	7.6	313	5.0	397	6.4	276	69.5%	4.5	94	23.7%	1.5	54	39	1
dERD	19	191	10.1	138	7.3	148	7.8	105	70.9%	5.5	52	35.1%	2.7	29	23	0
dERD	20	208	10.4	165	8.3	143	7.2	100	69.9%	5.0	52	36.4%	2.6	25	19	8
dERD	35	341	9.7	156	4.5	260	7.4	109	41.9%	3.1	66	25.4%	1.9	26	26	14
Total dERD	74	740	10.0	459	6.2	551	7.4	314	57.0%	4.2	170	30.9%	2.3	80	68	22
Total geral	136	1213	8.9	772	5.7	948	7.0	590	62.2%	4.3	264	27.8%	1.9	134	107	23

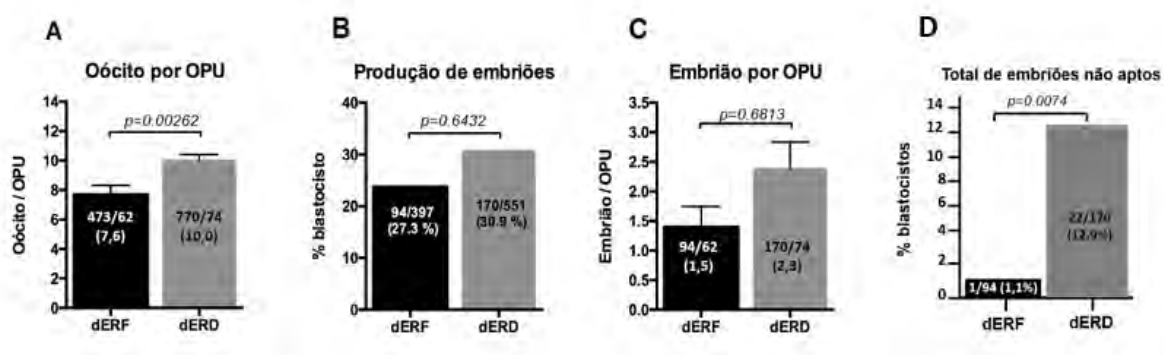
Fonte: Própria

Legenda: ER = estação reprodutiva da doadora de oócitos; n.OPU = número de aspirações por sessão; TO = total de oócitos; TO/OPU = Total de oócitos por sessão de aspiração; OV = Oócitos viáveis; OV/OPU = Oócitos viáveis por sessão de aspiração; CIV = Oócitos maturados e fertilizados colocados no cultivo *in vitro*; CIV/OPU = Oócitos cultivados *in vitro* por sessão de aspiração; CLIV = Total de embriões clivados; %CLIV = Porcentagem de embriões clivados; EMB = número de embriões produzidos; % EMB = porcentagem de embriões produzidos; EMB/OPU = embriões produzidos por sessão de aspiração; VT = total de embriões vitrificados; TD = total de embriões congelados para transferência direta; ÑAP = total de embriões não-aptos à criopreservação.

Comparando-se os resultados de recuperação oocitária e produção *in vitro* de embriões bubalinos entre dERF e dERD nota-se que o número médio de oócitos recuperados por OPU diferiu entre as estações reprodutivas (7,6 em dERF vs 10,0 em dERD; p=0,0262), sendo que a

produção média de embriões (23,7% em dERF vs 30,9% em dERD; 0,6432) e o número médio de embriões por OPU (1,5 em dERF vs 2,3 em dERD; 0,6813) foram similares. Ao se comparar o total de embriões não aptos à criopreservação, houve diferença entre aqueles produzidos em dERF e dERD (1,1 vs 12,9; $p=0,0074$) (Figura 6).

Figura 6 - Comparação da recuperação oocitária, taxa de produção de embriões, número de embriões totais e não aptos à serem criopreservados de doadoras bubalinas nas estações reprodutivas favorável (dERF) de desfavorável (dERD).



Fonte: Própria autoria

Legenda: (A) Número médio de oócitos recuperados de doadoras bubalinas; (B) taxa de produção *in vitro*; (C) número médio de embriões produzidos *in vitro*; e (D) percentual de embriões não aptos a serem criopreservados, em ERF (dERF) ou ERD (dERD). Diferenças entre grupos estão indicadas por colchetes e valores de p acima das barras. Em (A) e (C) as barras indicam as médias e as barras de erro indicam o erro padrão da média. Em (B) e (D) as barras indicam a porcentagem.

2.6.2. Efeito da sazonalidade reprodutiva no estabelecimento da gestação: “influências da doadora de oócitos e da receptora de embriões”

Para avaliar os efeitos da sazonalidade reprodutiva embriões produzidos *in vitro* a partir da OPU de doadoras na ERF (dERF) ou na ERD (dERD) foram transferidos para receptoras de embrião em ERF (rERF) ou ERD (rERD). Um total de 162 embriões foram transferidos, resultando em 57 gestações (Tabela 3).

Tabela 3 - Taxa de concepção aos 30 dias após transferência de embriões bubalinos produzidos *in vitro* e criopreservados. Os embriões foram produzidos a partir de oócitos de doadoras na ERF (dERF) ou na

ERD (dERD) e transferidos para receptoras bubalinas na ERF (rERF) ou na ERD (rERD).

Grupo	TE	Prenhez (30d)	TC (%)
dERF-rERF	38	19	50.0%
dERF-rERD	48	21	43.8%
dERD-rERF	33	8	24.2%
dERD-rERD	43	9	20.9%
Total	162	57	35.2%

Efeito principal: Doadora de Oócito			
Grupo	TE	Prenhez (30d)	TC (%)
Total-rERF	86	40	46.5%
Total-rERD	76	17	22.4%
Total	162	57	35.2%

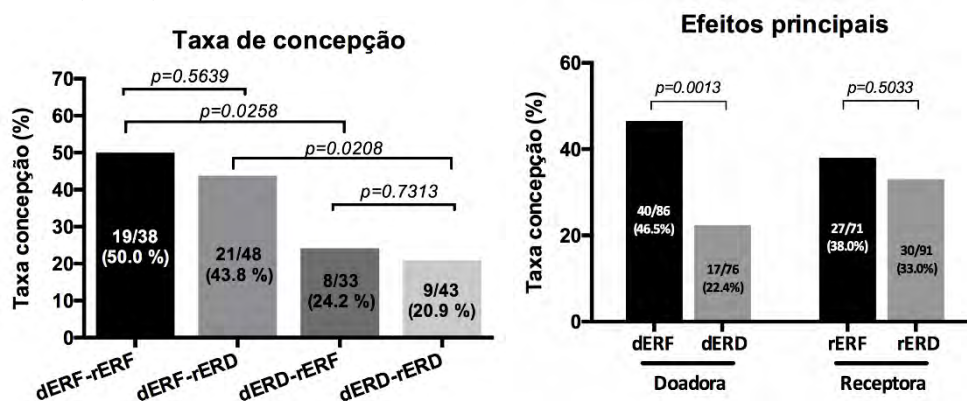
Efeito principal: Receptora de Embrião			
Grupo	TE	Prenhez (30d)	TC (%)
Total-rERF	71	27	38.0%
Total-rERD	91	30	33.0%
Total	162	57	35.2%

Fonte: Própria autoria

Legenda: TE = número de embriões transferidos; Prenhez (30d) = número de receptoras prenhas aos 30 dias; TC = taxa de concepção.

As taxas de concepção foram significativamente superiores ($p < 0,05$) quando os embriões eram oriundos de doadoras em ERF, independentemente da estação reprodutiva da receptora de embrião. De forma contrária, não foram observadas diferenças significativas na TC comparando-se receptoras de embrião em ERF ou ERD, independentemente da estação reprodutiva da doadora de oócitos (Figura 7).

Figura 7 - Taxa de concepção de embriões bubalinos produzidos in vitro a partir de doadoras de oócitos aspiradas na ERF (dERF) ou ERD (dERD) e transferidos para receptoras em embriões na ERF (rERF) ou ERD (rERD).



Fonte: Própria

2.6.3. Efeito da sazonalidade reprodutiva no estabelecimento da gestação: “influências da categoria (vaca versus novilha) da receptora de embriões”

O total de 162 embriões bubalinos produzidos *in vitro*, oriundos de doadoras em estações reprodutivas favorável ou desfavorável, foram transferidos para receptoras em estações reprodutivas favorável ou desfavorável. Duas categorias de receptoras bubalinas foram utilizadas: vacas e novilhas. A TC no grupo de novilhas foi superior ($p < 0,05$) ao do grupo de vacas. Observando-se o resultado estratificado de acordo com a estacionalidade reprodutiva das doadoras (dERF ou dERD) e receptoras (rERF ou rERD) verifica-se que a TC em novilhas foi superior ao das vacas para a combinação dERF-rERF (Tabela 4).

Tabela 4 - Taxa de concepção (TC) de embriões bubalinos produzidos *in vitro* e transferidos para receptoras de embrião de duas diferentes categorias: vacas e novilhas. Os embriões foram produzidos a partir de oócitos de doadoras na ERF (dERF) ou na ERD (dERD) e transferidos para receptoras bubalinas na ERF (rERF) ou na ERD (rERD)

Efeito principal: doadora e oócito					
Grupo	Cat.Recep	TE	Prenhez(30d)	TC(%)	Valor de p
Total ERF	Vaca	28	6	21.4%	$p=0.020$
	Novilha	43	21	48.8%	
Total ERD	Vaca	63	20	31.7%	$p=0.710$
	Novilha	28	10	35.7%	
Total		162	57	35.2%	

Efeito principal: receptoras e embrião					
Grupo	Cat.Recep	TE	Prenhez(30d)	TC(%)	Valor de p
Total ERF	Vaca	48	17	35.4%	$p=0.021$
	Novilha	38	23	60.5%	
Total ERD	Vaca	43	9	20.9%	$p=0.721$
	Novilha	33	8	24.2%	
Total		162	57	35.2%	

Grupo	Cat.Recep	TE	Prenhez(30d)	TC(%)	Valor de p
Total	Vaca	91	26	28.6%	$p=0.046$
	Novilha	71	31	43.7%	
Total		162	57	35.2%	

Grupo	Cat.Recep	TE	Prenhez(30d)	TC(%)	Valor de p
dERF rERF	Vaca	15	2	13.3%	$p=0.0001$
	Novilha	23	17	73.9%	
dERF rERD	Vaca	13	4	30.8%	$p=0.481$
	Novilha	20	4	20.0%	
dERD rERF	Vaca	33	15	45.5%	$p=0.724$
	Novilha	15	6	40.0%	
dERD rERD	Vaca	30	5	16.7%	$p=0.296$
	Novilha	13	4	30.8%	
Total		162	57	35.2%	

Fonte: Própria autoria

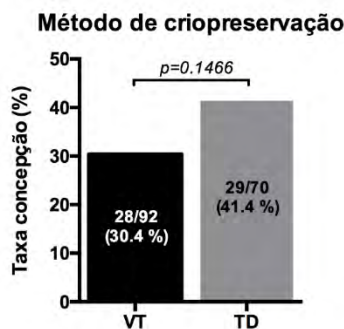
Legenda: Cat.Recep = Categoria da receptora de embrião; TE = número de embriões transferidos; Prenhez (30d) = número de receptoras prenhas aos 30 dias; TC = taxa de concepção.

2.6.4 Taxas de concepção de embriões criopreservados por vitrificação ou em curva lenta para transferência direta

No período em que foi desenvolvido o experimento um total de 162 embriões criopreservados, oriundos das ERF ou ERD, foram transferidos para receptoras em ERF ou ERD. Destes 162 embriões criopreservados, 92 foram vitrificados (VT) e 70 foram congelados em curva lenta para TD. Os 92 embriões desvitrificados e transferidos originaram 28 prenhez (30,4%) no diagnóstico precoce (DP), aos 30 dias de gestação. Já os 70 embriões descongelados para TD resultaram em 29 prenhez (41,4%). Não houve diferença ($p=0,1466$) entre as taxas de concepção a partir de embriões VT ou TD (Figura 8). Na confirmação do diagnóstico de gestação, aos 60 dias, foram constatadas 3 perdas embrionárias e/ou fetal de ($3/29 = 10,3%$) no

grupo TD. Nas 28 gestações originadas de embriões desvitrificados não houve perda gestacional. Portanto, a TC aos 60 dias foi de 30,4% (28/92) para embriões VT e 37,1% (29/70) para embriões TD.

Figura 8 - Taxa de concepção aos 30 dias a partir embriões bubalinos criopreservados por vitrificação (VT) ou em curva lenta para transferência direta (TD).



Fonte: Própria autoria

Efeitos dos métodos de criopreservação (VT vs TD) nas taxas de concepção também foram avaliados considerando-se a estacionalidade reprodutiva de doadoras de oócitos e receptoras de embriões bubalinos. Exceto por um efeito significativo entre VT e TD para a associação dERD-rERF, não houve diferenças entre as taxas de concepção resultantes de embriões bubalinos produzidos *in vitro* e criopreservados por VT ou congelamento em curva lenta para TD (Tabela 5). Não foram verificadas perdas embrionárias/fetais quando embriões vitrificados foram utilizados e entre as gestações resultantes de embriões TD foram constatadas 2 perdas. Em ambos os casos as receptoras eram novilhas e os embriões produzidos na dERD. Quanto à estação da TE, uma perda foi verificada na rERD e outra na rERF. A taxa geral de perda foi de 3,5% (2/57) e quanto ao método de criopreservação utilizado de 6,7% (2/29).

