

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS BOTUCATU – SP

**PRODUÇÃO DE OÓCITOS E EMBRIÕES BUBALINOS: EFEITOS
DA ÉPOCA DO ANO E DA ADIÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE
Lippia origanoides NA MATURAÇÃO *IN VITRO***

EMÍLIO CÉSAR MARTINS PEREIRA

Botucatu, São Paulo

Agosto de 2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS BOTUCATU-SP

**PRODUÇÃO DE OÓCITOS E EMBRIÕES BUBALINOS: EFEITOS
DA ÉPOCA DO ANO E DA ADIÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE
Lippia origanoides NA MATURAÇÃO *IN VITRO***

EMÍLIO CÉSAR MARTINS PEREIRA

Tese apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Animal da FMVZ – UNESP – Botucatu para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eunice Oba

Co-orientador: Prof. Dr. Álan Maia Borges

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TEC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Pereira, Emílio César Martins.

Produção de oócitos e embriões bubalinos : efeitos da época do ano e da adição de óleo essencial de Lippia origanoides na maturação in vitro / Emílio César Martins Pereira. - Botucatu, 2015

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Eunice Oba

Coorientador: Álan Maia Borges

Capes: 50504002

1. Búfalo - Embrião. 2. Técnicas de maturação in vitro de oócitos. 3. Plantas oleaginosas. 4. Essências e óleos essenciais - Uso terapêutico. 5. Reprodução animal.

Palavras-chave: Búfalos; Doadoras de oócitos; Lippia origanoides; Maturação nuclear e citoplasmática de oócitos; Plantas oleaginosas de embriões.

Autor: Emílio César Martins Pereira

Título: PRODUÇÃO DE OÓCITOS E EMBRIÕES BUBALINOS: EFEITOS DA ÉPOCA DO ANO E DA ADIÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia origanoides* NA MATURAÇÃO *IN VITRO*

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Eunice Oba

Orientadora e Presidente

Depto. Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ-UNESP-Botucatu

Profa. Dra. Fernanda da Cruz Landim

Membro

Depto. Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ-UNESP-Botucatu

Profa. Dra. Fabiana Ferreira de Souza

Depto. Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ-UNESP-Botucatu

.

Prof. Dr. Luiz Sérgio de Almeida Camargo

Laboratório de Reprodução Animal

Embrapa Gado de Leite/Juiz de Fora

Prof. Dr. Moysés dos Santos Miranda

Depto. De Biologia/Instituto de Ciências Biológicas

Universidade Federal do Pará - Bélem

Data da defesa: 25 de Agosto de 2015.

DEDICATÓRIA

*A todas as pessoas que
estiveram do meu lado e não
mediram esforços para a
realização deste trabalho.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre me guiar nos melhores caminhos e me dar força nos momentos de fraqueza;

Aos meus pais, José Maurício e Maria José, por não medirem esforços para minha educação e formação profissional e pessoal, me aconselhando e apoiando em todas minhas decisões. Ao meu irmão, José Maurício, pelo incentivo e amizade;

À minha namorada e companheira, Tatiana, pela paciência, compreensão, carinho e auxílio em todos momentos que precisei, além da grande ajuda nas análises estatísticas;

À orientadora Professora Eunice Oba, por me conceber a oportunidade de sua orientação, pela confiança, acreditar na pesquisa proposta, e por não medir esforços para concretização deste projeto;

Ao Prof. Álan Borges, pela amizade e oportunidade em trabalharmos em conjunto, abrindo as portas do seu laboratório e apoiando em tudo que precisava; ao Prof. Marc Henry, por acreditar no projeto e ceder as búfalas do Centro de Biotecnologia em Bubalincultura da UFMG para a realização do trabalho;

Ao Prof. Moysés Miranda pelo auxílio na elaboração do projeto, prestatividade sempre que precisei e acreditar na pesquisa proposta, além de ceder gentilmente amostra do óleo de Lippia para a realização do experimento;

Aos Prof. Sony Bicudo, por conselhos, sugestões e conversas, à Prof. Fernanda Landim por sugestões, esclarecimento das dúvidas e ceder o material para alguns testes; Aos professores Luiz Sérgio, Fabiana Ferreira, pela gentileza em participar da banca examinadora e contribuir para melhoria da minha Tese de Doutorado; Ao Prof. Eduardo Paulino por contribuir com minha formação acadêmica e encaminhar minha ida para Botucatu;

A Eliane Beatriz, técnica do laboratório, profissional exemplar, que esteve auxiliando em todos momentos e etapas experimentais e por ensinar tudo sobre o laboratório de PIVE. Eliane, sua ajuda foi essencial para a realização deste trabalho, muito obrigado!

Ao meu amigo João Gabriel, pela amizade, apoio, auxílio com ideias e nas avaliações finais deste experimento. Ao amigo Gian, pelos ensinamentos no começo da caminhada

da reprodução animal, amizade e palavras de incentivo e apoio. A Nat, amiga, pelo companherismo, amizade e ajuda sempre que precisei. Ao Carlim, meu grande amigo, pela boa vontade em ajudar e pelo auxílio nas leituras das lâminas no microscópio de fluorescência. À todos outros colegas de pós-graduação, orientandos do Prof. Alan; Carol, Clarice, Telma e do Prof. Marc; Pat, Jaci, Guilherme, Bia, Mayara, Camila que sempre ajudaram quando podiam, principalmente durante as aspirações das búfalas;

À Mayara e Mariane da UFU, que auxiliaram na leitura das lâminas e na utilização do Microscópio confocal;

Aos estagiários e grandes companheiros Virgilim e Marquim, que sempre me auxiliaram em tudo que precisei e estavam dispostos a me ajudar a qualquer hora. Obrigado pela amizade e ajuda de vocês, sem vocês não daria certo! A todos outros estagiários do Laboratório (Barbára V., Bárbara C. Gabriela, Raquel, Yuri) por estarem sempre dispostos a ajudar no laboratório.

