



Caracterização anatomofuncional do sistema genital de fêmeas bubalinas (*Bubalus bubalis*) e suas implicações na múltipla ovulação e transferência de embriões
*Anatomical and functional characterization of the genital system of female buffaloes (*Bubalus bubalis*) and its implications on multiple ovulation and embryo transfer*

N.A.T. Carvalho^{1,5}, P.P. Bombonato², M. D'Angelo³, P.S. Baruselli⁴

¹Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento/Pólo Regional do Vale do Ribeira/APTA, Registro, SP, Brasil.

²Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, São Paulo, SP, Brasil.

³Instituto Biológico/APTA, São Paulo, SP, Brasil.

⁴Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, São Paulo SP, Brasil.

⁵Autor para correspondência: nelcio@apta.sp.gov.br

Resumo

Realizaram-se estudos para aferir as prováveis causas da baixa taxa de recuperação de estruturas embrionárias em búfalas superovuladas. No primeiro estudo (Experimento 1), foram utilizados sistemas genitais de búfalas e de bovinas tratadas para a indução de ovulações únicas ou múltiplas, os quais foram submetidos à morfometria, seguidos de lavagem dos ovidutos para a recuperação dos oócitos. Posteriormente, os ovidutos foram encaminhados à histologia. No Experimento 2, foram utilizados ovidutos de búfalas e de bovinas, tratadas para a indução de ovulação única. O lúmen do oviduto foi exposto e, após isso, os ovidutos foram incubados em meio de cultura com ou sem E₂, com posterior colocação de microesferas na sua superfície para a aferição do movimento ciliar. No Experimento 3, foram utilizados ovidutos de búfalas e de bovinas tratadas para a indução de ovulação única. Os ovidutos foram incubados em meio de cultura com ou sem E₂, com a inserção de oócitos bubalinos ou bovinos em seu lúmen, sendo posteriormente lavados para a recuperação e contagem dos oócitos. No Experimento 4, búfalas e bovinas foram tratadas para a indução de ovulações únicas ou múltiplas. Após a ovulação, os animais foram submetidos à laparotomia para a inserção de oócitos bubalinos ou bovinos no oviduto. Posteriormente (cinco e seis dias após a inserção dos oócitos bubalinos e bovinos, respectivamente), os sistemas genitais foram lavados *in vivo* para a recuperação das estruturas embrionárias. Foi verificado que: no Experimento 1, a taxa de recuperação de oócitos foi maior para as bovinas que para as búfalas, e as camadas musculares do infundíbulo foram mais espessas para as búfalas que para as bovinas; no Experimento 2, a presença de E₂ no meio de cultura não interferiu na direção do deslocamento das microesferas em nenhuma porção dos ovidutos de búfalas e de bovinas; no Experimento 3, o transporte de oócitos pelo oviduto de búfalas e de bovinas não foi influenciado pela espécie do oócito e pelo E₂; no Experimento 4, o número e a taxa de recuperação de estruturas embrionárias não foram influenciados pelo tratamento ou pela espécie dos oócitos. Os resultados dos experimentos reforçam que a baixa taxa de recuperação de estruturas embrionárias pode não estar relacionada à reposta folicular aos tratamentos superovulatórios, mas sim a alguma falha na captação dos oócitos pelas fimbrias do oviduto após a superovulação. As fêmeas bubalinas apresentam particularidades no sistema genital que podem afetar a captação de oócitos em animais superovulados.

Palavras-chave: búfalas, estradiol, múltipla ovulação, nelores, oócito.

Abstract

*Studies were performed to assess the probable causes of the low embryonic structures recovery rate in superovulated buffaloes. In the first study (Experiment 1) were used buffaloes and bovines genital systems treated to induce single or multiple ovulations, which were submitted to morphometry followed by oviducts flushing for the oocytes recovery. Subsequently, the oviducts were sent to histology. In Experiment 2, were used buffaloes and bovines oviducts treated for single ovulation. The oviduct lumen was exposed and, thereafter, incubated in culture medium with or without E₂, with subsequent placement of microspheres on its surface for the ciliary movement measure. In Experiment 3, were used buffaloes and bovines oviducts treated for a single ovulation. The oviducts were incubated in culture medium with or without E₂, with the inclusion of bovine or buffalo oocytes in the lumen, and subsequently flushed for the oocytes recovery and counting. In Experiment 4, buffaloes and bovines were treated to induce single or multiple ovulations. After ovulation, the animals underwent laparotomy for the insertion of bovine or buffalo oocytes in the oviduct. Later (five and six days after buffalo and bovine oocytes insertion, respectively), the genital systems were flushed *in vivo* for the embryonic structures recovery. The results are: in Experiment 1, the oocytes recovery rate was higher for bovines than for buffaloes and the infundibulum muscular layers were thicker for buffaloes than for bovines; in Experiment 2, the presence of E₂ in the culture medium did not affect the microspheres displacement direction in any portion of the buffaloes and bovines oviducts; in Experiment 3, the transport of oocytes by the buffaloes and bovines oviducts*



was not influenced by the oocytes species and the E₂. In Experiment 4, the number and the embryonic structures recovery rate were not affected by treatment or oocytes species. The experimental results reinforce that the low embryonic structures recovery rate may not be related to the follicular response to superovulation treatment, but to any failure of the oviduct fimbriae to capture some of oocytes after superovulation. The buffalo have particularities in the genital tract that can affect the oocyte retrieval in superovulated animals.

Keywords: buffaloes, estradiol, multiple ovulation, nelore, oocyte.

Introdução

Nos últimos dez anos, a taxa de crescimento do rebanho bubalino mundial foi de 13,8%, e a produção de leite aumentou 28,4% nesse período. Atualmente existem cerca de 188,3 milhões de cabeças de búfalos, os quais são responsáveis pela produção anual de 90,3 milhões de toneladas de leite (Food and Agriculture Organization - FAO, 2011).