Tabela 5 - Taxa de concepção aos 30 dias após transferência de embriões bubalinos produzidos *in vitro* e criopreservados por vitrificação (VT) ou por congelamento em curva lenta para transferência direta (TD). Os embriões foram produzidos a partir de oócitos de doadoras na ERF (dERF) ou na ERD (dERD) e

transferidos para receptoras bubalinas na ERF (rERF) ou na ERD (rERD)

Efeito principal: doadora de oócito					
Grupo	Crio	TE	Prenhez (30d)	TC (%)	Valor de p
Total rERF	VT	51	21	41.2%	p=0.231
	TD	35	19	54.3%	
Total rERD	VT	41	7	17.1%	p=0.230
	TD	35	10	28.6%	
Total		162	57	35.2%	

Efeito principal: receptora de embrião					
Grupo	Crio	TE	Prenhez (30d)	TC (%)	Valor de p
Total rERF	VT	43	14	32.6%	p=0.239
	TD	28	13	46.4%	
Total rERD	VT	49	14	28.6%	p=0.335
	TD	42	16	38.1%	
Total		162	57	35.2%	

Fonte: Própria autoria

Legenda: TE = número de embriões transferidos; Prenhez (30d) = número de receptoras prenhas aos 30 dias; TC = taxa de concepção

2.6. DISCUSSÃO

2.6.4. Efeito da sazonalidade reprodutiva sobre a recuperação oocitária e produção *in vitro* de embriões bubalinos

O presente estudo verificou que doadoras submetidas às sessões de OPU na dERF produziram menos oócitos por sessão de OPU (7,6 vs 10,0) e menor percentual de embriões não aptos à criopreservação (1,1 vs 12,9) em comparação com dERD. Entretanto, o número médio de embriões produzidos por OPU (1,5 vs 2,3) e a produção média de embriões (23,7 vs 30,9%) não diferiu, conforme demonstrado na Figura 6. Embora a taxa de clivagem tenha sido menor na dERD (57,0 % na dERD vs 69,5 % na dERF) a quantidade de oócitos recuperados foi maior o suficiente para que a produção média de embriões nessa estação reprodutiva fosse superior. Esse número superior de oócitos recuperados e o número elevado de embriões produzidos encontrados nesse estudo está provavelmente relacionado com aspectos fisiológicos dos ovários de búfalas que devem permanecer em investigação. A esse respeito, baseados nos resultados desse estudo, os ovários de dERD parecem ter mais folículos comparados com ovários em dERF. Em estudo conduzido com ovários de abatedouro, não foi observada diferença em termos de oócitos recuperados por ovário, na estação favorável ou desfavorável, mas a porcentagem de oócitos menores foi maior na primavera/verão ($ERD = 0.9 \pm 0.1$ e 0.9 ± 0.2) comparado com o outono/inverno (0.3 ± 0.1 e 0.2 ± 0.1) (DI FRANCESCO et al., 2011). Deve-se destacar que durante a dERD há crescimento folicular com a taxa de ovulação diminuída (DAS, et al., 2010; ZICARELLI, 2010). Assim o folículo dominante (FD) durante a ERD poderia produzir baixa

concentração de estrógenos e inibina e, conseqüentemente poderia permitir um alto número de folículos continuarem crescendo. Corroborando com essa hipótese, búfalas submetidas à superovulação apresentaram maior número de corpos lúteos e produção de embriões quando não havia FD comparada com búfalas em que o FD não estava presente (TANEJA, et al., 1995).

Diversos autores reportam que a maior eficiência da PIVE em bubalinos está associada à sazonalidade (FRANCESCO et al., 2011; PHOGAT et al., 2016; GASPARRINI, 2019), notadamente favorecendo a dERF. Entretanto, nas condições experimentais do presente estudo, de excelente padrão nutricional ao longo do ano e variação no fotoperíodo de apenas 2 horas e 48 minutos entre a ERF e ERD, pode ter atenuado o efeito da estacionalidade.

Entre os dados que obtivemos é importante observar as proporções de blastocistos viáveis produzidos aptos à criopreservação (VT e TD). Embora tenhamos obtido um número maior de blastocistos na dERD, $n = 170$, 12,9% (22/170) foram descartados enquanto na dERF, $n = 94$, apenas 1,06% (1/94) não estavam aptos à criopreservação. Esse fato sugere que apesar de serem produzidos em maior quantidade, há necessidade de verificar a competência desses embriões no estabelecimento da gestação.

Como o experimento foi realizado em uma empresa comercial, um dos fatores limitantes desse estudo foi não utilizar as mesmas doadoras nas duas estações reprodutivas. Na ERF foram realizadas 62 aspirações em 52 doadoras e na ERD foram 74 aspirações em 59 doadoras. Entre as doadoras, apenas nove também foram aspiradas na ERF e ERD. Na verdade, as doadoras que gestarem na ERF, o que é natural, estarão impossibilitadas de serem aspiradas na ERD, pois estarão com gestação adiantada. Para serem aspiradas na ERD, as doadoras teriam que permanecer vazias, tomando-se o cuidado de não haver aumento exagerado do ECC, em função da diminuição progressiva na produção de leite, no decorrer dos meses. Conclui-se que novos estudos devem ser realizados para verificar a confirmação dos resultados em regiões situadas próximo à latitude (coordenadas 22 35 49S/46 51 13 W) e altitude (695m) em que foi conduzido o experimento.

2.6.5. Efeito da sazonalidade reprodutiva no estabelecimento da gestação: “influências da doadora de oócitos e da receptora de embriões”

De acordo com os resultados obtidos nesse estudo, verificou-se que a doadora de oócitos é um fator preponderante no processo da PIVE e que embriões produzidos na ERF são mais eficientes no estabelecimento da gestação do que aqueles produzidos na ERD. Adicionalmente, podemos considerar que o ambiente uterino exerce um papel de menor relevância,

possibilitando que as receptoras possam ser utilizadas durante as duas estações reprodutivas, desde que os embriões sejam produzidos na ERF. Dessa forma, haverá possibilidade de êxito em programas de PIVE envolvendo doadoras na ERF e receptoras em ambas as estações reprodutivas.

Neglia, et al. (2004) pela primeira vez relataram gestações originadas de embriões vitrificados de búfalas. Foram transferidos sete embriões frescos e oito vitrificados, após o reaquecimento. Curiosamente nenhuma gestação foi obtida dos embriões frescos e dos oito reaquecidos, três receptoras se tornaram gestantes (37,5%). Foram relatadas duas crias nascidas em fevereiro de 2003, já que uma gestação foi interrompida aos 180 dias. A concepção nessas receptoras ocorreu em abril, considerada ERD, já que a primavera ocorre entre 21 de março à 20 de junho.

Em estudo conduzido por Saliba et al., (2013), de abril a dezembro de 2010 em Pedro Leopoldo/MG, foram transferidos 115 embriões frescos (graus 1 a 3) e 70 embriões vitrificados (apenas grau 1) pelo método *cryotop*, produzidos *in vitro*. As receptoras foram sincronizadas em protocolos para TETF e a TC aos 30 dias de gestação foi de 43,5% (50/115) e 37,1% (26/70) para os embriões frescos e vitrificados, respectivamente, sendo observada 2 perdas (4,0%) nos embriões frescos e 4 perdas no vitrificados (15,4%), até os 60 dias de gestação. Considerando a TC aos 60 dias de 31,4% (22/70) o índice se assemelha ao obtido no presente estudo de 30,4% (28/92), uma vez que não foi registrada nenhuma perda após o diagnóstico precoce da gestação. Talvez um ponto vulnerável de se utilizar embriões frescos seja a possibilidade de transferir embriões de menor qualidade (grau 2 e 3) e a necessidade nem sempre haver a quantidade de receptoras disponíveis. O período em que foram realizados os trabalhos envolve parte do outono, o inverno e parte da primavera e o efeito da sazonalidade na produção dos embriões e no estabelecimento da gestação.

Em outro experimento, conduzido por Hufana-Duran et al. (2004), 95 embriões produzidos *in vitro*, vitrificados em solução EFS40 (etilenoglicol 40%, ficoll 18% e sacarose 0,3 M) e reaquecidos em solução de 0,5M de sacarose foram transferidos para 55 receptoras (1 a 3 embriões por receptora), das quais 9 (16,4%) se encontraram gestantes 45 dias após a TE. No primeiro trimestre de gestação foram registradas 3 (33,3%) perdas fetais. Em nosso estudo, foram transferidos 92 embriões vitrificados e reaquecidos que apresentaram TC de 30,4% (28/92), considerando a ERF e ERD. Das 28 gestações, não foi registrada nenhuma perda aos 60 dias. Porém em nosso estudo foi transferido apenas um embrião por receptoras. No estudo de Hufana-Duran, et al., (2004) não ficou claro se entre as receptoras gestantes, alguma recebeu mais de um embrião e em que época do ano foi realizado o experimento. De forma interessante,

a palheta francesa de 0,25cc foi adaptada para receber o embrião em uma das extremidades, que foi transformada em forma de bisel, como a OPS. No preparo das receptoras foi utilizada a PGF2 alfa e as receptoras foram avaliadas somente por palpação retal, sendo observados os cios, 36 a 72 horas após a aplicação do medicamento a cada quatro horas e detectados tanto os cios naturais como induzidos. Com essa informação, deduzimos que as búfalas se encontravam na ERF, por estarem ciclando e que seria mais indicado o acompanhamento ultrassonográfico, devido à dificuldade de avaliação manual de forma correta do CL. Em um segundo estudo, esse autor apresentou resultados de 12,5% (5/40) e 10% (4/40) na TC e produtos nascidos, também de embriões vitrificados. Nesse caso, 40 búfalas do pântano (2n=48) foram utilizadas como receptoras de embriões produzidos de búfalas do rio (2n=50) (HUFANA-DURAN, et al., 2007).

Responsável pelo nascimento das duas primeiras crias originadas de embriões PIVE de búfalas, vitrificados e reaquecidos, Sá Filho, et al. (2005), obtiveram TC de 8% (2/25), utilizando protocolo *Ovsynch* (GnRH/PGF2 α /GnRH), para sincronização das receptoras bubalinas (novilhas), com aproveitamento de 80% (32/40). Nesse estudo, o aproveitamento de receptoras foi 85,5% (165/193), sendo de 82% (73/89) para novilhas e 88,5% (92/104) para vacas, porém utilizando protocolos à base de P4 e estrógenos. Como os embriões foram produzidos entre junho e agosto de 2004, de acordo com nosso estudo, a TC poderia ter sido melhor, pois obtivemos TC de 41,8% (21/51) para embriões produzidos na ERF e transferidos para receptoras nas duas estações, utilizando novilhas e vacas. Quando utilizamos somente novilhas, como no experimento de Sá Filho et al. (2005), a TC desse estudo passou para 63,6% (14/22).

No caso da exploração leiteira, é importante a distribuição dos partos ao longo do ano de forma equilibrada para manter uma produção homogênea e atender o mercado (BARUSELLI, et al., 2003). Dessa forma, a PIVE poderia se concentrar na ERF com a criopreservação dos embriões e a inovulação ser distribuída em vários meses do ano. As doadoras poderão ser aspiradas a partir de 30 dias pós-parto até três meses de gestação, em intervalos de uma, duas ou três semanas, levando-se em consideração que a frequência entre as aspirações pode afetar o número de folículos disponíveis (FERRAZ et al., 2015). Konrad et al. (2017) observaram que sessões de OPU em intervalos de 14 dias aumentaram a quantidade de oócitos (4,5 \pm 0,49/doadora) comparado a intervalos de 7 dias (2,8 \pm 0,45/doadora). Contudo, aspirações a cada 14 dias diminuí a taxa de recuperação e a disponibilidade de oócitos de boa qualidade, não modificando a taxa final de blastocistos.

Como consequência da sazonalidade, a parição em determinada época do ano para a produção de carne, é uma característica que facilita o manejo dos nascimentos, do desmame, da

recria, da terminação e do abate. Entretanto, em criações voltadas para a produção leiteira, esta concentração da parição faz com que a produção de leite seja heterogênea ao longo do ano (BARUSELLI et al., 2003).

Um aspecto limitante nesse experimento foi não ter comparado embriões produzidos a fresco com embriões criopreservados. Também poderia ter sido conduzido estudo dos genes relacionados com a qualidade oocitária e a criopreservação, envolvidos nas duas estações reprodutivas, aproveitando os CCOs recuperados. Da mesma forma poderia ter sido estudada a expressão de genes envolvidos com a qualidade dos embriões, utilizando tanto aqueles classificados para serem criopreservados, quanto os que foram descartados.

2.6.5.1. Efeito da sazonalidade reprodutiva no estabelecimento da gestação: “influências da categoria (vaca *versus* novilha) da receptora de embrião”

Analisando os efeitos principais, doadora de oócito e receptora de embrião, verifica-se diferença entre as categorias das receptoras (novilha *vs* vaca) quando a doadora está na ERF ($p=0,020$) e a receptora também está na ERF ($p=0,021$), favorecendo as novilhas, conforme observado na Tabela 5.

As novilhas são manejadas de forma menos intensa permanecendo em piquetes com boa fonte de água, pastagem de boa qualidade, apesar da época seca e mistura mineral à vontade. Já as vacas em lactação são manejadas de forma mais intensa, sendo encaminhadas para a ordenha duas vezes ao dia, recebendo suplementação de 2 kg de concentrado com 22% de proteína, além da pastagem. Talvez essa diferença no manejo possa favorecer as novilhas a terem melhor performance reprodutiva. Outro ponto a ser destacado é que mais novilhas do que vacas (43 *vs* 28) receberam embriões produzidos em dERF e contrariamente, mais vacas do que novilhas (63 *vs* 28) receberam embriões produzidos em dERD, o que pode ter favorecido as novilhas.

Kandil et al. (2012), pela primeira vez que houve sucesso em recuperar embriões por via não cirúrgica em búfalas egípcias superovuladas, concluíram que a TC foi superior em vacas ($3/5 = 60\%$) em relação a novilhas ($2/4 = 50\%$) ao receberem embriões frescos.

Pela TC apresentada nas novilhas, a melhor alternativa em um programa de PIVE seria transferir embriões nessa categoria. As vacas poderiam ser inseminadas, ou coberta pelo touro, diminuindo assim o custo final da prenhez.

Talvez, utilizando vacas secas e novilhas, a diferença na TC entre essas duas categorias poderia diminuir. Nesse caso a alternativa seria inviável em função do peso vivo da vaca seca ser em torno de 50% superior à novilha, o que provocaria maior pisoteio na pastagem e maior

ingestão de matéria seca para manutenção do metabolismo corporal.

Concluindo, as novilhas são mais eficientes que as vacas no estabelecimento da gestação, além de apresentarem menor custo de aquisição e manutenção na fazenda, além do manejo diário ser facilitado.

2.6.5.2. Taxas de concepção de embriões criopreservados por vitrificação ou em curva lenta para transferência direta

Não houve diferença entre os grupos (dERF-rERF, dERF-rERD, dERD-rERF e dERD-rERD) com relação aos métodos de criopreservação utilizados no experimento. Foi observada apenas uma tendência quando a doadora encontrava-se na estação reprodutiva desfavorável (dERD) e a receptora na estação reprodutiva favorável (rERF) ($p=0,032$), conforme observado na tabela 5. Sendo assim, também não houve diferença ao analisar os efeitos principais, doadora de oócito e receptora de embrião.

A VT, que tem sido preferida pelos laboratórios como uma alternativa eficiente, por sua simplicidade, rapidez, baixo custo e bom resultado na TC. No entanto essa técnica usa altas concentrações de crioprotetores e requer mão de obra qualificada para reaquerer e avaliar os embriões, antes de transferi-los (VAJTA et al., 1998), o que limita o seu uso em larga escala. Já, o congelamento lento dos embriões, outra técnica disponível, permite a transferência sem a necessidade de reavaliá-los, tornando o método bastante prático, apesar do aumento do custo, mas com a vantagem de utilizar baixas concentrações de crioprotetores, reduzindo a toxicidade dos embriões (VOELKEL et al., 1992a; SANCHES et al., 2016).

Em estudo retrospectivo realizado por Saliba et al. (2020), protocolos para TETF baseados em P4, estradiol e eCG, como utilizado nesse estudo tenderam a afetar positivamente a TC aos 30 dias de gestação (41,9 vs 36,1%).

Baseado na produção de embriões e na TC obtidas nesse estudo, pode ser estimulado o uso comercial, tanto da VT quanto da curva lenta para TD, para atender a demanda de um mercado crescente no Brasil e no mundo.