Aos funcionários da Centro de Biotecnologia de Bubalinos, em especial o Marcelino e Sorín, pela prestatividade em ajudar com o manejo das búfalas;

Aos colegas e amigos que fiz em Botucatu, dentre eles o Gabriel Carioca, pelas companhias nas viagens e o Campo, Geovane, Daniel Figura e Jair pela receptividade de me acolher em suas casas, pela amizade e descontração; À Elisa e a Marianne, por me representarem e auxiliarem em tudo que precisei enquanto estava longe.

Ao frigorífico Plena, em nome da médica veterinária Sandra e do Roni, pela receptividade e atenção para que não perdesse nenhum ovário de búfala. Ao Frigorífico Santa Vitória, em especial a Edvina, pelo auxílio na coleta dos ovários, tornado o trabalho mais fácil;

A UNESP, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP/Botucatu, curso de pós graduação, por contribuir para minha formação profissional;

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos;

Aos animais, fruto da razão de todo este trabalho;

A todos, que eventualmente posso ter esquecido, mas que auxiliaram em alguma das etapas experimentais e contribuíram para execução destes experimentos. Muito obrigado, sem vocês, com certeza, eu não conseguiria fazer este trabalho!

LISTA DE TABELAS

	Pág
 CAPÍTULO 1	
Tabela 1. Efeito de diferentes protocolos de sincronização da onda de crescimento folicular de doadoras de oócitos bubalinas sobre o número de folículos visualizados no ovário, taxa de recuperação, número de oócitos recuperados/animal e qualidade dos oócitos recuperados/animal através da OPU.....	56
Tabela 2. Efeito dos tratamentos de sincronização sobre o tamanho do folículo no momento da aspiração folicular guiada por ultrassom.....	56
Tabela 3. Comparação da fonte de obtenção dos ovários (Frigorífico x <i>Ovum Pick up</i>) sobre o número de folículos, taxa de recuperação, número e qualidade dos oócitos recuperados.....	57
 CAPÍTULO 2	
Tabela 1. Parâmetros Meteorológicos registrados durante os meses de Maio/14 à Maio/15 na região metropolitana de Belo Horizonte/MG.....	76
Tabela 2. Influência das diferentes épocas do ano sobre o número de folículos visualizados no ovário, taxa de recuperação, número de oócitos recuperados/animal e qualidade dos oócitos recuperados/animal através da OPU em bubalinos.....	76
Tabela 3. Influência das diferentes épocas do ano sobre o número de folículos visualizados no ovário, taxa de recuperação, número de oócitos recuperados/ovário e qualidade dos oócitos recuperados/ovário através de ovários bubalinos de frigorífico.....	77
Tabela 4. Efeito da época do ano sobre as taxas de clivagem e de blastocistos, % embriões no D7 e no D8 de bovinos e bubalinos.....	77
Tabela 5. Comparação entre a taxa de clivagem, % blastocistos no Dia 7 (D7), % blastocistos no Dia 8 (D8) e taxa de produção de embriões entre bovinos e búfalos.....	78
 CAPÍTULO 3	
Tabela 1. Padrão de distribuição das mitocôndrias e configuração cromossômica encontrada nos oócitos bovinos maturados em meios de maturação com diferentes concentrações do óleo de <i>Lippia origanoides</i>	100

Tabela 2. Estágio de maturação nuclear e citoplasmática de oócitos bovinos após adição de diferentes concentrações do óleo essencial de <i>Lippia origanoides</i> no meio de maturação <i>in vitro</i>	100
Tabela 3. Taxa de expansão do <i>cumulus</i> , taxa de clivagem e taxa de blastocistos bovinos após adição de diferentes concentrações do óleo essencial de <i>Lippia origanoides</i> no meio de maturação <i>in vitro</i>	101
Tabela 4. Efeito da adição de diferentes concentrações do óleo essencial de <i>Lippia origanoides</i> no meio de maturação sobre os parâmetros relacionados a produção <i>in vitro</i> de embriões bubalinos.....	101
Tabela 5. Efeito da adição de diferentes concentrações do óleo essencial de <i>Lippia origanoides</i> no meio de maturação sobre a qualidade dos blastocistos bubalinos analisada pelo número total de células e taxas de células apoptóticas.....	102

LISTA DE FIGURAS

	Pág
CAPÍTULO 2	
Figura 1. Demonstração da variação das horas de luz de Maio/2014 à Maio/2015. Época desfavorável (Outubro a Fevereiro), Período de Transição (Julho a Setembro), Período Favorável (Março a Junho).....	77
CAPÍTULO 3	
Figura 1. Imagens de microscopia confocal do plano equatorial dos oócitos bovinos mostrando o padrão de distribuição citoplasmática das mitocôndrias marcadas com o MitoTracker Orange CMTM Ros. (a) Padrão homogêneo em oócitos imaturos, (b) Distribuição periférica em oócitos maturados, (c) Padrão heterogêneo em oócitos maturados. (Aumento de 400x).....	103
Figura 2. Imagens representativas da microscopia de fluorescência demonstrando oócitos na fase de Metáfase II. (a) Marcação da cromatina com DAPI, diferenciando os cromossomos condensados (seta amarela) e a extrusão do corpúsculo polar (seta vermelha), (b) Padrão de distribuição das mitocôndrias no interior do ooplasma, (c) Overlay das imagens. (Aumento de 400x).....	104
Figura 3. Visualização em microscópio de fluorescência de blastocistos bubalinos produzidos <i>in vitro</i> corados com DAPI e TUNEL. (a) Contagem dos núcleos celulares marcados com DAPI; (b) Marcação das células apoptóticas (círculos vermelhos) com o TUNEL (Aumento de 400x).....	105
Figura 4. Concentração de peróxido de hidrogênio (ng/mL) mensurada no meio de maturação com diferentes concentrações de óleo essencial de <i>Lippia origanoides</i> em bovinos (A) e em bubalinos (B).....	105