Entretanto, como ocorre nas demais espécies de interesse zootécnico, o crescimento do rebanho bubalino deve estar associado ao controle da produtividade – o qual possibilita a identificação dos indivíduos que possuem mérito genético – e, conseqüentemente, à multiplicação e à distribuição dos animais melhoradores, o que só é possível com o auxílio das biotecnologias da reprodução. Se assim conduzida, a bubalinocultura – que atualmente responde por 13,0% da produção mundial de leite (FAO, 2011) – tende a se tornar uma atividade econômica cada vez mais atraente sob os pontos de vista econômicos e sociais.

Nesse contexto, a inseminação artificial (IA), que permite a multiplicação de material genético de origem paterna, é indispensável para o melhoramento da espécie. Mas, para acelerar o processo de melhoramento genético, faz-se necessário aumentar a contribuição das fêmeas, o que implica a utilização de outras biotecnologias – como a múltipla ovulação e a transferência de embriões (MOET) – a essa ferramenta.

Embora haja registros do nascimento de búfalos com o emprego da MOET no Brasil e em outros países (Drost et al., 1983; Baruselli, 1994), a utilização dessa técnica na espécie ainda apresenta limitações, ligadas principalmente à baixa taxa de recuperação embrionária (Misra et al., 1990, 1994; Ambrose et al., 1991; Prakash et al., 1992; Baruselli, 1994, 1997; Zicarelli et al., 1994a, b, 2000; Taneja et al., 1995a, b; Madan et al., 1996; Baruselli et al., 1999b, c, 2001b, 2002b; Carvalho et al., 2002).

Os avanços proporcionados pela técnica de MOET permitem afirmar que as fêmeas bubalinas respondem ao tratamento superovulatório, embora sejam menos eficientes que as fêmeas bovinas na recuperação de embriões. De acordo com Baruselli et al. (2000b), somente 34,8% das ovulações de búfalas submetidas à superestimulação do crescimento folicular resultam na colheita de estruturas embrionárias, percentual muito inferior àquele encontrado por Adams (1994), que registra taxas de 63 a 80% em bovinos. Essa disparidade entre as taxas de recuperação de embriões nas duas espécies pode estar relacionada a alguma falha no processo de captação e/ou transporte dos oócitos pelo oviduto.

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

Os baixos resultados da MOET na espécie bubalina podem decorrer das altas concentrações do hormônio estradiol (E₂), postulam Misra et al. (1998). É possível que as fêmeas bubalinas sejam mais sensíveis que as fêmeas bovinas a elevações nas concentrações plasmáticas de E₂ durante os tratamentos superovulatórios (Beg et al., 1997), pois as búfalas apresentam menores concentrações plasmáticas de E₂ do que as fêmeas bovinas durante o ciclo estral normal (Batra et al., 1983).

A exposição até aqui realizada indica a importância de investigar detalhadamente as inter-relações anatomofuncionais entre os hormônios esteroides ovarianos e o sistema genital das búfalas. A compreensão dos processos fisiológicos que envolvem as concentrações de E₂ e progesterona (P₄), a ovulação, a qualidade do oócito e a captação e o transporte oocitário é de grande importância para a melhoria da eficiência da MOET em bubalinos. O presente artigo tem como objetivo apresentar pesquisas recentes que procuram elucidar os fatores que afetam a eficiência da MOET em bubalinos.

Material e Métodos

Experimento 1 - Morfometria comparativa dos sistemas genitais de fêmeas bubalinas e bovinas na fase pós-ovulatória

Este experimento foi conduzido para verificar a hipótese de que a anatomia do sistema genital das fêmeas bubalinas é diferente daquela das fêmeas bovinas submetidas a tratamentos iguais.

Para tanto, foram utilizadas 72 fêmeas divididas aleatoriamente em quatro grupos (G-BufOv, n = 23

búfalas com ovulação única; G-BovOv, n = 11 bovinas com ovulação única; G-BufSov, n = 27 búfalas com múltipla ovulação; G-BovSov, n = 11 bovinas com múltipla ovulação). No dia 0 (D0), todas as fêmeas receberam um dispositivo intravaginal de P₄ (DIB) e a aplicação intramuscular (im) de 2 mg de benzoato de estradiol (BE) associado a 50 mg de P₄. O crescimento folicular foi superestimulado no D4 (G-BufSov e G-BovSov) pelo tratamento com 2.500UI im de eCG (Novormon). Todos os animais receberam 0,15 mg im de PGF_{2α} no D8 (Prolise), juntamente à remoção dos DIBs. Nas fêmeas dos G-BufOv e G-BovOv, foram aplicadas mais 400UI im de eCG (D8). No D9, os animais receberam a aplicação im de GnRH (Gestran-Plus; G-BufOv e G-BovOv: 25µg; G-BufSov e G-BovSov: 50µg), 12 (G-BovSov) e 24 horas (G-BufOv, G-BovOv e G-BufSov) após a remoção dos DIBs. Os genitais foram submetidos à contagem do número de corpos lúteos (CL), à morfometria e à lavagem dos ovidutos.

O número CL foi verificado, os ovários dissecados, separados das bursas e dos mesovários. Os ovidutos foram cortados na junção úterotubárica e dissecados. Após isso, foram introduzidos nos infundíbulos 40 ml de meio de lavagem (D-PBS) contendo 1% de soro fetal bovino. O efluente de cada oviduto foi coletado separadamente dentro de placas de Petri, as quais foram avaliadas em lupas estereoscópicas, para a localização e a contagem dos oócitos.

Posteriormente, os ovidutos foram separados em três porções – infundíbulo, ampola e istmo –, acondicionados em frascos com solução aquosa de formol a 10%. Para as análises histológicas, foram utilizados seis ovidutos para o G-BufOv, seis ovidutos para o G-BovOv, quatro ovidutos para o G-BufSov e seis ovidutos para o G-BovSov. Para cada bloco, foi efetuado um corte de 3 µm de espessura, que foi fixado em lâmina, corado com hematoxilina e eosina e coberto com lamínula. Por meio do microscópio de luz acoplado ao programa Axiocam HRc, foram efetuadas as medições da espessura da musculatura lisa – circular e longitudinal – das porções do oviduto.