Em um mesmo programa pode-se utilizar embriões frescos, VT e TD. Como nem sempre é possível avaliar as receptoras previamente à saída dos embriões do laboratório, uma alternativa seria levar uma quantidade segura de embriões frescos até a fazenda (em torno de 50% em relação ao número de receptoras protocoladas). Nas receptoras excedentes, aptas a receberem embriões, pode-se ser utilizar embriões VT ou TD. Em se tratando de uma quantidade maior de embriões, poderá ser utilizado os vitrificados e ao contrário, se restarem poucas receptoras,

podemos utilizar o TD para ajustar o programa de forma que nenhuma receptora fique sem embrião. Vale salientar que os embriões TD ocupam espaço muito maior no botijão do que os VT, por serem envasados individualmente, em palhetas de 0,25cc. Por exemplo, se apenas um embrião TD for congelado de determinada doadora, a palheta deverá ser armazenada em rack individual, ao passo que poderemos armazenar várias OPS em uma rack. Destaca-se que há possibilidade de termos mais de um embrião em cada OPS.

No Brasil, desde 2009, a VT de embriões bovinos tem sido utilizada comercialmente com sucesso, conforme estudos publicados nos Anais da XXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (SBTE). Entre esses estudos, Spegiolin et al. (2010) relataram a produção de 845 embriões, utilizando o método *cryotop* com etilenoglicol e dimetilsulfóxido como crioprotetores, em 26 rotinas, durante o período de um ano. A TC para embriões zebuínos foi de 43,9% (152/346) e de 36,4% (175/481) para Girolando (meio sangue Gir x Holandês).

Segundo Sanches et al. (2016), a TC de embriões bovinos de FIV, produzidos com sêmen sexado, *in natura*, vitrificados e para TD foi de $51,35 \pm 1,87\%$ (133/259), $35,89 \pm 3,87\%$ (84/234) e $40,19 \pm 4,65\%$, respectivamente. Os resultados demonstram similaridade entre embriões vitrificados e TD, como observado nesse estudo, ressaltando a facilidade na logística para a transferência de embriões pelo método TD. Os resultados acima se assemelham aos obtidos nesse estudo de 30.4% para embriões VT (28/92) e 41.4% para embriões TD (29/70), na espécie bubalina.

2.7. CONCLUSÃO

Conclui-se que: (I) Doadoras em ERF (dERF) apresentaram menor recuperação de oócitos, não havendo diferença na produção de embriões em relação às doadoras em ERD (dERD) e (II) a receptividade uterina não diferiu quando os embriões foram transferidos para receptoras na ERF (rERF) ou ERD (rERD), em ambos os casos, contrariando a hipótese desse estudo. Entretanto, embriões produzidos na ERF (dERF) foram mais competentes para o estabelecimento da gestação, independente de rERF ou rERD, no presente estudo; e (III) a TC não diferiu, considerando o método de criopreservação, VT ou TD, confirmando a hipótese.

CAPÍTULO 3

3. O USO DA ULTRASSONOGRAFIA DOPPLER NA AVALIAÇÃO DO CORPO LÚTEO DE RECEPTORAS BUBALINAS NA ESTAÇÃO REPRODUTIVA FAVORÁVEL (RERF) OU DESFAVORÁVEL (rERD)

3.1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Otimizar a TC é um fator relevante em programas de PIVE, seja na espécie bovina ou bubalina. A seleção de receptoras em programas de TETF é um importante fator a ser observado para melhorar a eficiência da escolha de novilhas e vacas envolvidas no processo. Nesse sentido, desde meados da década de 1980, a ultrassonografia passou a ser uma importante ferramenta na investigação da reprodução dos bovinos na pesquisa e para veterinários atuantes nessa área (GINTHER, 2014). Nas búfalas, esse aspecto ganha relevância devido à presença de ovários e corpo lúteo (CL) pequenos, quando comparado com *Bos taurus* e *Bos indicus*, dificultando o monitoramento da ciclicidade ovariana em bubalinos utilizando-se o exame transretal (TERZANO, 2012). A ultrassonografia consiste em um método alternativo para contornar essa limitação (BARUSELLI et al., 1997). Nos últimos anos, a ultrassonografia Doppler (US Doppler) tem sido empregada na reprodução para a avaliação da perfusão sanguínea do CL conforme a fase do ciclo estral (SILVA et al., 2006). O Doppler colorido, além de ser uma técnica não invasiva, possui muitas vantagens, que incluem a possibilidade de avaliar o fluxo sanguíneo, sua direção e qualidade, inclusive de pequenos vasos, impossíveis de serem identificados no modo “B”, apresentando a imagem em cores de diferentes tonalidades (CARVALHO, 2009).

A US Doppler é considerada, atualmente, uma ferramenta de inovação para selecionar receptoras de embriões baseada na perfusão sanguínea (PS) que tenham maior chance de se tornarem gestantes, proporcionando melhores resultados em programas de TETF. Neste contexto, a avaliação do CL basicamente investiga o aspecto da circulação sanguínea dessa estrutura: quando o CL é encontrado com elevada perfusão ocorre aumento na TC (PUGLIESI et al., 2019). Embora já existam pesquisas desenvolvidas em várias espécies, dentre elas, na bovina (HERZOG et al., 2010; PUGLIESI et al., 2017) e na bubalina (RUSSO et al., 2010; DI FRANCESCO et al., 2012; MOHAMED et al., 2018), ainda não está estabelecida a eficiência do uso do US doppler em receptoras bubalinas na estação reprodutiva favorável ou desfavorável.

Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência da ultrassonografia Doppler em detectar diferenças na área e vascularização de corpo lúteo (CL) de receptoras bubalinas na estação reprodutiva favorável (rERF) ou desfavorável (rERD). Variações em dois parâmetros da US doppler – área do CL e perfusão do CL – foram associados com a TC após transferência de embriões bubalinos produzidos *in vitro* e criopreservados.

3.2. HIPÓTESE

O presente estudo tem como hipótese que a avaliação ultrassonográfica com uso de Doppler previamente à TE, em receptoras bubalinas com 7 dias pós-cio fornece informações que podem proporcionar melhora na TC. No experimento 1, a hipótese específica é: (I) receptoras bubalinas com CL de maior área apresentam maior TC independentemente da estação reprodutiva. Já no experimento 2, (II) receptoras bubalinas com maior perfusão sanguínea (PS) do corpo lúteo apresentam maior TC independentemente da estação reprodutiva.

3.3. OBJETIVOS

Para testar as hipóteses específicas, o presente estudo tem como objetivo avaliar, mediante ultrassonografia Doppler, a área do corpo lúteo e a perfusão sanguínea do corpo lúteo de receptoras bubalinas na estação reprodutiva favorável (rERF) ou desfavorável (rERD). A partir destas medidas as receptoras serão agrupadas em faixas (terço superior, terço médio e terço inferior) e a TC após transferência de embriões bubalinos produzidos *in vitro* e criopreservados será determinada e comparada.

3.4. DESENHO EXPERIMENTAL

Um total de 151 receptoras (66 rERF e 85 rERD) foram analisadas quanto à área do CL, utilizando-se ultrassonografia Doppler (US Doppler), previamente à TE. Para analisar os resultados, as receptoras foram divididas em tercís (tercil inferior, médio e superior) da área do CL para cada estação reprodutiva. Na sequência foi determinada a TC para cada tercil em cada estação reprodutiva e os grupos foram comparados. Quanto à perfusão sanguínea (PS) do CL, um total de 146 receptoras (71 rERF e 75 rERD) foram analisadas à previamente à TE. Após a obtenção dos resultados, as receptoras foram então, divididas em tercís (35-45%, 50 – 55% e 60 – 80% de PS da área do CL) para cada estação reprodutiva. Na sequência foi

determinada a TC para cada tercil em cada estação reprodutiva e os grupos foram comparados. As receptoras foram sincronizadas em protocolo para TETF, iniciado no dia zero e recebendo embriões (TE) oriundos de dERF ou dERD no dia 18 (D18).

3.5. MATERIAL E MÉTODOS

Esse estudo foi realizado com aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade de São Paulo (protocolo n° 3571250818).

3.5.1. *Local do experimento*

Os experimentos foram conduzidos na Fazenda Sesmaria, localizada no município de Amparo/SP (coordenadas 22 35 49S/46 51 13 W – altitude 695m), onde permaneceram as doadoras de oócitos e as receptoras de embriões.

3.5.2. *Definição das estações reprodutivas favorável e desfavorável e período de execução do experimento*

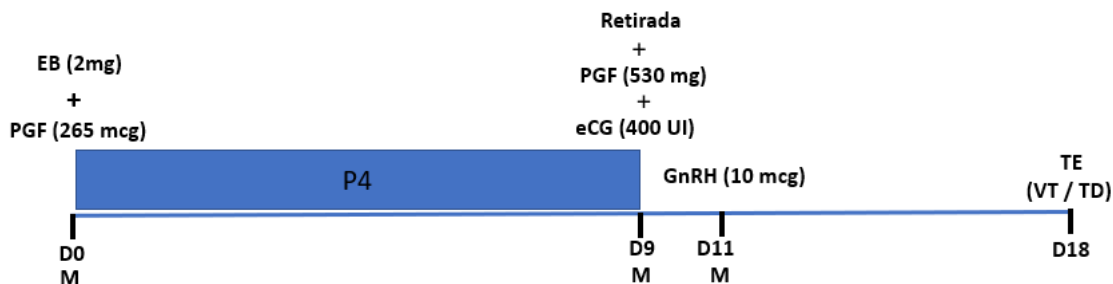
O presente estudo foi realizado em dois períodos distintos, com relação à duração das horas do dia, correspondentes ao final do outono e início do inverno (junho/julho), época do ano com menor número de horas de luz, considerado estação reprodutiva favorável (ERF). Já, o final da primavera e início do verão (dezembro/janeiro) referem-se à estação reprodutiva desfavorável (ERD), caracterizado pelo aumento do número de horas do dia.

3.5.3. *Protocolo de TETF*

O protocolo de sincronização das receptoras para transferência em tempo fixo (TETF) foi iniciado em dia aleatório do ciclo estral, considerado Dia zero (D0), quando as búfalas receberam um dispositivo monodose intravaginal contendo 0,96g de P4 (Progestar, Boehringer, Brasil) associado à administração i.m. de 2 mg de Benzoato de Estradiol (Estrovulinn, Boehringer, Brasil) e 265 mcg de Cloprostenol Sódico (Cioprostinn, Boehringer, Brasil). No Dia 9 (D9) o dispositivo intravaginal foi retirado, administrando-se 530 mcg de Cloprostenol Sódico (Cioprostinn, Boehringer, Brasil) e 400 UI de eCG (Novormon, MSD Saúde Animal, Brasil), via i.m. No Dia 11 (D11) 10 µg de Acetato de Buserelina (Prorelinn, Boehringer,

Brasil), por via i.m. As receptoras receberam embriões no Dia 18 (D18), 7 dias após a concentração das ovulações, conforme demonstrado na Figura 9.

Figura 9 - Protocolo para transferência de embriões em tempo fixo (TETF), descongelados ou reaquecidos, em receptoras bubalinas.



Fonte: Própria autoria

Legenda: D0, D9, D11 e D18 = manejo ou atividade durante o protocolo; BE = Benzoato de Estradiol; PGF = Prostaglandina F2alfa; eCG = Gonadotrofina Coriônica Equina; GnRH = Hormônio Liberador das Gonadotrofinas; TE = Transferência de Embriões; VT = embriões vitrificados; TD = embriões congelados para transferência direta.

As receptoras foram sincronizadas utilizando-se protocolo para TETF, avaliadas previamente, por ultrassonografia Doppler e classificadas quanto a área (experimento 1) e a perfusão sanguínea (experimento 2) do CL. Os vídeos dos exames foram analisados posteriormente para cálculo das áreas do CL de cada receptoras.

3.5.4. Avaliação das receptoras utilizando ultrassonografia doppler

Para determinação da área e PS, as receptoras foram examinadas, previamente à TE, com um equipamento ultrassonográfico duplex (My Lab Delta, Esaote, Itália) e um transdutor linear multifrequencial (3,5-7,5 MHz) em modo B (RES-A, ganho 50%, P 74mm, X/M, PRS1) e Doppler (ganho 61%, PRF 730Hz, frequência 6,3 MHz, WF 4, PRS 3, PRC M/2). Durante o exame, a imagem foi estabelecida em Modo “B”, sendo em seguida acionado o modo Doppler colorido. Para a medição do CL foram armazenados os vídeos correspondentes aos exames e utilizada a melhor imagem congelada para determinação da área, posteriormente. Já a avaliação da perfusão sanguínea do CL foi estimada no momento do exame, por um único avaliador, que determinou a porcentagem de sinais coloridos, indicando PS em relação à área total do CL.

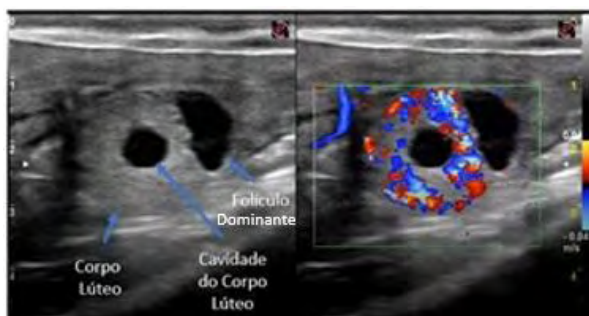
3.5.4.1. Área do CL

Para avaliar a área do CL foram utilizadas 151 receptoras, sincronizadas em protocolo para TETF e avaliadas previamente à TE (D7). As receptoras foram divididas em tercil inferior (1,05 – 1,80 cm²), tercil médio (1,81 – 2,20 cm²) e tercil superior (2,22 – 3,26 cm²). A área do CL foi verificada em modo B, por meio da função *tracing*, sendo mensurado e o resultado registrado. Quando o CL apresentava uma cavidade, a sua área era subtraída da área total luteinizada.

3.5.4.2. Perfusão sanguínea

Para avaliar a perfusão sanguínea do CL foram utilizadas 146 receptoras, divididas em: (I) 35-45%, (II) 50-55% e (III) 60-80%. Foram consideradas aptas receptoras com PS igual ou acima de 35% da área do CL. Receptoras com PS abaixo desses valores foram descartadas.

Figura 10 - Imagem ultrassonográfica em modos B e doppler das estruturas ovarianas (folículo dominante e corpo lúteo cavitário) de fêmeas bubalinas previamente à TE. A perfusão sanguínea na figura abaixo corresponde à faixa de 60-80%.



Fonte: Própria autoria

3.5.5. Análise Estatística

Receptoras bubalinas na estação reprodutiva da doadora (rERF) ou desfavorável (rERD), foram agrupadas em tercís para a área do CL e para a perfusão do CL. Para cada tercil (de cada parâmetro avaliado – área ou perfusão) foi determinada a TC. Os tercís foram comparados por qui-quadrado quanto à TC. A área do CL foi comparada por teste *t-student*. Regressão linear foi realizada para a TC e a média da área do CL do tercil das rERF. Nível de significância de 5% foi considerado para todas as análises.