SUMÁRIO

RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
INTRODUÇÃO.....	1
REVISÃO DE LITERATURA.....	2
1. Produção <i>in vitro</i> de embriões em búfalos.....	2
1.1 Recuperação oocitária.....	3
1.1.a. Efeito da sazonalidade sobre a PIVE bubalinos.....	5
1.1.b. Protocolos de sincronização da onda folicular de doadoras bubalinas.....	6
2. Maturação Oocitária.....	7
2.1 Maturação Nuclear.....	8
2.2. Maturação Citoplasmática.....	9
2.3 Competência oocitária.....	10
2.4. Métodos de avaliação da qualidade oocitária.....	13
3. Estresse Oxidativo.....	16
3.1 Uso de antioxidantes nos meios de PIVE.....	17
3.1.1 <i>Lippia origanoides</i>	17
4. Parâmetros para avaliação da qualidade embrionária	18
BIBLIOGRAFIA	21
HIPÓTESE.....	35
OBJETIVOS.....	35
CAPÍTULO 1 – Eficiência da sincronização do crescimento da onda folicular na produção de oócitos de bubalinos.....	37
CAPÍTULO 2 - Efeito da sazonalidade sobre a qualidade e disponibilidade dos oócitos e produção <i>in vitro</i> de embriões bubalinos em clima tropical.....	58
CAPÍTULO 3 -. Maturação <i>in vitro</i> de oócitos bovinos e bubalinos com meio suplementado com óleo essencial de <i>Lippia origanoides</i> e seu efeito sobre o desenvolvimento embrionário.....	79
CONCLUSÕES GERAIS.....	106
ANEXOS.....	107

RESUMO

PEREIRA, E.C.M. **Produção de oócitos e embriões bubalinos: efeitos da época do ano e da adição de óleo essencial de *Lippia origanoides* na maturação *in vitro***. Botucatu, 2015, 140p. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista- UNESP.

Esta pesquisa pretendeu estabelecer estratégias para aumentar a eficiência da produção *in vitro* de embriões (PIVE) bubalinos. Neste contexto, avaliou a eficiência de protocolos de sincronização de doadoras de oócitos bubalinas visando aumentar a disponibilidade e qualidade dos oócitos obtidos pela aspiração folicular guiada por ultrassom (OPU) e o efeito da fonte de obtenção dos oócitos sobre a quantidade e qualidade dos mesmos. Além disso, analisou-se o efeito do fotoperíodo sobre a quantidade e qualidade dos oócitos disponíveis, além da competência destes expressos pelas taxas de PIVE. Por fim, avaliou-se o efeito da adição do óleo essencial de *Lippia origanoides* (OELO) nas concentrações de 2,5; 5,0 e 10µg/mL, no meio de maturação *in vitro* (MIV) sobre as taxas de maturação oocitária, qualidade embrionária e PIVE em bovinos e bubalinos. Ovários e oócitos de animais não protocolados, protocolados por aspiração prévia dos folículos e protocolados com uso de hormônios esteróides e gonadotróficos, foram avaliados ultrassonograficamente e de acordo com a qualidade dos oócitos recolhidos por OPU. Demonstrou-se não haver variação na população folicular, no número e na qualidade dos oócitos recuperados por sessão, exceto uma redução dos folículos e oócitos Grau A foi notada quando o ciclo estral foi sincronizado por aspiração prévia dos folículos($p<0,05$). Em relação a fonte de obtenção, para todos parâmetros avaliados, foi notada superioridade quando oócitos são recuperados de ovários de frigorífico($p<0,05$). A qualidade dos oócitos recolhidos por OPU e a PIVE bubalinos foi influenciada pelo fotoperíodo na região estudada, elevando-se durante os meses de baixa luminosidade($p<0,05$), fato não observado em bovinos. Por fim, a partir de avaliações da cromatina com DAPI, encontrou-se uma elevação da taxa de maturação nuclear em bovinos quando utilizou-se concentrações de 2,5µg/mL de OELO($p<0,05$). A qualidade dos embriões, expressa pelo número de células, aumentou quando utilizou-se concentrações de 2,5 e 5µg/mL do OELO em bubalinos($p<0,05$). Embora não tenha alterado a taxa final de PIVE em ambas as espécies, o OELO apresentou boas perspectivas quando acrescido aos meios MIV em razão da melhoria da qualidade embrionária e da maturação nuclear dos oócitos.

Palavras-chave: doadoras de oócitos, maturação nuclear e citoplasmática, *Lippia origanoides*, PIVE, búfalos.

ABSTRACT

PEREIRA, E.C.M. **Production of buffalo oocytes and embryos: effects of season and the addition of essential oil of *Lippia origanoides* on *in vitro* maturation.** Botucatu, 2015, 140p. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista- UNESP.