Experimento 2 - Movimento ciliar in vitro das células endoteliais de ovidutos bubalinos e bovinos tratados ou não com estradiol

Segundo Beg et al. (1997), as búfalas podem ser mais sensíveis do que as bovinas a elevações nas concentrações plasmáticas de E₂. Com base em tais achados, o presente experimento foi conduzido para verificar a hipótese de que a elevação nas concentrações plasmáticas de E₂ durante os tratamentos superovulatórios afeta os movimentos ciliares das células endoteliais do oviduto de búfalas. Para tanto, foram utilizados ovidutos de fêmeas bubalinas e bovinas no período pós-ovulatório, que constitui o período de maior atividade dos cílios das células endoteliais do oviduto (Hafez e Hafez, 2004). Para verificar a influência *in vitro* do E₂ no movimento ciliar, os ovidutos foram tratados ou não com esse hormônio.

Foram utilizadas 10 búfalas e 10 bovinas sincronizadas para a obtenção de ovulações únicas de acordo com o protocolo descrito no Experimento 1. Todas as fêmeas foram abatidas 48 horas após a indução da ovulação (D11). Os tratos genitais foram retirados, e os ovidutos dos animais que apresentavam pelo menos um CL foram divulsionados na junção úterotubárica, dissecados e colocados em garrafa térmica contendo D-PBS – adicionado de 1% de antibiótico – a 38,0°C. Posteriormente, os ovidutos foram conduzidos à Unidade de Biologia Celular do Centro de Sanidade Animal do Instituto Biológico de São Paulo.

No laboratório, os ovidutos foram lavados com solução balanceada de Hanks (HBSS), suplementada com 25 mM de HEPES. Foi realizada uma incisão ao longo do comprimento dos ovidutos que, posteriormente, foram colocados em placas de Petri de 150 x 25 mm contendo camada de 1 cm de parafina. Nessas placas, foram identificadas as extremidades dos ovidutos. Quatro grupos foram definidos: G-OvdBuf (n = 7 ovidutos de búfala, sem E₂); G-OvdBov (n = 5 ovidutos de bovina, sem E₂); G-OvdBufE₂ (n = 8 ovidutos de búfala, com E₂); G-OvdBovE₂ (n = 13 ovidutos de bovina, com E₂). Todos os ovidutos foram submersos em 75 ml de solução balanceada de HBSS adicionada ou não de 10 ng/ml de E₂, de acordo com a divisão dos grupos. Cada placa foi incubada – para equilíbrio do meio e da temperatura – em estufa de CO₂ por 30 minutos, com atmosfera e temperatura controladas. Após o período de incubação, microesferas pretas de látex (10 µm) – aproximadamente 450 unidades – foram colocadas na superfície luminal dos ovidutos para a aferição do movimento ciliar. A observação da movimentação e da direção das microesferas foi realizada durante um minuto por porção do oviduto – infundíbulo, ampola e istmo –, em lupas estereoscópicas, e as imagens foram filmadas. Por meio das filmagens, foi possível verificar a direção do deslocamento das microesferas por porção do oviduto.

Experimento 3 - Transporte in vitro de oócitos pelos ovidutos de fêmeas bubalinas e bovinas tratados ou não com estradiol

A reversão no peristaltismo do oviduto verificada por Bellve e McDonald (1970) em fêmeas superovuladas de pequenos ruminantes – devido às altas concentrações de E₂ – pode ocorrer em búfalas submetidas ao mesmo tratamento. Além disso, a frágil ligação entre as camadas de células da granulosa e os oócitos dessa espécie pode interferir negativamente no transporte desses gametas, pois, de acordo com Hunter

(1988), Lam et al. (2000) e Talbot et al. (2003), o processo de captação e transporte dos oócitos pelo oviduto depende da qualidade dos gametas femininos. Assim, o presente experimento foi conduzido para verificar as hipóteses de que a elevação das concentrações plasmáticas de E_2 durante os tratamentos superovulatórios, afeta o transporte dos oócitos em fêmeas bubalinas, e de que a qualidade inferior dos oócitos de búfalas é responsável pela baixa taxa de recuperação de estruturas embrionárias nas búfalas superovuladas.

Foram utilizadas 10 fêmeas bubalinas e 15 fêmeas bovinas sincronizadas para a obtenção de ovulações únicas, de acordo com o protocolo descrito no Experimento 1. Todas as fêmeas foram abatidas no D11, e o procedimento para retirada e transporte dos ovidutos seguiu-se como descrito no Experimento 2.

Foram realizadas aspirações foliculares em fêmeas bovinas e bubalinas. Na unidade de Biologia Celular, os oócitos recuperados foram colocados em meio de lavagem. Posteriormente à lavagem, foram colocados em meio de maturação e incubados por 24 horas em estufa de CO_2 . Apenas os oócitos maturados – aqueles com as células do *cumulus* expandidas – foram utilizados, totalizando 60 oócitos bovinos e 60 bubalinos.

No laboratório, os ovidutos – ipsilateral e contralateral às ovulações – foram lavados com solução balanceada de Hanks suplementada com 25 mM de HEPES. Posteriormente, os ovidutos foram colocados em placas de Petri de 150 x 25 mm. Nas porções anteriores do infundíbulo, foram inseridos cinco oócitos bubalinos (G-BufBuf, G-Buf E_2 Buf, G-BovBuf e G-Bov E_2 Buf) e cinco oócitos bovinos (G-BufBov, G-Buf E_2 Bov, G-BovBov e G-Bov E_2 Bov) junto com aproximadamente 50 μ l de meio de maturação. Todos os ovidutos foram submersos em 100 ml de meio de maturação, adicionado (G-Buf E_2 Buf, G-Buf E_2 Bov, G-Bov E_2 Buf e G-Bov E_2 Bov) ou não (G-BufBuf, G-BufBov, G-BovBuf e G-BovBov) de 10 ng/ml de E_2 . Cada placa foi incubada em estufa de CO_2 por 24 horas, com atmosfera e temperatura controladas. Após a incubação, foram introduzidos nos infundíbulos 40 ml de meio de lavagem (D-PBS) que continha 1% de soro fetal bovino. O efluente de cada oviduto foi coletado separadamente dentro de placas de Petri, as quais foram avaliadas em lupas estereoscópicas, para a recuperação e a contagem dos oócitos.