3.6. RESULTADOS

3.6.1. Área do corpo lúteo

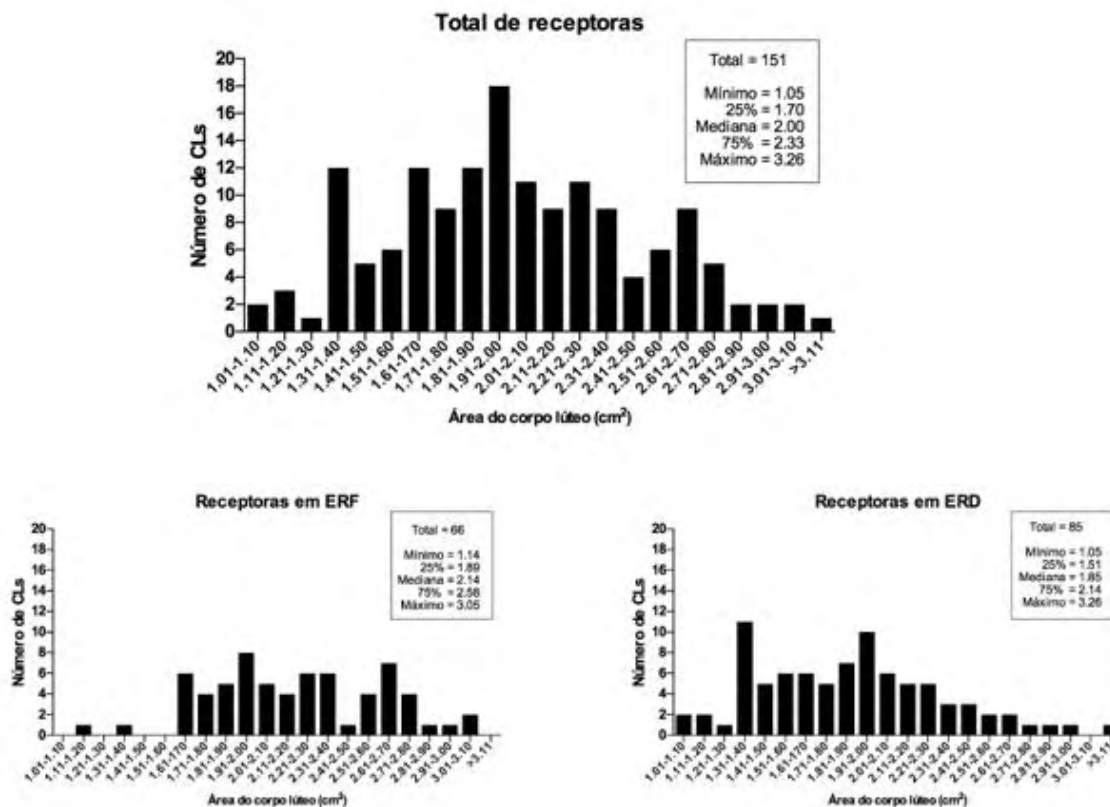
3.6.1.1. Efeito da área do CL na TC em receptoras na rERF e rERD

Foram avaliadas por US Doppler 151 receptoras bubalinas em estação reprodutiva favorável (rERF) ou desfavorável (rERD).

Quanto à área do CL, as medidas variaram de 1,05 cm² a 3,26 cm² e as receptoras foram separadas em tercís conforme a área do CL, conforme segue: tercil inferior (1,05 – 1,80 cm²), tercil médio (1,81 – 2,20 cm²) e tercil superior (2,22 – 3,26 cm²).

A distribuição das frequências (histograma) da área do CL entre as rERF e rERD estão apresentadas na Figura 11. Nota-se que, quando comparado à população total, o histograma das rERF tem assimetria à direita e o histograma das rERD tem assimetria à esquerda.

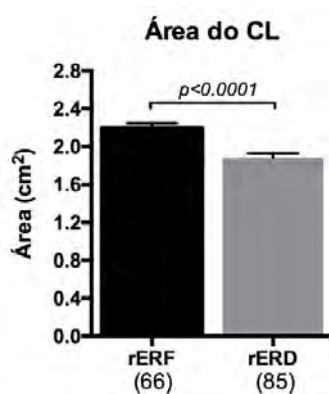
Figura 11 - Distribuição das frequências (histograma) de corpos lúteos (CL) de acordo com a área do CL. No histograma superior está apresentada a distribuição de todas as receptoras avaliadas. Nos histogramas inferiores as frequências estão decompostas para receptoras na estação reprodutiva favorável (ERF) ou desfavorável (ERD)



Fonte: Própria autoria

A assimetria observada nos histogramas para rERF e rERD quanto à área do CL reflete-se em diferença estatística ($p < 0,0001$) na área do CL entre rERF ($2,19 \pm 0,051 \text{ cm}^2$) em comparação a rERD ($1,88 \pm 0,049 \text{ cm}^2$; Figura 11).

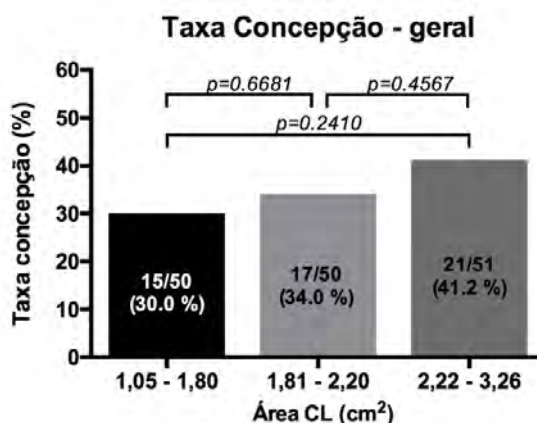
Figura 12 - Média e erro padrão da média da área do CL (cm^2) em receptoras bubalinas na estação reprodutiva (rERF) ou desfavorável (rERD). Os números entre parênteses representam o número amostral por grupo.



Fonte: Própria autoria

A TC geral foi de 35,1% (53/151) e para os tercís inferior, médio e superior de área de CL as taxas de concepção foram 30,0% (15/50), 34,0% (17/50) e 41,2% (21/51), respectivamente. Não foram encontradas diferenças significativas na TC entre os tercís (Figura 13).

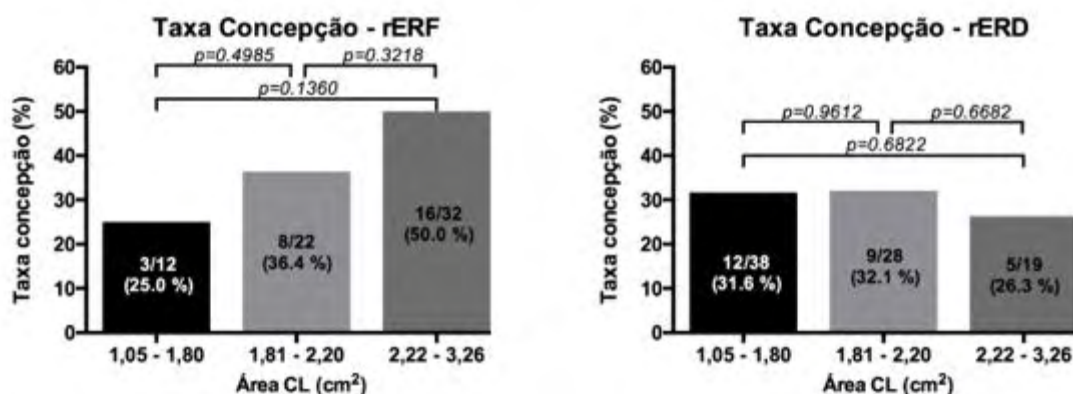
Figura 13 - Taxa de concepção (TC) aos 30 dias em receptoras bubalinas dos tercís inferior (1,05 – 1,80 cm^2), médio (1,81 – 2,20 cm^2) e superior (2,22 – 3,26 cm^2) de área do corpo lúteo (CL).



Fonte: Própria autoria

As receptoras bubalinas apresentaram TC similar ($p>0,05$) quando comparadas entre as estações reprodutivas: 40,9% (27/66) na rERF versus 30,6% (26/85) na rERD. Quando agrupadas de acordo com a área do CL as taxas de concepção para os tercis inferior (1,05 – 1,80 cm^2), médio (1,81 – 2,20 cm^2) e superior (2,22 – 3,26 cm^2) foram 25,0% (53/151), 36,4% (8/22) e 50,0% (16/32), respectivamente para ERF; e 31,6% (12/38), 32,1% (9/28) e 26,3% (5/19), respectivamente para ERD (Figura 14).

Figura 14 - Taxa de concepção (TC) aos 30 dias em receptoras bubalinas na estação reprodutiva favorável (ERF) ou desfavorável (ERD). As receptoras foram agrupadas de acordo com a área do corpo lúteo (CL) nos tercis inferior (1,05 – 1,80 cm^2), médio (1,81 – 2,20 cm^2) e superior (2,22 – 3,26 cm^2)



Fonte: Própria autoria

3.6.2. Perfusão do corpo lúteo

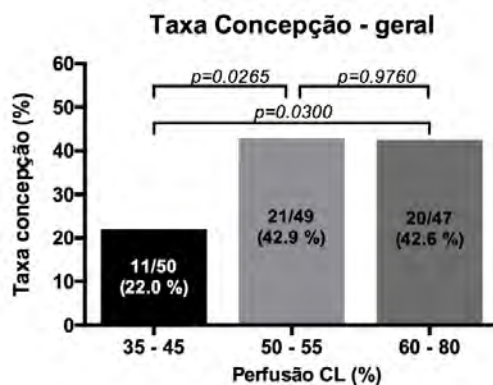
3.6.2.1. Efeito da PS do CL na TC em receptoras na rERF e rERD

Um total de 146 receptoras foram avaliadas por US Doppler para determinar a perfusão sanguínea (PS) do corpo lúteo (CL). As receptoras foram separadas em tercils conforme a perfusão do CL, conforme segue: tercil inferior (PS=35-45%), tercil médio (PS=50-55%) e tercil superior (PS=60-80%). A TC geral neste grupo de receptoras foi de 35,6% (52/146), sendo que para cada um dos tercils foi de 22,0% (11/50), 42,9% (21/49) e 42,6% (20/47), respectivamente.

Os resultados de taxa de concepção (TC) em função da perfusão sanguínea do corpo lúteo foram inferiores para a faixa entre 35-45% (11/50; 22,0%) quando comparados à faixa entre 50-55% (21/49; 42,9%; $p=0,0265$) e à faixa entre 60-80% (20/47; 42,6%; $p=0,0300$). Para a comparação entre os intervalos de 50-55% e 60-80% não houve diferença ($p=0,9769$; Figura

15).

Figura 15 - Taxa de concepção aos 30 dias em receptoras bubalinas na estação reprodutiva favorável (ERF) ou desfavorável (ERD). As receptoras foram agrupadas de acordo com a perfusão do corpo lúteo (CL) nos tercís inferior (35-45%), médio (50-55%) e superior (60-80%)

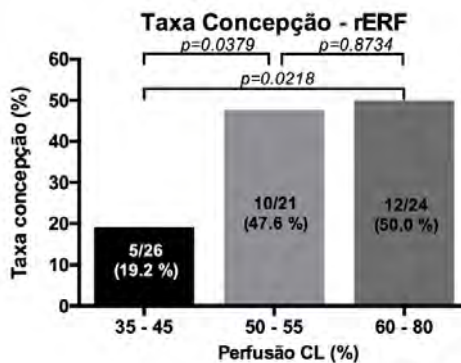


Fonte: Própria autoria

Quando se analisa a associação entre a perfusão do CL e as taxas de concepção separadamente entre rERF e rEFD nota-se que diferenças significativas são encontradas apenas nas receptoras em ERF.

Para receptoras em ERF a TC geral foi de 38,0% (27/71). Para os tercís inferior, médio e superior de PS do CL a TC foi de 19,2% (5/26), 47,6% (10/21) e 50,0% (12/24), respectivamente. A TC em função da perfusão sanguínea do corpo lúteo em rERF foi inferior para a faixa entre 35-45% quando comparada à faixa entre 50-55% ($p=0,0379$) e à faixa entre 60-80% ($p=0,0218$). Para a comparação entre os intervalos de 50-55% e 60-80% não houve diferença ($p=0,8734$; Figura 16).

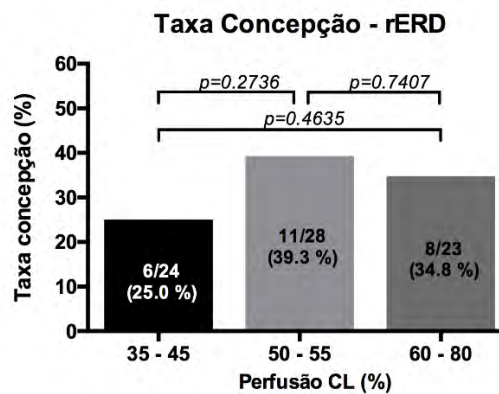
Figura 16 - Taxa de concepção aos 30 dias em receptoras bubalinas na estação reprodutiva favorável (rERF). As receptoras foram agrupadas de acordo com a perfusão do corpo lúteo (CL) nos tercís inferior (35-45%), médio (50-55%) e superior (60-80%).



Fonte: Própria autoria

Para receptoras em ERD a TC geral foi de 33,3% (25/75). Para os tercís inferior, médio e superior de PS do CL a TC foi de 25,0% (6/24), 39,3% (11/28) e 34,8% (8/23), respectivamente. A TC em função da perfusão sanguínea do corpo lúteo em rERD não diferiu ($p>0,05$) entre as faixas de PS do CL (Figura 17).

Figura 17 - Taxa de concepção (TC) aos 30 dias em receptoras bubalinas na estação reprodutiva desfavorável (rERD). As receptoras foram agrupadas de acordo com a perfusão do corpo lúteo (CL) nos tercís inferior (35-45%), médio (50-55%) e superior (60-80%).



Fonte: Própria autoria

3.7. DISCUSSÃO

3.7.1. *Uso do Doppler na avaliação da área do corpo lúteo*

Verificou-se que a área do CL é maior entre receptoras na ERF em comparação com a ERD. WAHEED (2011) observou que búfalas apresenta o CL menor no verão do que no inverno (0,94 vs 1,27 cm) o que pode contribuir para uma menor produção de P₄. Pfeifer et al. (2012) concluíram que vacas que ovulam folículos maiores resultam em corpos lúteos grandes que apresentam maiores concentrações de P₄. Todavia, vacas que apresentavam CL entre 13 e 15 mm engravidaram melhor que quando os corpos lúteos são extremos. No presente estudo a concentração plasmática de P₄ não foi determinada, tampouco os resultados na TC acompanharam essa diferença na área do CL.