This study aimed to develop strategies to increase the efficiency of buffalo *in vitro* embryo production (IVEP). In this context, we evaluated the efficiency of synchronization protocols on buffalo oocyte donor aimed at increasing the availability and quality of oocytes obtained by ovum pick-up (OPU) and the effect of the source of obtaining oocytes on the quantity and quality. In addition, we analyzed the effect of photoperiod on the quantity and quality of oocytes available on ovary, beyond the competence of those expressed by the blastocyst rate. Finally, we evaluate the effect of essential oil of *Lippia origanoides* (EOLO) added at concentrations of 2.5, 5.0 and 10µg/ml, on *in vitro* maturation (IVM) media over oocyte maturation rate, embryo quality and IVEP on cattle and buffalo. Ovaries and oocytes of animals without protocol, protocol by prior aspiration of follicles and protocol with use of steroids and gonadotropic hormones were evaluated by ultrasonography and according to the of oocyte quality. It was demonstrated not vary the follicular population, number and quality of oocytes retrieved per session between the protocols but a reduction of follicles and Grade A oocytes was noted when the follicles were aspirated previously OPU. Regarding the oocyte source (live animals and abattoir ovaries), all evaluated parameters showed superiority when oocytes were derived from abattoir ovaries. The quality of oocytes collected by OPU and IVEP buffaloes was influenced by photoperiod in the region studied, increased when daylight decreases, which was not observed in cattle. Finally, from evaluations of chromatin stained with DAPI, it was found that bovine nuclear maturation rate increased when used concentrations of 2,5µg/ml EOLO. The quality of oocytes, expressed by cell number, increased when used concentrations of 2.5 and 5µg/ml of EOLO in buffaloes. Although it has not changed the blastocyst rate of PIVE in both species, the EOLO has good prospects when added to IVM media.

Keywords: Oocyte donor, nuclear and cytoplasmatic maturation, *Lippia origanoides*, IVEP, buffaloes.

INTRODUÇÃO

Assim como em outras espécies, a aplicação de biotecnologias da reprodução em bubalinos representa uma alternativa viável para multiplicação de material de alto mérito genético em reduzido intervalo de tempo. Estas biotécnicas representam uma alternativa concreta de melhoria dos índices reprodutivos e produtivos encontrados nos rebanhos bubalinos, visto que estes animais apresentam algumas limitações representadas pela manifestação discreta dos sinais de estro, puberdade tardia, longo anestro pós-parto, baixas taxas de concepção e influência da sazonalidade, afetando negativamente a produtividade dos mesmos (NANDI et al. 2002; DROST, 2007; KHAKI et al. 2014).

Dentre as biotecnologias reprodutivas, a produção *in vitro* de embriões (PIVE) ganha relevância, uma vez que a transferência de embriões *in vivo* (TE) a partir de programas de superovulação (SOV) não são eficientes em bubalinos (LIANG et al. 2007). Assegura-se que a ineficiência da TE em bubalinos, quando comparada a bovinos, está ligada a falhas nos protocolos de superovulação a base de FSH, devido à baixa população de folículos recrutáveis (DROST, 2007), e falhas na captação dos oócitos pelas fimbrias do infundíbulo na superfície ovariana (MISRA et al., 1998; CARVALHO et al., 2011). Assim, a PIVE, que é parte integrante de outras biotecnologias como clonagem, transgenia, sexagem de embriões, injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) e produção de células tronco embrionárias, representa uma alternativa mais atrativa para aplicação científica, e principalmente comercial em bubalinos (NANDI et al. 2002; ELAMARAM et al. 2012).

Entretanto, embora a PIVE possa ser realizada com algum sucesso em bubalinos, apresentando taxas de maturação *in vitro* (MIV), fecundação *in vitro* (FIV) e clivagem satisfatórias, e inclusive com relato de nascimento de animais clonados (SAHA et al. 2013), nestes animais esta técnica apresenta baixas taxas de produção de blastocistos e nascidos após a transferência dos embriões (LIANG et al. 2007; LIANG et al. 2008; ANAND et al. 2008). Essa situação inviabiliza a utilização desta biotecnologia em larga escala. Diante disso, a obtenção de melhores resultados e a consolidação da técnica implicaria a possibilidade de produção de embriões bubalinos em escala comercial, visto que a combinação SOV-TE nesta espécie não permite grandes resultados.

Condições subótimas de cultivo (ELMARAM et al. 2012), efeito da sazonalidade (Di FRANCESCO et al. 2012) e a qualidade e quantidade de oócitos bubalinos recuperados e remetidos para PIVE (NANDI et al. 2002) são alguns dos fatores apontados

para justificar as baixas taxas de embriões produzidos em búfalas. Diante deste cenário, protocolos hormonais utilizando gonadotrofinas e alteração da frequência das sessões de aspiração folicular têm sido propostos visando aumentar a disponibilidade de oócitos de boa qualidade para o procedimento de PIVE (PROMDIREG et al. 2005), tentando minimizar o efeito da sazonalidade sobre esta biotécnica. Além disso, a necessidade de desenvolvimento de meios de maturação e sistemas de cultivo mais eficientes para melhoria da produção embrionária, específicos para búfalos, se torna cada vez mais pertinente (GASPARRINI et al. 2007). Por conseguinte, a suplementação do meio de maturação com diferentes substâncias, como fatores de crescimento e antioxidantes, tem se tornado objeto de estudo de diversos pesquisadores (NANDI et al. 2003; PUROHIT et al. 2005; ANAND et al. 2008; SINGHAL et al. 2009) visando melhorar a eficiência do processo e definir condições ideais para PIVE em bubalinos.

Diante do pressuposto, esse trabalho se propôs a analisar a eficiência de protocolos destinados a doadoras bubalinas com intuito de aumentar a qualidade e quantidade dos oócitos recuperados na aspiração folicular, determinar os parâmetros de produção *in vitro* de embriões bubalinos ao longo do ano, assim como avaliar o efeito da ação antioxidante do óleo essencial de *Lippia origanoides* no meio de maturação dos oócitos de búfalos e bovinos com intuito de melhorar as taxas de PIVE.

REVISÃO DE LITERATURA

1. Produção *in vitro* de embriões em búfalos

Com o benefício de acelerar o incremento genético no rebanho em reduzido espaço de tempo, a produção *in vitro* de embriões (PIVE) nos animais domésticos têm sido uma biotécnica da reprodução cada vez mais utilizada (DUSZEWSKA et al. 2012). Em bubalinos, não diferentemente, a PIVE também representa um mercado promissor e em ascensão, entretanto, limitações de natureza técnica como, por exemplo, a baixa produção de blastocistos e de nascidos, tem prejudicado a aplicação desta biotécnica em larga escala comercial (NANDI et al. 2002; DROST, 2007; GASPARRINI, 2007).