Experimento 4 - Transporte in vivo de oócitos pelos ovidutos de fêmeas bubalinas e bovinas com ovulações únicas e múltiplas

Búfalas submetidas a protocolos de IATF em que, na maioria das vezes, um único folículo é induzido a ovular não devem apresentar comprometimento na taxa de recuperação de estruturas embrionárias. Após a IA, as búfalas apresentam satisfatórias taxas de concepção (em torno de 50%), semelhantes àquelas obtidas em bovinas submetidas à IATF (Baruselli et al., 1999a, 2000a, 2001a, 2002a, 2003, 2004). Assim, o presente experimento foi conduzido para verificar duas hipóteses, a saber: a qualidade inferior dos oócitos de búfala é responsável pela baixa taxa de recuperação de estruturas embrionárias dessas fêmeas quando superovuladas; os tratamentos superovulatórios afetam o transporte dos oócitos em fêmeas bubalinas.

Foram utilizadas 10 fêmeas bubalinas e 12 bovinas divididas aleatoriamente em oito grupos (G-BufOvBuf, G-BufOvBov, G-BufSovBuf e G-BufSovBov – búfalas; G-BovOvBuf, G-BovOvBov, G-BovSofBuf e G-BovSovBov – bovinas) e sincronizadas para a obtenção de ovulações únicas (G-BufOvBuf, G-BufOvBov, G-BovOvBuf e G-BovOvBov) ou múltiplas (G-BufSovBuf, G-BufSovBov, G-BovSofBuf e G-BovSovBov), de acordo com os protocolos descritos no Experimento 1. Todas as fêmeas foram submetidas a IA 12 e 24 horas após a aplicação do indutor da ovulação, com sêmen de búfalo (G-BufOvBuf, G-BovOvBuf, G-BufSovBuf e G-BovSofBuf) e de bovino (G-BufOvBov, G-BovOvBov, G-BufSovBov e G-BovSovBov). No D10, os animais foram submetidos à cirurgia para a inserção de oócitos maturados de bubalinos (G-BufOvBuf, G-BovOvBuf, G-BufSovBuf e G-BovSovBuf) e de bovinos (G-BufOvBov, G-BovOvBov, G-BufSovBov e G-BovSovBov). As lavagens uterinas para a recuperação das estruturas embrionárias foram realizadas no D15 (G-BufOvBuf, G-BovOvBuf, G-BufSovBuf e G-BovSovBuf) e no D16 (G-BufOvBov, G-BovOvBov, G-BufSovBov e G-BovSovBov), pelo método não cirúrgico.

Assim como no Experimento 3, foram utilizados oócitos maturados *in vitro*, totalizando 120 oócitos bovinos e 120 bubalinos.

Vinte e quatro horas após a indução da ovulação, os animais foram submetidos à laparotomia. O oviduto ipsilateral ao folículo ovulatório (≥ 8 mm) ou ovulado (G-BufOvBuf, G-BufOvBov, G-BovOvBuf e G-BovOvBov), ou ipsilateral ao maior número de folículos (≥ 8 mm) ou ovulações (G-BufSovBuf, G-BufSovBov, G-BovSovBuf e G-BovSovBov) foi localizado e exteriorizado por tração do ligamento largo. Os animais que não apresentaram folículos ovulatórios (≥ 8 mm) ou ovulados foram descartados. Nas porções anteriores do infundíbulo, foram inseridos dez oócitos bubalinos (G-BufOvBuf, G-BovOvBuf, G-BufSovBuf e G-BovSovBuf) e dez oócitos bovinos (G-BufOvBov, G-BovOvBov, G-BufSovBov e G-BovSovBov) junto com aproximadamente 50 μ l de meio de maturação. Posteriormente, os tratos genitais foram reposicionados, e a incisão suturada.

Os cornos uterinos foram lavados com 1.000 ml de D-PBS adicionada de 1% de soro fetal bovino. O líquido recolhido em filtro foi colocado em placas de Petri, as quais foram avaliadas em lupas estereoscópicas, para a recuperação e a contagem das estruturas embrionárias.



Análise estatística

Os dados foram analisados de acordo com a natureza específica de cada variável, utilizando-se o programa *Statistical Analysis System for Windows*. Os resultados que não atenderam às premissas de normalidade dos resíduos e de homogeneidade das variâncias – verificadas pelo aplicativo *Guided Data Analysis* – foram transformados pelas funções logarítmicas ou de raiz quadrada. Quando a normalidade não foi obtida, empregou-se o procedimento de análise de variância não paramétrica. As variáveis contínuas foram analisadas por ANOVA, com procedimento do SAS/STAT de Modelo Linear Geral. Foram variáveis independentes: búfalas, bovinas, ovulação única, múltipla ovulação, sem E₂, com E₂, oócitos bubalinos, oócitos bovinos e as respectivas interações. O teste de médias utilizado foi o LSD, e o nível de significância mínimo considerado foi de 5%. A média foi utilizada como medida de tendência central, e o erro padrão da média como medida de variabilidade para todas as variáveis analisadas.

Resultados e Discussão

Nos Experimentos 1 e 4, todas as fêmeas bubalinas e bovinas que receberam a aplicação de eCG no dia da retirada do dispositivo de P₄ (ovulação única) apresentaram folículos potencialmente ovulatórios ao final do tratamento, indicando eficiência do protocolo na sincronização do crescimento folicular em ambas as espécies.