Uma possível explicação para o fato das receptoras bubalinas apresentarem CL menor na ERD pode estar relacionada à diminuição na produção de melatonina. Esse hormônio mostra ter papel fundamental sobre a regulação da liberação do GnRH resultando em menor liberação

de gonadotrofinas na ERD (ZICARELLI, 1997), o que pode resultar em folículos e CLs menores.

Em estudo realizado por Pugliesi et al. (2019), não houve efeito da área do CL quando receptoras meio-sangue de corte (444) foram examinadas por US doppler no dia da TE (D7), recebendo em seguida embriões de Nelore, depositados no corno ipsilateral ao CL. Esse resultado está de acordo com o observado nesse estudo, sendo que as áreas dos CLs, em ambos os casos, foram divididos em tercís, denominados pequenos (<3 cm²), médios (3-4 cm²) ou grandes (>4 cm²) no estudo de Pugliesi et al. (2019) e inferior (1,05 – 1,80 cm²), médio (1,81 – 2,20 cm²) e superior (2,22 – 3,26 cm²), nesse estudo. Deve-se destacar que nos bubalinos, o tamanho médio do ovário e do CL são consideravelmente menores que na vaca (DYCE et al., 1996).

Estudos de Di Francesco et al. (2012), observaram a área do CL de 39 búfalas inseminadas 10 dias após a IA (D10) não diferiu entre búfalas gestantes e vazias na ERF (29,4 ± 1,6 vs 27,2 ± 2,4; p=0,48), mas diferiu 20 dias após a IA (D20) (34,5 ± 1,8 vs 20,0 ± 2,2; p<0,05). No período de transição também foi observado o mesmo comportamento.

Mesmo não tendo determinado a área do CL, em estudo retrospectivo realizado por Saliba et al. (2020), verificou-se que receptoras bubalinas que apresentaram diâmetro de CL ≥ 14,5 mm no momento da TE, apresentaram maior TC aos 30 dias de gestação.

3.7.2. *Uso do Doppler na avaliação da perfusão sanguínea (PS) do corpo lúteo*

Analisando os dados referentes à rERF, houve diferença na TC quando os valores da PS se encontram no tercil inferior em relação aos tercís médio (p=0,0379) e superior (p=0,0218). Já, ao comparar a PS entre os tercís médio e superior, não houve diferença (p=0,8734). Segundo Acosta et al. (2003), durante o início do desenvolvimento do CL, o fluxo sanguíneo aumenta juntamente com a concentração de P4 circulante, estando a perfusão associada com a potencial produção desse hormônio, o que resultaria em melhor ambiente para o desenvolvimento da gestação.

Pugliesi et al. (2019) também classificaram a PS em tercís denominados de baixa (<40%), média (45e50%) ou alta (> 55%) e a conclusão foi que a PS influenciou a TC das receptoras, o que está de acordo com os resultados desse estudo. Ainda, Pinaffi et al. (2015) observaram correlação positiva em receptoras bovinas não gestantes quando a PS do CL encontrava-se abaixo de 40%.

Paralelamente à avaliação ultrassonográfica do CL poderia ter sido coletada amostras

das receptoras para dosar a concentração de P₄ no plasma sanguíneo, que varia na búfala de 1 a 4 ng/ml (ROY and PRAKASH 2009). Contudo, verificar o nível de P₄ não é uma rotina utilizada para monitorar a atividade ovariana pela demora em obter os resultados e limitação de equipamento especializado (BALHARA et al. 2013).

Por outro lado, poderíamos ter verificado a correlação entre o CL de búfalas gestantes com a velocidade média do fluxo sanguíneo e concentração de P₄ no CL com 10 dias, que se mostrou positiva no estudo de Di Francesco et al. (2012). Essa informação pode ser interpretada como indicador da relação entre a vascularização do CL, função do CL e resultado e prenhez em búfalas na ERF, período de transição e ERD.

3.8. CONCLUSÃO

Conclui-se que (I) não há diferença significativa da TC entre receptoras bubalinas agrupadas em função da área do CL, independentemente da estação reprodutiva, contrariamente ao que foi hipotetizado. Todavia, há uma tendência de elevação da TC em função da área do CL em rERF; (II) a TC é significativamente maior quando a perfusão sanguínea (PS) do CL é igual ou superior a 50%, sendo este resultado mais evidente em rERF, confirmando parcialmente a hipótese desse estudo. Concluiu-se também que a área do CL é maior na rERF comparando-se com a rERD.

CAPÍTULO 4

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

4.1. INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) em búfalas é uma biotecnologia viável e pode contribuir para o melhoramento dos rebanhos. Entretanto, baseado nesse estudo, alguns pontos devem ser observados para que os resultados sejam otimizados. Em primeiro lugar recomenda-se que as sessões de OPU (*ovum pick up*) ocorram nos meses de junho e julho, caracterizada como estação reprodutiva favorável (ERF), período em que a maioria das búfalas do rebanho já estão paridas e aptas a serem aspiradas, tanto as vazias quanto as gestantes. Embriões

produzidos nessa época, seguidos da criopreservação por VT ou congelamento para TD possuem maior competência no estabelecimento da gestação comparados com embriões produzidos nos meses de dezembro e janeiro, considerada estação reprodutiva desfavorável (ERD).

4.2. SEGURANÇA E BUSCA DA EFICIÊNCIA NO PROCESSO

Nos meses de junho e julho várias doadoras já poderão estar gestantes e mesmo assim poderão ser aspiradas até completarem três meses de gestação. Deve-se destacar que entre 36 doadoras gestantes aspiradas (37 OPUs), nenhuma apresentou qualquer problema relacionado às perdas embrionárias ou fetais.

Para elevar a média de oócitos recuperados e embriões produzidos, as doadoras poderão ser selecionadas pela população de folículos antrais (PFA), além de informações do animal com relação ao histórico da competência oocitária, buscando as doadoras eficientes em conversão de embriões. Informações referentes aos embriões provenientes de determinadas doadoras que possuem boa TC após ser criopreservado também poderão ser verificadas.

4.3. OTIMIZAÇÃO DA TAXA DE CONCEPÇÃO

Pensando em otimizar o aproveitamento dos embriões, novilhas devem ser preferidas para serem receptoras, pois apresentaram maior TC em relação às vacas em lactação (43,7% vs 28,6%; $p=0,0406$), além de serem manejadas de forma menos intensa. Ainda, quando novilhas na ERF receberam embriões produzidos de doadoras na ERF chegaram a apresentar TC de 73,9% (17/23). Deve se considerar também que o custo para aquisição da novilha é inferior ao das vacas, além de pisotear menos as pastagens. Uma sugestão é que sejam utilizadas as próprias novilhas do rebanho, que poderão receber embriões das vacas *top*, até mostrarem seu bom desempenho na produção de leite. Dessa forma, haverá um melhor controle sanitário do rebanho. Deve ser salientado que a bezerra nascida na estação reprodutiva atual será candidata a ser receptora no segundo ano seguinte.

4.4. ALTERNATIVAS PARA AGREGAÇÃO DE VALOR

Alguns projetos, além de explorarem a produção leiteira ou venda reprodutores também comercializam embriões frescos ou congelados como fonte de receita, em um mercado

crecente, principalmente pela possibilidade em disponibilizar genética de famílias cujas vacas sejam uma reserva do plantel e não estejam à venda. Em muitos casos a matriz não está à venda, mas os seus embriões, acasalados com diferentes reprodutores podem ser comercializados. Os índices obtidos na TC nesse estudo possibilitam o uso comercial da técnica.

4.5. ESTOQUE DE EMBRIÕES CRIOPRESERVADOS

Mesmo em programas onde a maioria dos embriões produzidos serão transferidos a fresco é interessante manter um estoque de embriões vitrificados ou congelados para TD, caso haja algum problema na produção de blastocistos, seja ligado a OPU, ao transporte dos oócitos, problema com o sêmen ou no laboratório. Dessa forma, as receptoras sincronizadas poderão receber embriões VT e/ou TD.

4.6. CUIDADOS NA ESCOLHA DO TOURO

Na escolha dos touros recomenda-se um cuidado adicional para checar a qualidade do material genético que será utilizado. Pode ser selecionada uma ou mais doses de determinado touro, observando-se a partida em questão e examiná-las utilizando as avaliações convencionais (motilidade, morfologia e concentração) associadas com a técnica de CASA (análise computadorizada da motilidade) e de sondas epifluorescentes para verificar a integridade das membranas acrossomal, plasmática e mitocondrial.

4.7. LIMITAÇÕES E ALTERNATIVAS

As aspirações foliculares foram realizadas em dia aleatório do ciclo estral. Dessa forma, foram aspiradas doadoras nas diferentes fases. Em alguns casos isso é um fator limitante, como por exemplo no metaestro, fase em que os folículos estão no início da emergência da onda de crescimento folicular e são pequenos, dificultando o trabalho do veterinário e comprometendo a qualidade dos oócitos. Essa situação pode ser contornada com protocolos para sincronização da emergência da onda à base de P₄ (dispositivo intravaginal) e aplicação de estrógenos como o benzoato de estradiol (SILVA et al., 2017). Adicionalmente pode ser aplicada PGF, com o objetivo de lisar o corpo lúteo (CL) e assim aumentar a área do estroma ovariano com a presença de folículos antrais a serem aspirados.

REFERÊNCIAS

- ABDOON, A. S.; GABLER, C.; HOLDER, C.; KANDIL, O. M.; EINSPANIER, R. Seasonal variations in developmental competence and relative abundance of gene transcripts in buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes. **Theriogenology**, v.82, p.1055-1067, 2014.
- ACOSTA, T. J.; HAYASHI, K. G.; OHTANI, M.; MIYAMOTO, A. Local changes in blood flow within the preovulatory follicle wall and early corpus luteum in cows. **Reproduction**, v.125, p.759-767, 2003.
- ARAV, A. Cryopreservation of oocytes and embryos. **Theriogenology**. 2014; v. 81, p. 96-102, 2014.
- ARRUDA, R. P. et al. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, p. 145-151, 2011.
- BALDASSARRE, H.; BORDIGNON, V. Laparoscopic ovum pick-up for *in vitro* embryo production from dairy bovine and buffalo calves. **Animal Reproduction**; V.15, p.191-196. 2018.
- BALDRIGHI, J. M.; SÁ FILHO, M. F.; BATISTA, E. O.; LOPES, R. N.; VISINTIN, J. A.; BARUSELLI, P. S.; ASSUMPCÃO, M. E. Anti-Mullerian hormone concentration and antral ovarian follicle population in Murrah heifers compared to Holstein and Gyr kept under the same management. **Reprod Domest Anim**. V. 49, p. 1015-20, 2014.
- BALHARA, A. K.; GUPTA, M.; SINGH, S.; MOHANTY, A. K.; SINGH, I. Early pregnancy diagnosis in bovines, current status and future directions, **The Scientific World Journal**, p. 1-10, 2013.
- BARBOSA, J. D.; OLIVEIRA, C. M. C.; TOKARNIA, C. H.; RIET-CORREA, F. Comparação da sensibilidade de bovinos e búfalos à intoxicação por *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae). **Pesq. Vet. Bras**, v. 23, p. 167-172, 2003.
- BARKAWI, A. H.; IBRAHIM, S. A.; ASHOUR, G.; EL-ASHEERI, A. K.; HAFEZ, Y. M.; FAHEEM, M. S. In vitro production of buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. **Egypt. J. Anim. Prod**, v. 44, p. 35-48, 2007.
- BARUSELLI, P. S. Basic requeriments for artificial insemination and embryo transfer in buffaloes. **Buffalo Journal**, p. 53-60, 1994a. Supplement 2.
- BARUSELLI, P. S.; MUCCILOLO, R. G.; VISINTIN, J. A.; VIANA, W. G.; ARRUDA, R. P.; MADUREIRA, E. H.; MOLERO-FILHO, J. R. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in buffalo (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, v.47, p.1531-47, 1997.
- BARUSELLI, P. S. **Dinâmica folicular durante o ciclo estral e resposta superovulatória em fêmeas bubalinas (*Bubalus bubalis*)**. 1997. 96f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 1997a.
- BARUSELLI, P. S.; CARVALHO, N. A. T. Controle do desenvolvimento folicular para o emprego de biotecnologias da reprodução em bubalinos (*Bubalus bubalis*). **Revista Brasileira**

de **Reprodução Animal**, v. 27, p. 94-102, 2003.

BARUSELLI, P. S.; GIMENES, L. U.; CARVALHO, N. A. T.; SÁ FILHO, M. F.; FERRAZ, M. L.; BARNABÉ, R. C. O estado atual da biotecnologia reprodutiva em bubalinos: perspectiva de aplicação comercial. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, p. 285-292, 2007.

BARUSELLI, P. S.; SOARES, J. G.; BAYEUX, B. M.; SILVA, J. C. S.; MINGOTI, R. D.; CARVALHO, N. A. T.; Assisted reproductive technologies (ART) in water buffaloes. **Animal Reproduction**, v.15, p.971-983, 2018.

BARUSELLI, P. S.; DE CARVALHO, J. G. S.; ELLIFF, F. M.; DA SILVA, J. C. B.; CHELLO, D.; DE CARVALHO, N. A. T. (2020). Embryo transfer in buffalo (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, v. 150, p. 221-228, 2020.

BERNARDES, O. Bubalinocultura no Brasil: situação e importância econômica. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, p. 293-298, 2007.

BOUSQUET, D.; TWAGIRAMUNGU, H.; MORIN, N.; BRISSON, C.; CARBONEAU, G.; DUROCHER, J. *In vitro* embryo production in the cow: an effective alternative to the conventional embryo production approach. **Theriogenology**, v. 51, n. 1, p. 59–70, 1999.

CARVALHO, N. A.; BARUSELLI, P. S.; ZICARELLI, L.; MADUREIRA, E. H.; VISINTIN, J. A.; MICHAEL, J. D. (2002). Control of ovulation with a GnRH agonist after superstimulation of follicular growth in buffalo: fertilization and embryo recovery. **Theriogenology**, v. 58, p. 1641-1650, 2002.

BORGHESE, A.; RASMUSSEN, M.; THOMAS, C. S. Milking management of dairy buffalo. **Ital J Anim Sci**; v. 6, p. 39–50, 2007.

CAMPANILE, G.; VECCHIO, D.; RENDINA, M.; GRASSI, C.; BALESTRIERI, A.; DI PALO, R.; ZICARELLI, L. Ovary response and embryonic mortality in buffaloes treated with GnRH or hCG. **Italian Journal of Animal Science**, v. 6, p. 673-676, 2007.

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, p. 1-11, 2010.

CHAUHAN, M. S.; SINGLA, S. K.; PALTA, P.; MANIK, R. S.; MADAN, M. L. Individual variation among buffalo bulls in fertilization and subsequent embryonic development in vitro. **Indian journal of animal sciences**, v. 68, p. 454-456, 1998.

CHEN, Y. C.; LI, X. H. New evidence of the origin and domestication of the Chinese swamp buffalo (*Bubalus bubalis*). **Buffalo Journal**, v. 1, p. 51-55, 1989.