A PIVE em bubalinos, realizada pioneiramente por Manjud et al. (1988) e Singh et al. (1989) envolve diferentes etapas. Primeiramente ocorre a recuperação dos oócitos, que em bubalinos, pode ser realizada por dois métodos: a aspiração folicular guiada por ultrassonografia (do inglês, *ovum pick up* - OPU) e a recuperação dos oócitos a partir de ovários de animais de abatedouro. Em seguida são realizados os procedimentos de maturação *in vitro* (MIV), a fecundação *in vitro* (FIV) e cultivo embrionário *in vitro* (CIV)

(OBA et al. 2011). Estas etapas são influenciadas por diversos fatores, que vão desde elementos relacionados aos animais até condições de cultivo, meios e protocolos inerentes aos laboratórios (CAMARGO et al. 2006), que tem sido profundamente estudados visando otimizar os índices já obtidos. A grande diversidade de fatores que podem interferir justifica a elevada amplitude de resultados referentes às taxas de produções *in vitro* de embriões bubalinos encontrados na literatura.

Pela meta-análise de mais de mais de 100 trabalhos científicos, Suresh et al. (2009) encontraram taxas médias de MIV para bubalinos em torno de $78,36 \pm 2,16\%$, taxas de clivagens de aproximadamente $52,14 \pm 1,15\%$ e taxas finais de produção de embriões bubalinos de $22,14 \pm 2,17\%$. Estes dados demonstram que aproximadamente 80% dos oócitos obtidos das búfalas falham em alguma etapa do desenvolvimento *in vitro* até o estágio de blastocisto (NANDI et al. 2002). Assim, apesar de apresentarem taxas de MIV e clivagem satisfatórias, as taxas de PIVE em bubalinos ainda necessitam ser melhoradas.

As baixas taxas de desenvolvimento embrionário em bubalinos ocorrem não somente em razão das condições intrínsecas dos oócitos, relacionados à doadora, mas também devido às condições extrínsecas de cultivo e manipulação (SURRESH et al. 2009), que na maioria das vezes seguem os parâmetros bovinos. Notadamente, por serem reproduzidas identicamente aos tradicionais sistemas de PIVE em bovinos (GASPARRINI et al. 2007), as condições de PIVE bubalinos não atendem as premissas individuais da espécie. Consequentemente, algumas particularidades próprias dos bubalinos, como menor tempo para completar a maturação oocitária (NEGLIA et al. 2001) e desenvolvimento mais rápido dos embriões (BARKAWI et al. 2007), não são consideradas. Diante disso, o entendimento de todo processo de PIVE em bubalinos se faz extremamente necessário para determinação das condições ideais para estes animais.

1.1 Recuperação oocitária

Apesar da discreta melhoria dos sistemas de produção de embriões nos últimos anos, levando a uma ligeira elevação das taxas de PIVE (GASPARINI et al. 2006) assim como de nascidos (SALIBA et al. 2011), a maior limitação para aplicação da técnica de da OPU, seguida da PIVE em bubalinos, tem sido a baixa taxa de recuperação dos oócitos viáveis. Alguns trabalhos citam que o número médio de estruturas recuperadas é de $2,3 \pm 0,1$ (DI FRANCESCO et al. 2012), $2,32 \pm 0,17$ (NEGLIA et al. 2011), $2,7 \pm 0,2$ (GASPARRINI et al. 2014), $4,85 \pm 0,28$ (DI FRANCESCO et al. 2011) e $5,0 \pm 0,5$

(SALIBA et al. 2011). Entretanto, independentemente do método de coleta, o número de oócitos viáveis recuperados, os quais serão remetidos para PIVE, dificilmente ultrapassa duas estruturas/doadora/sessão de OPU em bubalinos (GUPTA et al. 2006; MANJUNATHA et al. 2008, 2009; DI FRANCESCO et al. 2012), fazendo com que este se torne um grande limitante para o processo de PIVE em larga escala nestes animais. Esta limitação se torna ainda mais expressiva quando comparamos as médias de oócitos recuperados em doadoras bovinas, em torno de 23,35 estruturas de boa qualidade/doadora Nelore em rebanhos comerciais (PONTES et al. 2011).

Além da quantidade, a qualidade dos oócitos recuperados, é outro fator que afeta a eficiência da produção de embriões em búfalos, pois reduz o número de oócitos viáveis disponíveis para a PIVE. A porcentagem de COCs (complexos *cumulus*-oócito) de boa qualidade (grau A e grau B) recuperados é baixa comparado a outras espécies, e quase nunca ultrapassam 50% do número total de oócitos recuperados (GASPARRINI, 2007), sejam oriundos de ovários de frigorífico, ou da aspiração de animais *in vivo*. Estudos apontam taxas de 46,2% (RAGHU et al. 2002) e 42,75% (DI FRANCESCO et al. 2011) de oócitos de boa qualidade (grau A+B) a partir de oócitos obtidos de animais de frigorífico. Já na OPU, Di Francesco et al. (2012) encontraram média de 29,2% oócitos classificados como grau A recuperados ao longo do ano.

Em relação a fonte de obtenção, apesar de não ser expresso em maiores taxas de PIVE, demonstrou-se que oócitos bovinos coletados de abatedouro aparentam ter maior qualidade morfológica do que aqueles obtidos por OPU (MERTON et al. 2003). Considerando que esta diferença não ocorra em razão do equipamento ou meio de coleta, é hipotetizado que devido ao efeito *post-mortem*, os COCs de ovários de abatedouro se tornam menos aderidos a parede folicular, e conseqüentemente são coletados morfológicamente mais perfeitos. Este efeito é ainda mais exacerbado em bubalinos, devido a fraca adesão das células do cumulus (GASPARRINI, 2002). Esta hipótese foi comprovada nestes animais, na qual, dentre os oócitos de boa qualidade (grau A e B) coletados de ovários de abatedouro ou por aspiração folicular, 55% e 45% eram grau A quando oriundos de frigorífico e da OPU, respectivamente (NEGLIA et al. 2003).