Diferentemente das bovinas, que apresentaram maior número de folículos potencialmente ovulatórios no Experimento 4 que no Experimento 1 (20,3 ± 3,1 vs. 10,8 ± 2,8; P < 0,05), as búfalas apresentaram respostas similares à superestimulação do crescimento folicular com eCG nos Experimentos 1 e 4 (8,1 ± 1,1 vs. 6,0 ± 0,5; P > 0,05). A discrepância no número de folículos potencialmente ovulatórios verificados nos ovários das fêmeas bovinas nos dois experimentos pode estar relacionada à grande variação na resposta aos tratamentos superovulatórios observada nessa espécie, como relatado por Bó et al. (2002), Boland et al. (1991), Cushman et al. (1999) e Rouillier et al. (1996).

O desenvolvimento de múltiplos folículos com capacidade ovulatória verificado nos ovários das búfalas sugere que a baixa eficiência da técnica de MOET em bubalinos não decorre da ausência de resposta folicular aos hormônios superovulatórios, o que está de acordo com o verificado por Baruselli et al. (1999b, c) e Carvalho et al. (2002).

Verificou-se, nos Experimentos 1 e 4, que as fêmeas bovinas – com ovulações únicas ou múltiplas – apresentaram maior taxa de ovulação que as bubalinas tratadas com eCG para a superestimulação do crescimento folicular (Experimento 1: 77,3 ± 10,4% e 85,0 ± 9,4% vs. 35,9 ± 5,8%; Experimento 4: 83,3 ± 16,7% e 90,5 ± 2,3% vs. 35,5 ± 7,7%; P < 0,05). De acordo com Schallenberger et al. (1990), búfalas superovuladas apresentam menor pico de LH do que bovinas submetidas ao mesmo tratamento. Dessa forma, sem considerar as razões para a baixa resposta ovulatória, a administração de LH exógeno em substituição ao GnRH poderia ter aumentado o número de ovulações nas búfalas submetidas ao protocolo de MOET.

No Experimento 1, a taxa de recuperação de oócitos das búfalas superovuladas foi inferior à das bovinas tratadas com eCG para a superestimulação do crescimento folicular (20,4 ± 6,4% vs. 52,5 ± 9,4%; P < 0,05). Essa disparidade nos resultados pode estar relacionada ao número de folículos anovulatórios. As búfalas superovuladas apresentaram maior número dessas estruturas que as bovinas submetidas ao mesmo tratamento (4,2 ± 1,2 vs. 1,3 ± 0,5; P < 0,05).

Para Zicarelli (1997), quanto maior a incidência de cistos ovarianos e de folículos anovulatórios, menor será a taxa de recuperação embrionária em búfalas superovuladas. Na ausência de ovulação, os folículos anovulatórios de búfalas submetidas a protocolos de MOET secretam altas concentrações de E₂ (Schallenberger et al., 1990), que podem aumentar a turgidez do sistema genital (Misra et al., 1998) e ocasionar redução na dimensão do lúmen do oviduto (Hunter, 1988).

Além disso, foi verificado no Experimento 1 que o ovário das búfalas é mais firmemente seguro pelo mesovário que o ovário das vacas, assim como verificado por Sane et al. (1964). Essa característica – aliada às altas concentrações de E₂ – pode dificultar, durante o processo ovulatório, a movimentação das gônadas das búfalas submetidas ao protocolo de superestimulação do crescimento folicular e, assim, comprometer a captação dos oócitos. Hafez e Hafez (2004) afirmam que um dos mecanismos responsáveis pelo contato das fimbrias com a superfície do ovário é a atividade muscular do mesovário. Essa atividade é coordenada por mecanismos hormonais afetados pela razão E₂/P₄ (Hafez e Hafez, 2004).

Verificou-se, também no Experimento 1, que a espessura das camadas musculares foi maior no infundíbulo das búfalas superovuladas que no infundíbulo das bovinas submetidas ao mesmo tratamento (10,2 ± 1,4 vs. 5,9 ± 0,3; P < 0,05). Nesse sentido, como o E₂ se liga aos receptores α -adrenérgicos das células de músculo liso do oviduto – principalmente das camadas circulares – (Hunter, 1988), quanto mais espesso o órgão e quanto maior a concentração de E₂, maior será a redução de seu lúmen. Se o lúmen do oviduto estiver reduzido, e, em decorrência disso, seu óstio mais estreito, maior poderá ser a dificuldade do complexo *cumulus-*

oócito (CCO) em se mover para o interior do infundíbulo, o que depende de uma série de fatores.

De acordo com Talbot et al. (1999) e Lam et al. (2000), o processo de captação e transporte do CCO envolve a adesão – de modo transitório – dos cílios do oviduto à matriz extracelular do complexo – substância viscosa formada por glicoproteínas secretadas pelas células do *cumulus oophorus* (Talbot e Di Carantonio, 1984). Se não houver um correto grau de adesão entre a matriz e os cílios, o CCO pode não entrar no oviduto (Lam et al., 2000). O CCO, segundo Talbot et al. (2003), é muito largo para passar pelo óstio do oviduto. Dessa forma, para se mover para o interior do infundíbulo, ele – pela ação dos cílios – gira por vários minutos, para que ocorra a compactação da matriz extracelular e conseqüente redução em seu diâmetro (Talbot et al., 1999).

Provavelmente, por apresentarem frágil ligação com as células da granulosa (Gasparrini, 2002), os oócitos bubalinos produzem menor quantidade de glicoproteínas pelas células do *cumulus oophorus* que os oócitos bovinos. Assim, se o CCO bubalino possui menos matriz extracelular, menor será a adesão entre os cílios do oviduto e o CCO. Somada a isso está à provável dificuldade que o CCO tem de se mover para o interior do infundíbulo em decorrência do estreitamento do óstio do oviduto, tanto pelas características histológicas do órgão quanto pelas concentrações de E₂ em búfalas superovuladas. Assim, como o fluxo dos fluidos do oviduto direciona-se do útero para a cavidade abdominal (Black e Asdell, 1958; Bellve e McDonald, 1968), o CCO, pode ser “lavado” desse órgão.