DANELL, B. **Oestrus behavior, ovary morphology and cyclical variation in follicular system and endocrine pattern in water buffalo heifers**. Uppasala, 1987. PhD thesis - Dept. of Obs. Gyn., Faculty of Vet. Med., Swedish Univ. Agri. Sci.

DAS, G. K.; KHAN, F. A. Summer anoestrus in buffalo—a review. **Reproduction in domestic animals**, 45, p. e483-e494, 2010.

DAYAL, S.; DEY, A.; PANDIAN, S. J.; GUPTA, J. J.; CHANDRAN, P. C.; ALI, I. Effect of seasonal variation on physiological parameters in Murrah buffaloes. *Indian Journal of Animal Sciences* v. 87, p. 965–967, 2017.

DEGRANDI, T. M.; PITA, S.; PANZERA, Y.; OLIVEIRA, E. H. C.; MARQUES, J. R. F.; FIGUEIRÓ, M. R.; MARQUES, L. C.; VINADÉ, L.; GUNSKI, R. J.; GARNERO, A. D. V. Karyotypic evolution of ribosomal sites in buffalo subspecies and their crossbreed. *Genetics and Molecular Biology*, v. 37, p. 375-380, 2014.

DI FRANCESCO, S.; BOCCIA, L.; CAMPANILE, G.; DI PAOLO, R.; VECCHIO, D.; NEGLIA, G.; GASPARRINI, B. The effect of season on oocyte quality and developmental competence in Italian Mediterranean buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Animal reproduction science*, v. 123, p. 48-53, 2011.

DI FRANCESCO, S.; NOVOA, M. V. S.; VECCHIO, D.; NEGLIA, G.; BOCCIA, L.; CAMPANILE, G.; ZICARELLI, L.; GASPARRINI, B. Ovum pick-up and in vitro embryo production (OPU-IVEP) in Mediterranean Italian buffalo performed in different seasons. *Theriogenology*, v. 77, p. 148-154, 2012.

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

DROST, M. Advanced reproductive technology in the water buffalo. *Theriogenology*, v. 68, p. 450-453, 2007.

DOCHI, O. Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos and its application in cattle reproduction management. *Journal of Reproduction and Development*, v. 65, p. 389-396, 2019.

DYCE, K.M.; SACK, W.O.; WENSING, C. J. G. A textbook of Veterinary Anatomy. Second Edition. Saunders Company, Philadelphia, 1996.

ENGLERT, Y.; DELVIGNE, A.; VEKEMANS, M.; LEJEUNE, B.; HENLISZ, A.; DE MAERTELAER, G.; LEROY, F. Should one use fresh or frozen sperm in in-vitro fertilization with donors?. *Acta urologica Belgica*, v. 57, p. 83-91, 1989.

ERICKSON, B. H. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. *Journal of Animal Science*, v. 25, p. 800–805, 1966.

FAO. World buffalo population; 2017. Available: <http://www.fao.org/fd8ce742-c531-4111-9ff0-dae56ac3de1>. 2019 **Narayan G. Hegde**

FAO 2020. www.fao.org/dairy-production-products/production/dairy-animals/buffaloes/en/. Gateway to dairy production and products

FERGUSON, J. D.; GALLIGAN, D. T.; THOMSEN, N. Principal descriptors of body condition score in Holstein cows. *Journal of dairy science*, v. 77, p. 2695-2703, 1994.

FERRÉ, L. B.; KJELLAND, M. E.; STROBECH, L. B.; HYTTEL, P.; MERMILLOD, P.;

ROSS, P. J. Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods. **Reprod in domest animals**, V. 14, 991-1004, 2020.

FERRAZ, M. L.; GIMENES, L. U.; SÁ FILHO, M. F.; WATANABE, Y. F.; JOAQUIM, D. C.; ACCORSI, M. F.; MEIRELLES, F.V.; BARUSELLI, P. S. Effect of OPU interval and bST treatment on embryo production in buffalo. **Italian Journal of Animal Science**, v. 6, p. 766-768, 2007.

FERRAZ, M. L.; SÁ FILHO, M. F.; BATISTA, E. O. S.; WATANABE, Y. F.; WATANABE, M. R.; DAYAN, A.; JOAQUIM, D. C.; ACCORSI, M. R.; GIMENES, L. U.; VIEIRA, L. M.; BARUSELLI, P. S. Paradoxical effects of bovine somatotropin treatment on the ovarian follicular population and in vitro embryo production of lactating buffalo donors submitted to ovum pick-up. **Animal reproduction science**, v. 154, p. 1-7, 2015.

FERREIRA, R. M.; MACABELLI, C. H.; DE CARVALHO, N. A. T.; SOARES, J. G.; GIMENES, L. U.; FERRAZ, M. L.; MEIRELLES, F. V. Molecular evaluation of developmental competence of oocytes collected in vivo from buffalo and bovine heifers during winter and summer. **Buffalo Bulletin**, v.32, p.596-600, 2013.

FONSECA, W. O búfalo, sinônimo de carne, leite, manteiga e trabalho. 4. ed. São Paulo: Ícone, coleção Brasil agrícola, p. 47-48, 1986.

GALLI, C.; CROTTI, G.; NOTARI, C.; TURINI, P.; DUCHI, R.; LAZZARI, G. Embryo production by Ovum Pick-up from live donors. **Theriogenology**, 55, 1341-1357, 2001.

GARCIA, A. R. Influência de fatores ambientais sobre as características reprodutivas de búfalos do rio (*Bubalus bubalis*). **Revista de Ciências Agrárias**, v. 45, p. 1-13, 2006.

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

GASPARRINI, B. Effects of reproductive season on embryo development in the buffalo. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 31, p. 68-81, 2019.

GHUMAN, S. P.; SINGH, J.; HONPARKHE, M.; DADARWAL, D.; DHALIWAL, G. S.; JAIN, A. K. Induction of ovulation of ovulatory size nonovulatory follicles and initiation of ovarian cyclicity in summer anoestrous buffalo heifers (*Bubalus bubalis*) using melatonin implants. **Reprod. Domest. Anim.** v.45, p.600-607, 2010.

GIMENES, L. U.; FERRAZ, M. L.; FANTINATO-NETO, P.; CHIARATTI, M. R.; MESQUITA, L. G.; SÁ FILHO, M. F.; MEIRELLES, F. V.; TRINCA, L. A.; RENNÓ, F. P.; WATANABE, Y. F.; BARUSELLI, P. S. The interval between the emergence of pharmacologically synchronized ovarian follicular waves and ovum pickup does not significantly affect in vitro embryo production in *Bos indicus*, *Bos taurus*, and *Bubalus bubalis*. **Theriogenology**, V. 83, P. 385-393, 2015.

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, p. 223-230, 1989.

GINTHER, O. J. How ultrasound technologies have expanded and revolutionized research in reproduction in large animals. **Theriogenology**, v. 81, p. 112-125, 2014.

GIORDANO, G.; GUARINI, P.; FERRARI, P.; BIONDI-ZOCCAI, G.; SCHIAVONE, B.; GIORDANO, A. Beneficial impact on cardiovascular risk profile of water buffalo meat consumption. **European journal of clinical nutrition**, v. 64, p. 1000, 2010.

HERZOG, K.; BROCKHAN-LÜDEMANN, M.; KASKE, M.; BEINDORFF, N. PAUL, V.; NIEMANN, H. Luteal blood flow is a more appropriate indicator for luteal function during the bovine estrous cycle than luteal size. **Theriogenology**, v.73, p.691-697, 2010.

HUFANA-DURAN, D.; PEDRO, P. B.; VENTURINA, H. V.; HUFANA, R. D.A.L. SALAZAR JR, P.G. DURAN AND L.C. CRUZ. Post-warming hatching and birth of live calves following transfer of *in vitro*-derived vitrified water buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. **Theriogenology**, v. 61, p. 1429-1439, 2004.

HUFANA-DURAN, D.; PEDRO, P. B.; SALAZAR, A. L.; VENTURINA, H. V.; DURAN, P. G.; CRUZ, L. River buffalo calves (2n=50) delivered to term by swamp buffalo recipients (2n=48) out of *in vitro*-derived vitrified embryos. **Livest. Sci.**, v. 107, p. 213-219, 2007.

IANAS, O.; OLNESCU, R.; BADESCU, I. Melatonin involvement in oxidadctive stress. **Romanian Journal of Endocrinology**, v. 29, p. 147-153, 1991

ITOH, M. T.; ISHIZUKA B.; KURIBAYASHI Y.; AMEMIYA A.; SUMI, Y. Melatonin, its precursors, and synthesizing enzyme activities in the human ovary. **Molecular human reproduction**, v. 5, p. 402-408, 1999.

JOCHLE, W.; LAMMOND, D. R. Control of animal functions in domestic animals. **Martinus Nijhoff**, 1980.

KANDIL, O. M.; ABDOON, A. S. S.; KACHEVA, D.; KARAIVANOV, C. H.; FADEL, M. S.; HEMEIDA, N. A.; BADR. Successful embryo transfer in Egyptian buffaloes. **Global Veterinaria**, v. 8, p. 320-327, 2012.

KASAI, M.; ZHU, S. E.; PEDRO, P. B.; NAKAMURA, K.; SAKURAI, T.; EDASHIGE, K. Fracture damage of embryos and its prevention during vitrification and warming. **Cryobiology**, 33: 459-464, 1996.

KASAI, M.; ITO, K.; EDASHIGE, K. Morphological appearance of the cryopreserved mouse blastocyst as a tool to identify the type of cryoinjury. **Hum Reprod**, v.17, p.1863–1874, 2002.

KAVITA; PHOGAT, J. B.; PANDEY, A. K.; BALHARA, A. K.; GHUMAN, S. S.; GUNWANT, P. Effects of melatonin supplementation prior to Ovsynch protocol on ovarian activity and conception rates in anestrus Murrah buffalo heifers during out of breeding season. **Reprod. Biol.**, v. 18, p. 161–168, 2018.

KIZIL, S. H.; SATILMIS, M.; AKYOL, N.; KARASAHIN, N. T. In vitro bovine embryos frozen by direct transfer method with ethylene glycol. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 27, p. 166, 2014.

KONRAD, J.; CLÉRICO, G.; GARRIDO, M.J.; TAMINELLI, G.; YUPONI, M.; YUPONI, R.; SANSINENA, M. Ovum pick-up interval in buffalo (*Bubalus bubalis*) managed under wetland conditions in Argentina: Effect on follicular population, oocyte recovery, and *in vitro* embryo development. *Anim Reprod Sci*, 183:39-45, 2017.

KRUIP, T. A.; BONI, R.; WURTH, Y. A.; ROELOFSEN, M. W. M.; PIETERSE, M. C. Potential use of ovum pick-up for embryo production and breeding in cattle. *Theriogenology*, v. 42, p. 675-684, 1994.

KUWAYAMA, M.; VAJTA, G.; KATO, O.; LEIBO, S. P. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod Biomed Online*, v. 11, p. 300-308, 2005.

LEIBFRIED, L., & FIRST, N. L. (1979). Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. *Journal of Animal Science*, v. 48, p. 76-86.

LEIBO, S. P.; LOSKUTOFF, N. M.; Cryobiology of in vitro-derived bovine embryos. *Theriogenology*, v. 39, p. 81-94, 1993.

LOPES, L. H. R.; LUCCI, C. M.; GARCIA, M. P.; DE AZEVEDO, R. B.; BÁO SN. Light microscopical and ultrastructural characterization of black howler monkey (*Alouatta caraya*) ovarian follicles. *Anatomia, histologia, embryologia*, v. 35, p. 196-201, 2006.

LUCCI, C. M.; SILVA R. V.; CARVALHO, C. A.; FIGUEIREDO, J. R.; BÁO, S. N. Light microscopical and ultrastructural characterization of goat preantral follicles. *Small Ruminant Research*, v. 41, p. 61-69, 2001.

LUCCI, C. M.; RUMPF, R., FIGUEIREDO J. R.; BÁO S. N. Zebu (*Bos indicus*) ovarian preantral follicles: morphological characterization and development of an efficient isolation method. *Theriogenology*, v. 57, p. 1467-1483, 2002.

MAHMOUD, K. G. M.; ZIADA M. S.; SCHOLKAMY, T. H. Freezability of buffalo semen in relation to its in vitro fertilizing capacity and chromosomal picture. *J. Egypt. Vet. Med. Assoc.*, v. 64, p. 239-251, 2004.

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.246, 1994.

MATOS, A. S.; DE ARAÚJO, C. V.; PIMENTEL, C. M. M.; LAUREANO, M. M. M.; MARQUES, L. C.; SALES, R. L.; SILVA, C. S.; SILVA FILHO, E.; MARQUES, J. R. F. Production of buffalo milk (*Bubalus bubalis*) in Brazil. *Buffalo Bull*; v. 39, p. 323–9, 2020.

MASSIP, A.; ZWALMEN, V. Direct transfer of frozen cow embryos in glycerol-sucrose. *Veterinary Record*, v. 29, p. 327-328, 1984.

MASSIP, A.; ZWALMEN, V. Recent progress in cryopreservation of cattle embryos. *Theriogenology*, v. 27, p. 69-79, 1987.

- MEIRELLES, F. V.; CAETANO, A. R.; WATANABE, Y. F.; RIPAMONTE, P.; CARAMBULA, S. F.; MERIGHE, G. K.; GARCIA, S. M. Genome activation and developmental block in bovine embryos. **Anim. Reprod. Sci.** V. 82-83, p. 13-20, 2004.
- MERTON, J. S.; DE ROOS, A. P. W.; MULLAART, E.; DE RUIGH, L.; KAAL, L.; VOS, P. L. A. M.; DIELEMAN, S. J. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. **Theriogenology**, v. 59, p. 651–674, 2003.
- MIRANDA, W. C. **A criação de búfalos no Brasil**. São Paulo: Editora dos Criadores, p. 15 – 39, 1986.
- MISRA, A. K.; JOSHI, B. V.; AGRAWALA, P. L.; KASIRAJ, R.; SIVAIAAN, S.; RANGAREDDI, N. S.; SIDDIQUI, M. U. Multiple ovulation and embryo transfer in Indian buffalo (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, v. 33, p. 1131-1141, 1990.
- MISRA, A. K.; RAO, M. M.; KASIRAJ, R.; REDDY, N. R. S.; PANT, H. C. Bull-specific effect on fertilization rate and viable embryo recovery in the superovulated buffalo (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, v. 52, p. 701-707, 1999.
- MISHRA, V.; MISRA, A. K.; SHARMA, R. Effect of ambient temperature on in vitro fertilization of bubaline oocyte. **Animal Reproduction Science**, v.100, p. 379–384, 2007.
- MISZTAL, T.; ROMANOWICZ, K.; BARCIKOWSKI, B. Melatonin – a modulator of the GnRHLH axis in sheep. *Reproductive Biology journal*, v. 2, p. 267–275, 2002.
- MONDADORI, R. G.; SANTIN, T. R.; FIDELIS, A. A. G.; PORFÍRIO, E. P.; BÁO, S. N. Buffalo (*Bubalus bubalis*) pre-antral follicle population and ultrastructural characterization of antral follicle oocyte. *Reproduction in domestic animals*, v. 45, p. 33-37, 2010.
- MOORE, K.; RODRIGUEZ-SALLABERRY, C. J.; KRAMER, J. M.; JOHNSON, S.; WROCLAWSKA, E.; GOICOA, S.; NIASARI-NASLAJI, A. In vitro production of bovine embryos in medium supplemented with a serum replacer: effects on blastocyst development, cryotolerance and survival to term. **Theriogenology**, v. 68, p. 1316-1325, 2007.
- MORATO, R.; IZQUIERDO, D.; PARAMIO, M. T.; MOGAS, T. Survival and apoptosis rates after vitrification in cryotop devices of in vitro-produced calf and cow blastocysts at different developmental stages. **Reprod Fertil Dev**, v. 22, p. 1141-1147, 2010.
- MOREIRA, P.; COSTA, A. L.; VALENTIM, J. F. Comportamento produtivo e reprodutivo de bubalinos mestiços Murrah-mediterrâneo em pastagem cultivada de terra firme, no Estado do Acre. **Folheto EMBRAPA ACRE**, v. 13, p. 19, 1994.
- MOREIRA, M. K.; RODRIGUES, S. A. Influence of seasonality on mammals reproduction. **Journal of Zoological Sciences**, v. 4, p. 43-50, 2015.
- MUCCI, N.; KAISER, G. G.; RIOS, G.; ALBERIO, R. H.; FERRÉ, L. B.; ALLER, J. 125 in vitro-produced bovine embryos vitrified in glass capillaries using tcm-199 or dulbecco's phosphate-buffered saline as vitrification-warming media. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 19, p. 180-180, 2007.