A qualidade dos COCs na OPU pode ser afetada por vários fatores extrínsecos, como a pressão de aspiração, o tempo de coleta e processamento, a temperatura de transporte até o laboratório e a estação do ano (GASPARRINI, 2007). Entretanto, a alta incidência de atresia (PALTA et al. 1998), o reduzido número de folículos primordiais (DANELL, 1986) e antrais (KUMAR et al. 1997; NEGLIA et al. 2011) e a baixa

qualidade dos oócitos recuperados (DI FRANCESCO et al. 2012) são os principais motivos em bubalinos para recuperação de reduzido número de estruturas utilizáveis no procedimento de PIVE. Além dos fatores descritos, a redução de folículos disponíveis para a OPU e a população folicular de bubalinos é altamente influenciada por fatores ambientais, como a sazonalidade, que é marcante nos animais desta espécie (DI FRANCESCO et al. 2012).

1.1.a. Efeito da sazonalidade sobre a PIVE bubalinos

Bubalinos são considerados animais poliétricos sazonais de dias curtos, altamente influenciáveis pela duração de luminosidade dos dias, especialmente quando se encontram nas regiões subtropicais e temperadas, mais afastadas da linha do Equador. A nutrição é outro fator também importante na definição desta característica (MONTIEL-URDANETA et al. 1997). Assim, quando localizados em regiões onde não há variação do fotoperíodo, em razão das horas de luz do dia permanecerem constantes ao longo do ano, a maior influência sobre as condições reprodutivas destes animais é exercida pela disponibilidade de alimentos (ZICARELI, 1997; CAMPANILE et al. 2010). Contudo, em regiões como Sul e Sudeste do Brasil, onde existe considerável variação dos dias ao longo do ano, desde que tenham satisfatória disponibilidade de forragem, a atividade reprodutiva destes animais coincide exatamente com diminuição das horas do dia (GARCIA, 2006; VALE, 2007).

Analisando sobre o aspecto reprodutivo, a possibilidade de coleta de oócitos competentes durante a estação desfavorável para reprodução poderia permitir a melhor exploração do material genético (DI FRANCESCO et al. 2011). Todavia, a eficiência da utilização de biotecnologias reprodutivas nestes animais parece variar de acordo com a época do ano. Visando avaliar o efeito da estação do ano sobre a população folicular e a qualidade dos oócitos, Di Palo et al. (2001) constataram que ocorria uma diminuição tanto no número de folículos como de COCs durante a época desfavorável, caracterizada neste trabalho pelo intervalo primavera-verão, comparada a época favorável para reprodução, representada pelo intervalo inverno-primavera.

A influência da época do ano sobre a competência dos oócitos recuperados de ovários de frigorífico (DI FRANCESCO et al. 2011) e da OPU (DI FRANCESCO et al. 2012) foi avaliada em diferentes estações do ano em alguns estudos. Nestes pode-se notar que, embora não tenha ocorrido diferenças significativas em relação a qualidade dos oócitos recuperados, com exceção de oócitos degenerados e expandidos obtidos por OPU,

as taxas de clivagem e blastocistos foi maior durante o outono, que representa a época favorável a reprodução dos bubalinos, em comparação a outras épocas do ano. Diante disso, comprovou-se a maior competência dos oócitos bubalinos durante períodos de menor duração dos dias (DI FRANCESCO et al. 2011; DI FRANCESCO et al. 2012). Contrariamente, outro estudo constatou não haver diferença entre a qualidade, e as taxas de clivagem e de blastocistos durante os diferentes períodos do ano, e apenas o número absoluto de folículos, oócitos recuperados e embriões obtidos por sessão de OPU foram reduzidos durante a época desfavorável para reprodução (MANJUNATHA et al. 2009).

Diante disso, algumas estratégias como a seleção de doadoras com base na população folicular (SÁ FILHO et al. 2005) e tratamentos prévio dos animais, empregando principalmente gonadotrofinas, podem ser realizadas com intuito de promover uma maior taxa de recuperação de estruturas por sessão.

1.1.b. Protocolos de sincronização da onda folicular de doadoras bubalinas

O reduzido número de oócitos recuperados de doadoras bubalinas, muitas vezes, podem inviabilizar a PIVE, visto que o sucesso da atividade depende consideravelmente do número e principalmente da qualidade das estruturas recuperadas. Em razão desta limitação nestes animais, protocolos de sincronização com intuito de aumentar a quantidade e competência das estruturas recuperadas tem sido proposto em búfalas adultas (SÁ FILHO et al. 2009), pré-puberes (PRESICCE et al. 2002; TECHAKUMPHU et al. 2004) e em lactação (PROMDIREG et al. 2005).

Estes protocolos de estimulação hormonal, baseiam-se principalmente na utilização de gonadotrofinas visando aumentar a disponibilidade de folículos no dia da OPU. A administração do hormônio folículo estimulante (FSH) exógeno aumenta a disponibilidade de folículos antrais, dos oócitos coletados, da qualidade dos oócitos e consequentemente de embriões transferíveis por sessão de OPU (PROMDIREG et al. 2005). Além disso, o FSH parece auxiliar a recuperação de pequenos folículos saudáveis e folículos em início de atresia, por propiciar um apropriado ambiente para seu desenvolvimento (REIS et al. 2002). Techakumphu et al. (2004) demonstraram que novilhas bubalinas pré-puberes tratadas três dias consecutivos com FSH e recebendo GnRH no 3º dia de tratamento, aumentaram de $2,5 \pm 2,3$ para $6,6 \pm 3,6$ o número médio de folículos no dia da OPU, porém a qualidade e o número de estruturas recuperadas não foram alterados. Já Promdireg et al. (2005), trabalhando com búfalas que receberam FSH duas vezes ao dia durante três dias em doses descrentes, constataram um aumento do

número de folículos aspirados tanto nas fêmeas cíclicas como em lactantes, de $2,1 \pm 1,4$ para $7,2 \pm 3,7$ folículos e de $1,4 \pm 0,7$ para $9,0 \pm 3,2$ folículos, respectivamente.