Esse somatório de fatores poderia explicar, em parte, a baixa taxa de recuperação de oócitos verificada na espécie bubalina em relação à bovina, assim como a baixa taxa de recuperação de estruturas embrionárias de búfalas, como descrito na literatura.

O processo de captação e transporte do CCO da superfície do folículo em colapso para o interior do infundíbulo parece depender mais da qualidade dos gametas femininos que do transporte através do infundíbulo para a ampola. No Experimento 3, o número ($1,4 \pm 0,4$ vs. $0,6 \pm 0,2$) e a taxa de recuperação ($35,2 \pm 9,2\%$ vs. $12,9 \pm 5,4\%$) de oócitos bubalinos e bovinos cultivados *in vitro* e inseridos na porção do infundíbulo de ovidutos de fêmeas búbalinas e bovinas não foram influenciados pela espécie dos gametas. Verificou-se tão somente tendência ($P = 0,07$) de maior taxa de recuperação de oócitos bubalinos que de oócitos bovinos, independentemente da espécie do oviduto e do tratamento. Resultado semelhante foi verificado no Experimento 4. Naquele experimento, não houve efeito dos oócitos ($P > 0,05$) – bubalinos ou bovinos – inseridos no infundíbulo de búfalas e de bovinas sobre o número ($0,3 \pm 0,2$ vs. $0,9 \pm 0,9$) e a taxa de recuperação ($3,2 \pm 2,3\%$ vs. $2,6 \pm 2,6\%$) de estruturas embrionárias das fêmeas bubalinas e bovinas após a lavagem do sistema genital.

Em prévio experimento, Baruselli et al. (2003) verificaram, em fêmeas bubalinas superovuladas, aumento na taxa de recuperação de estruturas embrionárias para os animais tratados anteriormente com rBST, resultado que, provavelmente, decorreu da melhor qualidade dos oócitos desses animais. Por outro lado, Carvalho et al. (2004) verificaram semelhantes taxas de recuperação de estruturas embrionárias dois e cinco dias após a primeira IA em búfalas superovuladas, sugerindo que não deve existir comprometimento no transporte dos oócitos pelo oviduto, mas sim na captação.

Tais resultados sugerem que o transporte de oócitos pelo oviduto de fêmeas bubalinas e bovinas independe da qualidade do oócito. Sabe-se que, à medida que o oócito é transportado através do oviduto, a matriz extracelular é perdida (Lam et al., 2000). Dessa forma, a capacidade de adesão das células da granulosa não deve influenciar o transporte dos gametas femininos do interior do infundíbulo ao local da fecundação.

O hormônio E₂ também não deve exercer nenhum efeito sobre o deslocamento dos oócitos nesse percurso. No Experimento 3, a elevada concentração de E₂ adicionada ao meio de cultura não interferiu no número ($1,3 \pm 0,4$ vs. $0,7 \pm 0,2$) e na taxa de recuperação ($29,8 \pm 9,0\%$ vs. $16,9 \pm 6,1\%$) de oócitos bubalinos e bovinos obtidos de ovidutos de fêmeas bubalinas e bovinas e cultivados *in vitro* ($P > 0,05$). Da mesma forma, no Experimento 4, o tratamento superovulatório – que eleva as concentrações plasmáticas de E₂, por aumentar o número de folículos potencialmente ovulatórios – não deve ter influenciado no transporte dos oócitos pelo oviduto das fêmeas bubalinas e bovinas, pois não foram encontradas diferenças no número ($0,3 \pm 0,2$ vs. $1,0 \pm 1,0$) e na taxa de recuperação ($2,9 \pm 2,1\%$ vs. $2,9 \pm 2,9\%$) de estruturas embrionárias entre os tratamentos para indução de ovulação única e de múltipla ovulação ($P > 0,05$).

Outra observação pertinente diz respeito à movimentação ciliar. Verificou-se que o hormônio E₂, *in vitro*, não influenciou na movimentação dos cílios das células endoteliais das três porções do oviduto (infundíbulo, ampola e istmo). Dessa forma, considerando-se apenas a movimentação ciliar nas porções do infundíbulo e da ampola, esse hormônio não prejudicaria o transporte dos oócitos do folículo em colapso à região da fecundação.

É possível que as elevadas concentrações de E₂ exerçam maior influência sobre o processo de captação e transporte do CCO da superfície do folículo em colapso para o interior do infundíbulo do que quando esse processo ocorre através do infundíbulo para a ampola do oviduto de búfalas.

Nas condições de realização dos presentes estudos, foram verificadas algumas prováveis causas para a baixa taxa de recuperação de estruturas embrionárias de búfalas submetidas aos protocolos de MOET. São elas:

- o maior número de folículos anovulatórios verificado nas búfalas superovuladas em relação às fêmeas



bovinas submetidas ao mesmo tratamento;

- a mais rígida ligação entre o ovário e o mesovário das búfalas em relação à ligação dessas estruturas nas bovinas;
- a maior espessura da musculatura lisa da porção do infundíbulo do oviduto das búfalas em relação ao das bovinas.

Novos estudos serão necessários para verificar se a melhoria na qualidade dos oócitos, o bloqueio dos receptores α -adrenérgicos do oviduto e/ou a diminuição da proporção E_2/P_4 podem proporcionar maior taxa de recuperação de estruturas embrionárias na espécie bubalina submetida ao protocolo de MOET.

Conclusões

- A baixa taxa de recuperação de oócitos verificada nas búfalas superovuladas não é ocasionada por diferenças na morfometria dos sistemas genitais entre as espécies bubalinas e bovinas com ovulações únicas ou múltiplas.
- A musculatura lisa do oviduto é mais espessa nas búfalas superovuladas que nas bovinas submetidas ao mesmo tratamento.
- A direção dos movimentos ciliares das células endoteliais dos ovidutos – verificada pelo deslocamento de microesferas colocadas sobre a superfície luminal do órgão – de fêmeas bubalinas e bovinas não é influenciada pela presença de E_2 no meio de cultura.
- O transporte *in vitro* de oócitos pelo oviduto de fêmeas bubalinas ou bovinas não é influenciado pela espécie do gameta feminino inserido nesse órgão ou pela presença de E_2 no meio de cultura.
- A taxa de recuperação de estruturas embrionárias de fêmeas bubalinas e bovinas não é influenciada pela espécie do gameta feminino inserido *in vivo* no oviduto desses animais ou pelo tratamento de indução de ovulações únicas ou múltiplas a que essas fêmeas foram submetidas.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo indispensável e oportuno auxílio concedido por meio da bolsa de Doutorado, processo 02/03245-0, e do auxílio à pesquisa 03/00798-0.