MURILLO, A.; MUÑOZ, M.; MARTÍN-GONZÁLEZ, D.; CARROCERA, S.; MARTÍNEZ-NISTAL, A.; GÓMEZ, E. Low serum concentration in bovine embryo culture enhances early blastocyst rates on Day-6 with quality traits in the expanded blastocyst stage similar to BSA-cultured embryos. **Reproductive Biology**, 17, 162–171, 2017.

NAGAI, T. The improvement of in vitro maturation systems for bovine and porcine oocytes. **Theriogenology**, v. 55, p. 1291-1301, 2001.

NANDI, S., M. S. CHAUHAN, P. PALTA. Effect of environmental temperature on quality and developmental competence in vitro of buffalo oocytes. **Vet. Rec.** v. 148, p. 278–279, 2001.

NANDI, S.; RAUGHU, H. M.; RAVINDRANATHA, B. M.; CHAUHAN, M. S. Production of buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos in vitro: premises and promises. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 37, p. 65-74, 2002.

NASCIMENTO, C.; CARVALHO, L. O. M.; **Criação de Búfalos: Alimentação, Manejo, Melhoramento e instalações.** Brasília: EMBRAPA-SPI, 1993.

NEGLIA, G.; GASPARRINI, B.; CARACCILO DI BRIENZA, V.; ZICARELLI, L.; PRESICCE, G. A. Buffalo and Bovine in vitro embryo production from ovum pick up and abattoir derived oocytes. **In Proceedings of the ASPA Congress-Recent Progress in Animal Production Science (Italy)**, 2001.

NEGLIA, G.; GASPARRINI, B.; CARACCILO DI BRENZA, V.; DI PALO, R.; CAMPANILE, G.; PRESICCE G. A.; ZICARELLI, L. Bovine and buffalo in vitro embryo production using oocytes derived from abattoir ovaries or collected by transvaginal follicle aspiration. **Theriogenology**, v. 59, 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. 28, p. 233–236, 2004.

NIEMANN, H. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status and research needs. **Theriogenology**, 35: 109-123, 1991.

OBI-REDDYI, A.; PRAMESHA, K. P.; RAOL, M. K. Effect of climate on the incidence of oestrus, conception and cycle length in Murrah buffaloes. **Icar Publications D. Kma**, v. 69, p. 485-489, 1999.

OHASHI, O. M. Estrous detection in buffalo cow. **Buffalo J.** v. 2, p. 61-64, 1994.

OLIVEIRA, C. M. C.; BARBOSA, J. D., CAVALEIRO DEMACEDO, R. S., BRITO, M. F., PEIXOTO, P. V., TOKARNIA, C. H. Estudo comparativo da toxidez de *Palicourea juruana* (Rubiaceae) para búfalos e bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 24, 27-30 2004.

PANYABORIBAN, S.; THARASANIT, T.; CHANKITISAKUL, V.; SWANGCHAN-UTHAI, T.; TECHAKUMPHU, M. Treatment with chemical delipidation forskolin prior to cryopreservation improves the survival rates of swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) and bovine (*Bos indicus*) in vitro produced embryos. **Cryobiology**, v. 84, p. 46-51, 2018.

PARMEGGIANI, A.; BORGHESE, A.; DI PALO, R.; TERZANO, G.M. Plasma levels of melatonin in buffalo cows. **Prospects of buffalo production in the Mediterranean and the Middle East**, pp. 401-403, 1993.

PARRISH, J. J.; KROGENAES, A.; SUSKO-PARRISH, J. L. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. **Theriogenology**, v. 44, p. 859-869, 1995.

PATIÑO, E. M. Leite de búfalas. *Produção de búfalas de leite. Botucatu: FEPAF*, p. 79-108, 2011.

PAYTON, R. R.; RISPOLI, L. A.; SAXTON, A. M.; EDWARDS, J. L. Impact of heat stress exposure during meiotic maturation on oocyte, surrounding cumulus cell, and embryo RNA populations. **J Reprod Dev.**; 57(4):481-49, 2011.

PEREIRA, R. M.; MARQUES, C. C. Animal oocyte and embryo cryopreservation. **Cell Tissue Bank**, v. 9, p. 267-277, 2008.

PFEIFER, L. F. M.; LEAL, S. D. C. B. D. S.; SCHNEIDER, A.; SCHMITT, E.; CORRÊA, M. N. Effect of the ovulatory follicle diameter and progesterone concentration on the pregnancy rate of fixed-time inseminated lactating beef cows. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41, p. 1004-1008, 2012.

PHOGAT, J. B.; PANDEY, A. K; SINGH, I. Seasonality in buffaloes reproduction. **International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences**, v. 6, p. 46-54, 2016.

PIETERSE, M. C.; KAPPEN, K.; KRUIP, T.; TAVERNE, M. A. M. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. **Theriogenology**, v. 30, p. 751-762, 1988.

PINAFFI, F. L. V.; SANTOS, E. S.; SILVA, M.G.; FILHO, M. M.; MADUREIRA, E. H., SILVA, L. A. Follicle and corpus luteum size and vascularity as predictors of fertility at the time of artificial insemination and embryo transfer in beef cattle. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, p. 470-476, 2015.

PRESICCE, G.; VERBERCKMOES, S.; SENATORE, E.; DEWULF, J.; VAN SOOM, A. Assessment of a new utero-tubal junction insemination device in the Mediterranean Italian water buffalo (*Bubalus bubalis*) under field conditions. **Bubalus bubalis**, v. 26, p. 58-64, 2004.

PUGH, P. A.; MCGOWAN, L. T.; ANKERSMIT, A. E. L.; TERVIT, H. R. Cryopreservation of in vitro produced bovine embryos after culture in the presence of liposomes. **Theriogenology**, v. 1, p. 160, 1996.

PUGLIESI, G.; REZENDE, R. G.; SILVA, J. D.; LOPES, E.; NISHIMURA, T. K.; BARUSELLI, P. S.; MADUREIRA, E. H.; BINELLI, M. Uso da ultrassonografia Doppler em programas de IATF e TETF em bovinos. **Rev Bras Reprod Anim**, V. 41, P. 140-150, 2017.

PUGLIESI, G.; DE MELO, G. D.; SILVA, J. B.; CARVALHÊDO, A. S.; LOPES, E.; DE SIQUEIRA FILHO, E.; BINELLI, M. Use of color-Doppler ultrasonography for selection of recipients in timed-embryo transfer programs in beef cattle. *Theriogenology*, 135, 73-79, 2019.

RALL, W. F. Cryopreservation of oocytes and embryos: methods and applications. *Animal Reproduction Science*, v. 28, p. 237-245, 1992.

RAMADAN, T.; A., SHARMA, R. K.; PHULIA, S.; BALHARA, A. K.; GHUMAN, S. S.; SINGH, I. Effectiveness of melatonin and controlled internal drug release device treatment on reproductive performance of buffalo heifers during out-of-breeding season under tropical conditions. *Theriogenology*, v. 82, p. 1296–1302, 2014.

RAMADAN, T.; A., SHARMA, R. K.; PHULIA, S.; BALHARA, A. K.; GHUMAN, S. S.; SINGH, Manipulation of reproductive performance of lactating buffaloes using melatonin and controlled internal drug release device treatment during out-of-breeding season under tropical conditions. *Theriogenology*, v. 86, p. 1048–1053, 2016.

RIZOS, D.; WARD, F.; DUFFY, P.; BOLAND, M. P.; LONERGAN, P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: Implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol Reprod Dev*, v. 61, p. 234-248, 2002.

RONDINA, D.; FREITAS, V. J. F.; AMORIM, C. A.; MAFUCCI, A.; CONTI, S.; CECCHI, R.; PAULA, N. R. O.; MARTINI, A. Preantral follicular development in Massese lambs born during two seasons of the year. *Small Ruminant Research*, v. 57, p. 277-280, 2005.

RONNBERG, L.; KAUPPILA, A.; LEPPALUOTO, J.; MARTIKAINEN, H.; VAKKURI, O. Circadian and seasonal variation in human preovulatory follicular fluid melatonin concentration. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 71, p. 493- 496, 1990.

ROY, B.; MEHLA, R. K.; SIROHI, S. K. Influence of milk yield, parity, stage of lactation and body weight on urea and protein concentration in milk of Murrah buffaloes, *Asian-Australian Journal of Animal Science*, v. 16(9), p. 1285–1290, 2003.

ROY, K. S. and PRAKASH, B. S. Plasma progesterone, oestradiol-17 β and total oestrogen profiles in relation to oestrous behaviour during induced ovulation in Murrah buffalo heifers. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, v. 93, p. 486–495, 2009.

RUSSO, M.; VECCHIO, D.; NEGLIA, G.; PACELLI, C.; PRANDI, A.; GASPARRINI, B.; ZICARELLI, L.; D'OCCHIO, M. J.; CAMPANILE, G. Corpus luteum function and pregnancy outcome in buffaloes during the transition period from breeding to non-breeding season. *Reproduction in domestic animals*, v. 45, p. 988-991, 2010.

SÁ FILHO, M. F.; CARVALHO, N. A. T.; GIMENES, L. U.; TORRES JÚNIOR, J. F.; FERREIRA, C.R.; PERECIN, F.; PERINI, A. P.; TETZNER, T. A. D.; VANTINI, R.; SORIA, G. F.; GARCIA, J. M.; TONHATI, H.; GASPARRINI, B.; BARUSELLI, P. S. Prenhezes de embriões bubalinos frescos e vitrificados produzidos *in vitro*. *Acta Scientiae Veterinariae*. V. 33, p. 431, 2005.

SÁ FILHO, M. F.; CARVALHO, N. A. T.; GIMENES, L. U.; TORRES-JÚNIOR, J. R.; NASSER, L. F.; TONHATI, H.; GARCIA, J. M.; GASPARRINI, B.; ZICARELLI, L.; BARUSELLI, P. S. Effect of recombinant bovine somatotropin (bST) on follicular population and on *in vitro* buffalo embryo production. **Animal Reproduction Science**, v. 113, p. 51-59, 2009.

SALIBA, W. P.; DRUMMOND, R. M.; ALVIM, M. T. T.; BARUSELLI, P.S.; GIMENES, L.U.; LEITE, R. C.; BASTIANETTO, E.; GASPARRINI, B. In vitro embryo production in buffalo (preliminary results). **Anais do V Simpósio de Búfalos das Américas e IV Europe and America's Buffalo Symposium**, p.126, 2009.

SALIBA, W. P.; GIMENES, L. U.; DRUMMOND, R. M.; BAYÃO, H. X. S.; DI PALO, R.; GASPARRINI, B.; RUBESSA, M.; BARUSELLI, P. S.; SALES, J. N. S.; BASTIANETTO, E.; LEITE, R. C.; ALVIM, M. T. T. Which Factors Affect Pregnancy Until Calving and Pregnancy Loss in Buffalo Recipients of in vitro Produced Embryos?. **Frontiers in Veterinary Science**, P. 945, 2020.

SALIBA, W. P.; GIMENES, L. U.; DRUMMOND, R. M.; BAYÃO, H. X. S.; ALVIM, M. T. T.; BARUSELLI, P. S.; LEITE, R. C.; BASTIANETTO, F.; GASPARRINI, B. Efficiency of OPU-IVF-ET of fresh and vitrified embryos in buffaloes. **Abstracts of 10th World Bullalo Congress and 7th Asian Buffalo Congress**, p.10, 2013.

SANCHES, B. V.; LUNARDELLI, P. A.; TANNURA, J. H.; CARDOSO, B. L.; PEREIRA, M. H. C.; GAITKOSKI, D.; BASSO, A. C.; ARNOLD, D. R.; SENEDA, M. M. A new direct transfer protocol for cryopreserved IVF embryos. **Theriogenology**, v. 85, p. 1147- 1151, 2016.

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, p. 1- 15, 2006.

SANTOS, D. C. N.; SANTANA, P. P. B.; SÁ, A. L. A. Evaluation of apoptosis as a mechanism of follicular cell atresia in the ovaries of cattle (*Bos indicus*) and buffalo (*Bubalus bubalis*) fetuses. **Animal Reproduction**, 10(1):55-61, 2013.

SCHOLKAMY, T. H.; MAHMOUD, K. G. H. M; EL ZOHERY, F. A.; ZIADA, M. S. Evaluation of sephadex filtration for freezability and in vitro fertilizing ability of buffalo semen. **Global Veterinaria**, v. 3, p. 144-150, 2009.

SHAFIE, M. M. Environmental effects on water buffalo production. **World Animal Review FAO**, v. 77, p. 21-25, 1993.

SHAH, S. N. H.; WILLEMSE, A. H.; VAN DE WIEL, D. F. M. Descriptive epidemiology and treatment of postpartum anestrus in dairy buffalo under small farm conditions. **Theriogenology**, v. 33, p. 1333-1345, 1990.

SHAHZAD, Q.; Waqas, M.; PU, L.; WADOOD, A. A.; XIE, L.; HUSNA, A. U.; YANG, K.; WANG, J.; XU, H.; LU, K.; LU, Y. Developmental potential of buffalo embryos cultured in serum free culture system. **Theriogenology**, 2020.

SILVA, J. C. B., FERREIRA, R. M., MATURANA FILHO, M., DE REZENDE NAVES, J., SANTIN, T., PUGLIESI, G.; MADUREIRA, E. H. Use of FSH in two different regimens for ovarian superstimulation prior to ovum pick up and in vitro embryo production in Holstein cows. *Theriogenology*, v. 90, p. 65-73, 2017.