A frequência de aspiração também tem efeito sobre a qualidade dos oócitos recuperados por alterar a dinâmica folicular. Aspirações realizadas duas vezes por semana resultam no aumento da frequência de ondas foliculares e proporcionam a aspiração de folículos que antes se tornariam atrésicos, aumentando a qualidade dos oócitos recuperados (GASPARRINI, 2007). Além disso, sessões de OPU com esta frequência contribuem para eliminação do folículo dominante e seu efeito prejudicial sobre os folículos recrutáveis, como já demonstrado em bovinos (MERTON et al. 2003). Trabalhando com búfalas do pântano e sem estímulo hormonal, Pavasuthipaisit et al. (1995) reportaram um maior número de folículos aspirados e oócitos recuperados quando a OPU foi realizada semanalmente em animais cíclicos e não cíclicos, pré-púberes e gestantes. Entretanto, outro estudo com bubalinos, apontou que apesar do número médio de folículos disponíveis não diferir quando as coletas foram feitas em intervalos de 2, 3 e 4 dias, observou-se uma diminuição de folículos pequenos e aumento de folículos grandes quando os intervalos entre as OPU foram semanais (7 dias) (PROMDIREG et al. 2005).

Contudo, apesar dos esforços na tentativa de elevar a disponibilidade de folículos para OPU, o número de estruturas recuperadas para posterior produção de embriões *in vitro* permanece muito aquém do esperado. Partindo da prerrogativa que o número de oócitos recuperados em bubalinos permanece baixo, esforços têm sido concentrados também na melhoria das condições de maturação, fertilização e cultivo embrionário *in vitro*, buscando elevar as taxas de PIVE até então obtidas.

2. Maturação Oocitária

Durante o procedimento de PIVE, a maturação *in vitro* dos oócitos representa uma das etapas mais desafiadoras, uma vez que a tradução dos genes durante este período irá determinar a eficiência de fertilização e a subsequente divisão embrionária, a qual levará a formação do blastocisto e o estabelecimento da gestação (LONERGAN et al. 2003; SOMFAI et al. 2011). Assim, a MIV realizada em condições subótimas poderá resultar em alterações irreversíveis na expressão gênica normal, afetando drasticamente o destino do desenvolvimento dos embriões produzidos *in vitro* (WATSON et al. 2000; JONES et al. 2008).

A maturação oocitária compreende uma série de eventos, tanto nucleares quando citoplasmáticos, que irão preparar o oócito para próxima etapa que é a fecundação

(GOTTARDI E MINGOTI, 2009). A maturação nuclear envolve a progressão do oócito desde o primeiro bloqueio meiótico na prófase I até o estágio de metáfase II (MII) ocorrendo durante esta progressão a quebra da vesícula germinativa (*vesicle germinal break down* – VGBD), condensação dos cromossomos, extrusão do primeiro corpúsculo polar e formação do segundo fuso meiótico (SIRARD et al. 2001). Similarmente, estas alterações ocorrem *in vivo* após o pico pré-ovulatório de hormônio luteinizante (LH) (DIELEMANN et al. 2002).

Já a maturação citoplasmática é um procedimento mais complexo e envolve várias alterações simultâneas que incluem a síntese de proteínas intracelulares (EDWARDS et al. 1997), aumento da glutatona intracitoplasmática (PAYTON et al. 2003a), redistribuição dos grânulos corticais (PAYTON et al. 2003b), reorganização dos microtúbulos (KIM et al. 2000) e migração e redistribuição das organelas dentro do citoplasma (ANGUITA et al. 2008).

Além de modificações citoplasmáticas e nucleares nos oócitos, alterações nas células do *cumulus oophorus* são igualmente notadas durante o processo de maturação oocitária. A expansão das células do *cumulus* compreende mudanças que vão desde a alteração da conformação das células, deixando de ser uma massa compacta para se tornar uma estrutura dispersa, até a síntese da matriz intercelular mucóide. Tais eventos são fundamentais para consolidação do estágio final de maturação (YOKO E SATO, 2004). Durante a expansão do *cumulus*, o ácido hialurônico mediado por receptores oocitários específicos induz a ativação de fatores promotores da maturação (*maturation promoting factors* - MPFs), resultando na VGBD (JAIN et al. 2012). Em bubalinos constatou-se que a expansão das células do *cumulus* inicia às 12 horas e vai até às 24 horas de MIV, e que durante este período, as camadas mais externas de células do *cumulus* tendem a se tornar mais redondas e brilhantes (JAIN et al. 2012).

2.1 Maturação Nuclear

O processo de maturação nuclear diz respeito a todos os eventos nucleares relacionados à progressão do oócito desde a prófase da primeira meiose (prófase I) até a metáfase II (MII), da segunda divisão meiótica. Todas estas etapas são reguladas por fatores presentes no fluido folicular, pela interação dos oócitos com as células foliculares e por fatores endócrinos, como as gonadotrofinas (KIM et al. 2008).