Referências bibliográficas

- Adams GP.** Control of ovarian follicular wave in cattle: implications for synchronization & superstimulation. *Theriogenology*, v.41, p.19-24, 1994.
- Ambrose JD, Singla SK, Sailkhani S, Prakash BS, Madan ML.** Superovulation response in buffaloes (*Bubalus bubalis*) to different treatment regimes of follitropin. *Theriogenology*, v.35, p.181, 1991. Abstract.
- Baruselli PS.** Basic requirements for artificial insemination and embryo transfer in buffaloes. *Buffalo J*, v.2, suppl. 2, p.53-60, 1994.
- Baruselli PS.** *Dinâmica folicular durante o ciclo estral e resposta superovulatória em fêmeas bubalinas (Bubalus bubalis)*. 1997. 96f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 1997.
- Baruselli PS, Amaral R, Barufi FB, Valentim R, Marques MO.** Lecirelin and Buserilin (Gonadotrophin releasing hormone agonists) are equally effective for fixed time insemination in buffalo. *Braz J Vet Res Anim Sci*, v.38, p.142-145, 2001a.
- Baruselli PS, Carvalho NAT, Cavalcante AKS, Nichi M, Zicarelli L.** Use of rBST associated to a protocol for multiple ovulation and embryo transfer in buffalo (*Bubalus bubalis*). In: Congresso Nazionale Sull'Allevamento del Buffalo, 2, 2003, Roma. *Proceedings...* Rome: CNAB, 2003. v.1, p.269-273.
- Baruselli PS, Carvalho NAT, Reichert RH, Henriquez CEP, Nichi M.** Pre-synchronization with GnRH 7 days before ovsynch protocol for timed insemination in buffalo. In: Buffalo Symposium of Americas, 1, 2002, Belém. *Proceedings...* Belém: BSA, 2002a. p.414-417.
- Baruselli PS, Madureira EH, Barnabe VH, Barnabe RC, Berber RCA, Amaral R.** Timed insemination using synchronization of ovulation in buffalo. In: International Congress on Animal Reproduction, 14, 2000, Stockholm. *Proceedings...* Stockholm: ICAR, 2000a. v.2, p.14-18.
- Baruselli PS, Madureira EH, Braga DPAF, Porto Filho RM, Carvalho NAT, Franzolin R.** GnRH injection effect on ovulation rates in superovulated buffalo. *Rev Bras Reprod Anim*, v.25, p.549-552, 2001b.
- Baruselli PS, Madureira EH, Marques MO, Rodrigues CA, Nasser LFT, Silva RCP, Reis EL, Sá Filho MF.** Efeito do tratamento com eCG na taxa de concepção de vacas nelore com diferentes escores de condição corporal inseminadas em tempo fixo (análise retrospectiva). *Acta Sci Vet*, v.32, supl., p.228, 2004.
- Baruselli PS, Madureira EH, Visintin JÁ, Barnabe VH, Barnabe RC, Amaral R.** Inseminação artificial em