SINGH, J.; ADAMS, G. P. Histomorphometry of dominant and subordinate bovine ovarian follicles. *The Anatomical Record: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, v. 258, p. 58-70, 2000.

SIROIS, J.; FORTUNE, J. E. Ovarian Follicular Dynamics during the Estrous Cycle in Heifers Monitored by Real-Time Ultrasonograph. *Biology of reproduction*, v. 39, p. 308-317, 1988.

SOARES, J. M.; MASANA, M. I.; ERSAHIN C.; DUBOCOVICH M. L. Functional melatonin receptors in rat ovaries at various stages of the estrous cycle. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 306, p. 694-702, 2003.

SOLIMAN, W. T. M.; MAHMOUD, K G. H. M; EL-KHAWAGAH, A. R. M.; KANDIEL, M. M. M.; ABOUEL-ROOS, M. E. A.; ABDEL-GHAFFAR, A. E.; EL AZAB, A. E. I. Impact of in vitro fertilization by fresh and frozen semen on developmental competence and cryotolerance of buffalo embryos. *Iranian Journal of Veterinary Research*, v. 19, p. 178, 2018.

SPEGIORIN, M. R.; SANCHES, B. V.; FORTES PONTES, J. H.; RIGO, A. G.; UNTURA, R. M.; FERREIRA, C. R.; MOINO, L. L.; BASSO, A. C. Technical report: Pregnancy rates evaluation after large scale transfer of *in vitro* produced and vitrified bovine embryos from diverse breeds. *Proceedings of the 24th Annual Meeting of the Brazilian Embryo Tecnology Society (SBTE)*, p. 414, 2010.

STINSHOFF, H.; WILKENING, S.; HANSTEDT, A.; BRUNING, K.; WRENZYCKI, C. Cryopreservation affects the quality of in vitro produced bovine embryos at the molecular level. *Theriogenology*, v. 76, p. 1433-1441, 2011.

STRINGFELLOW, D. A.; GIVENS, M. D. Manual of the International Embryo Transfer Society (IETS). 4th ed. Champaign, IL: IETS, 2010.

SUDANO, M. J.; PASCHOAL, D. M.; DA SILVA, R. T.; MAGALHÃES, L. C. O.; CROCOMO, L. F.; DE LIMA-NETO, J. F.; DA CRUZ LANDIM, F. A. Lipid content and apoptosis of in vitro-produced bovine embryos as determinants of susceptibility to vitrification. *Theriogenology*, v.75, p. 1211-1220, 2011.

SUDANO, M. J.; PASCHOAL, D. M.; RASCADO, T. S.; CROCOMO, L. F.; MAGALHAES, L. C.; JUNIOR, A. M.; MACHADO, R.; LANDIM-ALVARENGA, F. C. Crucial surviving aspects for vitrified in vitro-produced bovine embryos. *Zygote*, v. 22p. 124-131, 2012.

TAKAHASHI, T.; INABA, Y.; SOMFAI, T.; KANEDA, M.; GESHI, M.; NAGAI, T.; MANABE, N. Supplementation of culture medium with L-carnitine improves development and cryotolerance of bovine embryos produced in vitro. *Reproduction, Fertility and Development*, 25, 589–599, 2013.

TAMURA, H.; TAKASAKI A.; MIWA I.; TANIGUCHI K.; MAEKAWA R.; ASADA H., TAKETANI.; MATSUOKA A.; YAMAGATA Y.; SHIMAMURA K.; MORIOKA H.; ISHIKAWA H. REITER R. J.; SUGINO N. Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. **Journal of pineal research**, v. 44, p. 280-287, 2008.

TANEJA, M.; SINGH, G.; TOTTEY, S. M.; ALI A. Follicular dynamics in water buffalo superovulated in presence or absence of a dominant follicle. **Theriogenology**, v. 44, p. 581–97, 1995.

TERZANO, G.M. Ultrasonography and reproduction in buffalo, **Journal of Buffalo Science**, v. 1, p. 163–173, 2012.

VAJTA, G.; HYTTEL, P.; CALLESEN, H. Morphological changes of in vitro produced bovine blastocysts after vitrification, in straw direct rehydration, and culture. **Mol Reprod Dev**, v. 48, P. 9–17, 1997

VAJTA, G.; HOLM, P.; KUWAYAMA, M.; BOOTH, P. J.; JACOBSEN, H.; GREVE, T. Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Mol Reprod Dev**, v. 51, p. 53–58, 1998.

VAJTA, G.; NAGY, Z. P. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. **Reproductive biomedicine online**, v. 12, p. 779-796, 2006.

VALE, W. G.; RIBEIRO, H. F. L.; SILVA, A. O. A.; SOUSA, J.S.; OHASHI, O. M.; SOUZA, H.E.M. Buffalo a non-seasonal breeder in the Amazon Valley, Brazil. **Proc. 13th Int. Cong. Anim. Reprod.** v. 3, p. 19-33, 1996.

VALE, W. G.; RIBEIRO, H. F. L. Características reprodutivas dos bubalinos: puberdade, ciclo estral, involução uterina e atividade ovariana no pós-parto. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 29, p. 63-73, 2005.

VOELKEL, S. A.; HU, Y. X. Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos. **Theriogenology**, v. 37, p. 23-37, 1992a.

YANG, C.Y.; PANG, C.Y.; YANG, B.Z.; LI, R.C.; LU, Y.Q.; LIANG, X.W. Optimization of cryopreservation of buffalo (*Bubalus bubalis*) blastocysts produced by *in vitro* fertilization and somatic cell nuclear transfer. **Theriogenology**, v.78, p. 1437–1445, 2012.

ZICARELLI, L. Reproductive sazonality in buffalo. Proc. 3th International Course of Biotechnology in Buffalo Reproduction, Napoli 06/10/1997, **Suppl. Bubalus Bubalis**, p. 29-52.

ZICARELLI L. Enhancing reproductive performance in domestic dairy water buffalo (*Bubalus bubalis*). **Soc Reprod Fertil Suppl** v. 67, p. 443–55, 2010.

ZHANG, B. R.; LARSON, B; LUNDEHEIM, N.; RODERIGUEZ MARTINEZ, H. Sperm characteristics and zona pellucida binding in relation to field fertility of frozen-thawed semen from dairy AI bulls. **International journal of andrology**, v. 21, p. 207-216, 1998.

WAHEED, M. M. Ovarian activity and hormonal relationships in pregnant buffaloes. *Buffalo bulletin*, v. 30, p. 55-99, 2011.

WATANABE, Y. F.; SOUZA, A. H.; MINGOTI, R. D.; FERREIRA, R. M.; BATISTA, E. O. S.; DAYAN, A.; WATANABE, O.; MEIRELLES, F. V.; NOGUEIRA M. F. G.; FERRAZ, J. B. S., BARUSELLI, P. S. Number of oocytes retrieved per donor during OPU and its relationship with in vitro embryo production and field fertility following embryo transfer. *Anim. Reprod*, v. 14, p. 635-644, 2017.

WILLADSEN, S.; POLGE, C.; ROWSON, L. E. A. The viability of deep-frozen cow embryos. *Reproduction*, v. 52, p. 391-393, 1978.

APÊNDICE I

Efeito do reprodutor

Efeito do reprodutor na Produção de embriões

Os touros envolvidos no experimento foram avaliados preliminarmente por microscopia, utilizando-se a análise pelo método CASA (Computer Assisted Sperm Analysis). Um dos reprodutores, foi descartado no início do experimento por apresentar baixa produção de embriões na primeira sessão de OPU e somente 19,5% de membrana plasmática intacta após análise pela técnica de sondas fluorescentes.

Tabela 6 - Análise por microscopia e uso de sondas fluorescentes de amostras de sêmen provenientes de quatro diferentes búfalos, utilizados na FIV para a produção de embriões.

Touro	Conc. X10	Mot. (%)	Vigor	Def. >	MP Intac.	Acr. Intac.
A	20.0	47	2/3	17.5	25.5	49.0
B	57.5	63	2	27.0	39.5	76.0
C	38.7	78	3	34.0	47.5	91.5
D	22.5	38	2/3	34.5	49.5	74.0

Fonte: Própria autoria

Conc. = concentração; Mot. = motilidade; Def. > = defeitos maiores; Def. < = defeitos menores; MP Intac. = membrana plasmática; Acr. Intac. = acrossomo intacto.

Para produzir os embriões utilizados no estudo da sazonalidade participaram quatro touros, dos quais, dois estiveram presentes em acasalamentos na ERF e ERD. Esses touros apresentaram melhor taxa de clivagem na ERF, porém maior taxa na produção de embriões na ERD. Já, o percentual de embriões não aptos a serem criopreservados foi maior na ERD em relação à ERF para os 2 touros considerados, conforme demonstrado na tabela 7.

Tabela 7 - Taxa de produção de embriões e não aptos à criopreservação, em relação aos oócitos destinados ao cultivo in vitro (CIV) utilizando sêmen de 4 diferentes búfalos, sendo que 2 deles foram

utilizados na ERF e ERD.

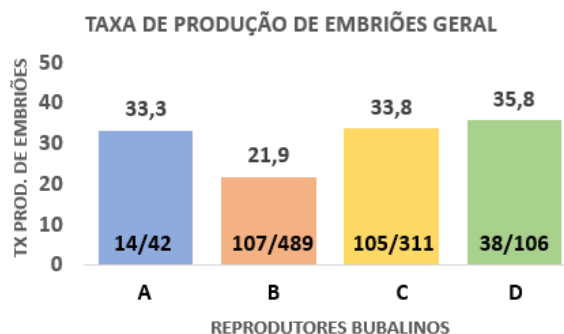
Reprodutor	ERF/ERD	CIV	CLIV	CLIV/CIV(%)	EMB	EMB (%)	ÑAP	ÑAP (%)
A	ERD	42	31	73.8	14	33.3	0	0
B	ERF	345	245	71.0	72	20.9	1	1.4
B	ERD	144	79	54.9	35	24.3	6	17.1
C	ERF	52	31	59.6	22	42.3	0	0
C	ERD	259	130	50.2	83	32.0	16	19.3
D	ERD	106	74	69.8	38	35.8	0	0

Fonte: Própria autoria

Legenda: CIV = oócitos cultivados *in vitro*; CLIV. = oócitos clivados; CLIV/CIV = proporção de oócitos clivados em relação aos cultivados *in vitro*; EMB = embriões produzidos; % EMB = taxa de produção de embriões; VT = embriões vitrificados; TD = embriões criopreservados para transferência direta; ÑAP = embriões não aptos para serem criopreservados.

Os reprodutores “A” e “D” foram utilizados somente na ERD e mesmo assim apresentaram taxas de produção de embriões de 33,3% e 35,8%, respectivamente. Esse pode ser considerado um bom resultado e talvez as taxas pudessem ser mantidas nesse patamar ou acima na ERF.

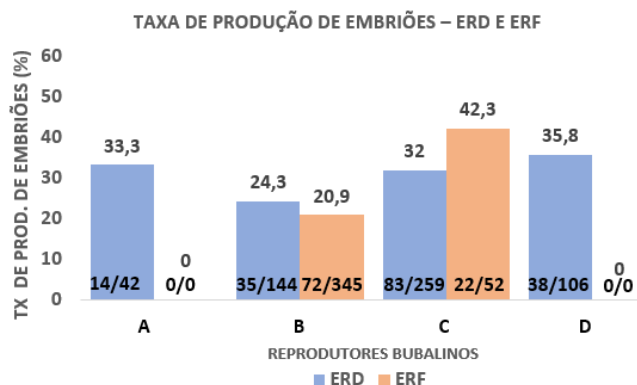
Figura 18 - Taxa de produção de embriões dos 4 reprodutores envolvidos no experimento.



Fonte: Própria autoria

Figura 19 - Desempenho dos touros na produção de embriões, desmembrando suas atuações na ERD

e ERF.

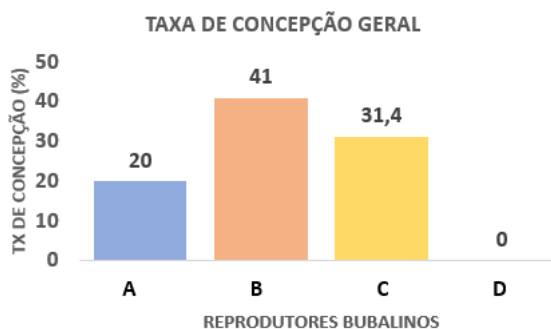


Fonte: Própria autoria

Efeito do reprodutor no estabelecimento da gestação

Durante o experimento foram utilizados acasalamentos para as doadoras de acordo com critérios da fazenda. O resultado do sêmen analisado pela técnica de sondas fluorescentes com Iodeto de Propídio, apresentou percentual de membrana citoplasmática íntegra adequado em relação aos 4 touros utilizados no experimento: “A” (25,5%), “B” (39,5%), “C” (47,5%) e “D” (49,5%). Já, um quinto touro foi excluído do experimento por apresentar 19,5% de membrana citoplasmática íntegra e uma taxa de produção de embriões de 20,6% quando foi utilizado pela primeira vez, previamente ao início do experimento.

Figura 20 - Taxa de concepção de embriões produzidos após a FIV, utilizando-se sêmen de quatro diferentes reprodutores bubalinos, durante o experimento.

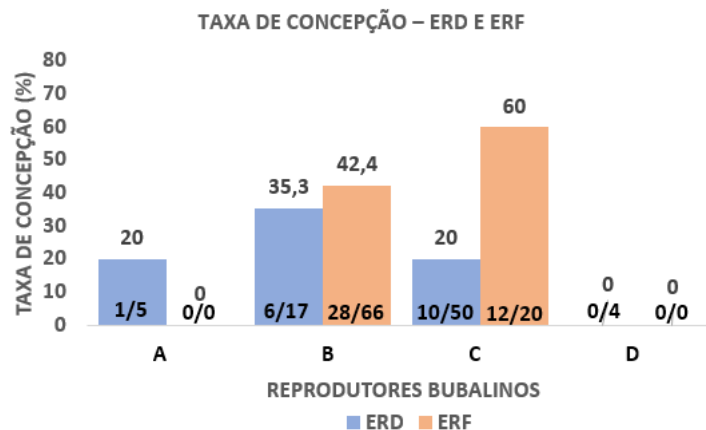


Fonte: Própria autoria

Conforme observado na tabela 7, o reprodutor “B” apresentou menor taxa na produção de embriões. Já na figura 20, o mesmo reprodutor apresentou melhor TC, entre os demais reprodutores.

Analisando os dados de produção de embriões dos touros nas duas estações reprodutivas, nota-se que o touro “C” apresentou diferentes índices de produção entre a ERF e ERD.

Figura 21 - Taxa de concepção de embriões produzidos após a fecundação utilizando sêmen de quatro diferentes búfalos, ao longo de 6 sessões de OPU.



Fonte: Própria autoria