- tempo fixo com sincronização da ovulação em bubalinos. *Rev Bras Reprod Anim*, v.23, p.360-362, 1999a.
- Baruselli PS, Madureira EH, Visintin JA, Ohashi OM, Souza JS, Parmeggiani A, Campanile G, Zicarelli L.** Follicular dynamics and embryo recovery rate in superovulated buffalo. *Arq Fac Vet UFRGS*, v.27, supl., p.200, 1999b. Abstract.
- Baruselli PS, Madureira EH, Visintin JA, Porto Filho RM, Carvalho NAT, Campanile G, Zicarelli L.** Failure oocyte entry into oviduct in superovulated buffalo. *Theriogenology*, v.53, p.491, 2000b. Abstract.
- Baruselli PS, Marques MO, Arruda RP, Carvalho NAT, Oliveira CA.** Plasma estradiol and progesterone concentrations in superovulated buffalo in presence of CIDR-B devices. *Theriogenology*, v.57, p.761, 2002b. Abstract.
- Baruselli PS, Mucciolo RG, Arruda RP, Madureira EH, Amaral R, Assumpção MEOA.** Embryo recovery rate in superovulated buffalo. *Theriogenology*, v.51, p.401, 1999c. Abstract.
- Batra SK, Pandey RS.** LH and oestradiol-17 β in blood plasma and milk during the oestrous cycle and early pregnancy in Murrah buffaloes. *Anim Reprod Sci*, v.5, p.247-257, 1983.
- Beg MA, Sanwal PC, Yadav MC.** Ovarian response and endocrine changes in buffalo superovulated at midluteal and late luteal stage of the estrous cycle: a preliminary report. *Theriogenology*, v.47, p.423-432, 1997.
- Bellve AR, McDonald MF.** Directional flow of fallopian tube secretion in the ewe at onset of the breeding season. *J Reprod Fertil*, v.22, p.147-149, 1970.
- Bellve AR, McDonald MF.** Directional flow of fallopian tube secretion in the Romney ewe. *J Reprod Fertil*, v.15, p.357-364, 1968.
- Black DL, Asdell SA.** Transport through the rabbit oviduct. *Am J Physiol*, v.192, p.63-68, 1958.
- Bó GA, Baruselli PS, Moreno D, Cutaia L, Caccia M, Tribulo R, Tribulo H, Mapletoft RJ.** The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology*, v.57, p.53-72, 2002.
- Boland MP, Goulding D, Roche JF.** Alternative gonadotrophins for superovulation in cattle. *Theriogenology*, v.35, p.5-17, 1991.
- Carvalho NAT, Baruselli PS, Zicarelli L, Madureira EH, Visintin JA, D'Occhio MJ.** Control of ovulation with GnRH agonist subsequent to superovulation of follicular growth in buffalo: fertilization and embryo recovery. *Theriogenology*, v.58, p.1641-1650, 2002.
- Carvalho NAT, Zicarelli L, Cavalcante AKS, Nichi M, Baruselli PS.** Embryo recovery rate in buffalo female according to the day of flushing. In: World Buffalo Congress, 7, 2004, Manila. *Proceedings...* Manila: WBC, 2004. v.2, p.756-757.
- Cushman RA, De Souza JC, Hedgpeth VS, Britt JH.** Superovulatory response of one ovary is related to the micro and macroscopic population of follicle in the contralateral ovary of the cow. *Biol Reprod*, v.60, p.349-354, 1999.
- Drost M, Wright Júnior JM, Cripe WS, Richter AR.** Embryo transfer in water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*, v.20, p.549-585, 1983.
- Food and Agriculture Organization.** Agriculture data. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/569/DesktopDefault.aspx?PageID=569>. Acesso em: 25 fev. 2011.
- Gasparrini B.** In vitro embryo production in buffalo species: state of the art. *Theriogenology*, v.57, p.237-256, 2002.
- Hafez ESE, Hafez B.** *Reprodução animal*. 7. ed. São Paulo: Manole, 2004. 513p.
- Hunter RHF.** *The fallopian tubes: their role in fertility and infertility*. Berlin: Springer-Verlag, 1988. 185p.
- Lam X, Gieseke C, Knoll M, Talbot P.** Assay and importance of adhesive interaction between hamster (*Mesocricetus auratus*) oocyte-cumulus complexes and the oviductal epithelium. *Biol Reprod*, v.62, p.579-588, 2000.
- Madan ML, Das SK, Palta P.** Application of reproductive technology to buffaloes. *Anim Reprod Sci*, v.42, p.299-306, 1996.
- Misra AK, Joshi BV, Agrawala PL, Kasiraj R, Sivaiah S, Rangareddi NS, Siddiqui MU.** Multiple ovulation and embryo transfer in indian buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*, v.33, p.1131-1141, 1990.
- Misra AK, Kasiraj R, Mutha Rao M, Ranga Reddy NS, Jaiswal RS, Pant HC.** Rate of transport and development of preimplantation embryo in the superovulated buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*, v.50, p.637-649, 1998.
- Misra AK, Kasiraj R, Mutha Rao M, Ranga Reddy NS, Joshi BV.** Embryo transfer in buffalo in Índia: progress in the last five years. In: World Buffalo Congress, 4., 1994. São Paulo. *Proceedings...* v.3, p.501-503.
- Prakash BS, Jaikhani S, Singla SK, Madan ML.** Application of a sensitive, heterologous enzymeimmunoassay for progesterone determination in unextracted buffalo plasma samples collected in na embryo transfer experiment. *Anim Reprod Sci*, v.27, p.67-74, 1992.
- Rouillier P, Guilbault LA, Lussier JG, Matton G.** Changes in morphological appearance and functional capacity of recruited follicles in cows treated with FSH in the presence of absence of a dominant follicle. *Theriogenology*, v.46, p.1053-1061, 1996.



- Sane CR, Kaikini AS, Seshpande BR, Koranne GS, Desai VG.** Study of biometry of genitalia of the Murrah buffalo-cows (*Bos bubalis*). *Indian Vet J*, v.41, p.653-661, 1964.
- Schallenberger E, Wagner HG, Papa R, Hartl P, Tenhumberg H.** Endocrinological evaluation of the induction of superovulation with PMSG in water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*, v.34, p.379-392, 1990.
- Talbot P, Di Carlantonio G.** The oocyte-cumulus complex: ultrastructure of the extracellular components in hamsters and mice. *Gamete Res*, v.10, p.127-142, 1984.
- Talbot P, Geiske C, Knoll M.** Oocyte pickup by the mammalian oviduct. *Mol Biol Cell*, v.10, p.5-8, 1999.
- Talbot P, Shur BD, Myles DG.** Cell adhesion and fertilization: steps in oocyte transport, sperm-zona pellucida interactions, and sperm-egg fusion. *Biol Reprod*, v.68, p.1-9, 2003.
- Taneja M, Singh G, Totey SM, Ali A.** Follicular dynamics in water buffalo superovulated in presence or absence of a dominant follicle. *Theriogenology*, v.44, p.581-597, 1995a.
- Taneja M, Totey SM, Ali A.** Seasonal variation in follicular dynamics of superovulated Indian water buffalo. *Theriogenology*, v.43, p.451-464, 1995b.
- Zicarelli L.** Superovulatory response in buffalo bred in Italy. *Bubalus bubalis*, v.4, suppl., p.167-188, 1997.
- Zicarelli L, Baruselli PS, Campanile G, Di Palo R, Gasparrini B, Neglia G, D'Occhio MJ.** Embryo recovery in buffalo with timed ovulation and insemination subsequent to follicle superstimulation. In: International Congress of Animal Reproduction, 14, 2000, Stockholm. *Proceedings...* Stockholm: ICAR, 2000. v.2, p.16-19.
- Zicarelli L, Boni R, Pacelli C, Esposito L, Spadetta M.** Superovulation in italian mediterranean buffaloes using FSH-P with diferent treatments. In: World Buffalo Congress, 4, 1994, São Paulo. *Proceedings...* São Paulo: WBC, 1994a. v.3, p.462-464.
- Zicarelli L, Di Palo R, Campanile G, Boni R, Langella M.** RBST+FSH-P in superovulatory treatment of Italian mediterranean buffaloes. In: World Buffalo Congress, 4., 1994, São Paulo. *Proceedings...* São Paulo: WBC, 1994b. v.3, p.459-461.
-