Inicialmente o oócito encontra-se retido no ambiente folicular em diplóteno da Prófase I, caracterizado pela presença da vesícula germinativa (VG) que é mantida pelas

altas concentrações de AMPc produzido pelas células da granulosa e transportado para o oócito através das junções *gap* (VAN DER HURK E ZAO, 2005). *In vivo* a elevação dos níveis de LH provoca uma súbita queda dos níveis de AMPc, seja pelo desacoplamento das junções *gap* entre oócitos e células da granulosa ou pela redução da síntese do próprio AMPc por estas células (KAWAMURA et al. 2004). Esta ação do LH é mediada pelo fator de crescimento epidermal (EGF), secretado pelas células murais da granulosa (GUIMARÃES, 2013). Consequentemente, o declínio do AMPc provoca uma desfosforilação e ativação do complexo fator promotor da maturação/meiose (MPF), que por sua vez está envolvido em vários eventos nucleares e citoplasmáticos relacionados a maturação oocitária (MILLAR E RUSSELL, 1992). *In vitro*, o restabelecimento da meiose se dá imediatamente após a retirada do oócito de dentro do ambiente folicular em decorrência da perda de contato entre o oócito e as células da granulosa (TOMAS et al. 2004).

As alterações nucleares nesta fase incluem a condensação dos cromossomos, o desaparecimento do nucléolo, a desintegração da membrana celular e o rompimento do envelope nuclear, caracterizando a VGBD. Em seguida, o oócito passa pelo estágio de diacinese, seguindo na metáfase I (MI), anáfase I (AI) e telófase (TI) e completando a primeira divisão meiótica. Na sequência, ocorre uma divisão assimétrica do citoplasma, originando uma célula menor, o corpúsculo polar, e outra maior, o oócito secundário (CAN et al. 2003). Os cromossomos homólogos então se separam em dois grupos, sendo que a metade do número original de cromossomos permanece alinhados no centro do fuso presente no oócito (célula haplóide) e a outra metade é incorporada ao corpúsculo polar (GOTARDI; MINGOTI, 2009). Estes eventos caracterizam o estágio de metáfase II (SIRARD et al. 1992) e a partir daí a meiose é prontamente interrompida, estágio denominado como segundo bloqueio meiótico. O reinício da meiose poderá ocorrer em decorrência da fecundação do espermatozoide ou por ativação partenogenética (GORDON, 1994).

2.2. Maturação Citoplasmática

Simultaneamente a maturação nuclear, o citoplasma dos oócitos necessita sofrer modificações que proporcionem a esta célula competência suficiente para garantir o sucesso na fecundação e no subsequente desenvolvimento embrionário. Assim, para a completa maturação do oócito é necessário que ocorra eventos intracelulares que incluem a redistribuição das organelas citoplasmáticas, acúmulo de RNA mensageiro, síntese de

proteínas e fatores de transcrição (FERREIRA et al. 2009). Embora sejam processos distintos, a maturação nuclear e citoplasmática são eventos interligados e em determinados momentos ocorrem simultaneamente, apesar da programação molecular do citoplasma ter início ainda na fase de crescimento do oócito (BREVINI-GANDOLFI E GANDOLFI, 2001).

Modificações ultraestruturais que ocorrem no oócito durante a maturação citoplasmática são necessárias para o bloqueio da poliespermia, para descondensar o núcleo do espermatozoide e formar o pró-núcleo masculino pós fecundação e sobretudo, para garantir o estoque de transcritos e proteínas do citoplasma do oócito na fase inicial de desenvolvimento embrionário até o estágio de oito/dezesseis células (PICKTON et al. 1998; FERREIRA et al. 2008). Após esta fase, o genoma embrionário é ativado, e a síntese de novas proteínas passa ser oriunda dos transcritos embrionários ao invés dos transcritos maternos. Este momento é denominado de transição materno zigótica (TMZ) (STITZEL E SEYDOUX, 2007). Portanto, para se garantir o sucesso do desenvolvimento embrionário é fundamental que todos eventos da maturação citoplasmática sejam realizados com excelência.

Em bubalinos, existem poucas descrições referentes às modificações que ocorrem durante a maturação citoplasmática dos oócitos. No entanto, ultra-estruturalmente pode-se constatar a migração das mitocôndrias, do retículo endoplasmático liso e rugoso e do complexo de Golgi para região cortical do oócito (MONDADORI et al. 2010). Além disso, este autor evidenciou a multiplicação e migração periférica dos grânulos corticais, alteração no aspecto morfológico da grande população de gotículas de lipídeos no ooplasma, aumento do espaço perivitelino perinuclear e diminuição gradativa do contato entre as células do *cumulus* e o oócito conforme a maturação *in vitro* dos oócitos bubalinos evolui.

2.3 Competência oocitária

A competência oocitária pode ser entendida como a capacidade do oócito de concluir todas as etapas da maturação nuclear e citoplasmática, ser fecundado, completar o desenvolvimento embrionário e dar origem ao feto (FERREIRA et al. 2009). Essa competência é adquirida ao longo do crescimento dos oócitos e está relacionada com as modificações nucleares e citoplasmáticas que ocorrem durante a fase final de desenvolvimento folicular e na maturação. Assim, para que o oócito se torne competente, o mesmo deverá ter completado toda sua fase de crescimento, que ocorre quando o oócito

alcança 120µm em bovinos (ADONA, 2002) e 145 µm em bubalinos (NANDI et al. 2002).

Avaliando-se os animais *in vivo* é possível estabelecer uma correlação entre o tamanho do folículo e a competência dos oócitos de bubalinos (YOUSAF E CHOCHAN, 2003). No entanto, independente da fonte de obtenção e condição de maturação dos oócitos (*in vivo* ou *in vitro*), é possível associar a aquisição da competência dos mesmos com o padrão de metilação (FAGUNDES et al., 2011) e a formação de estoque de RNA suficiente para produzir proteínas e manter a sobrevivência destes durante sua maturação e desenvolvimento embrionário inicial, até que o genoma embrionário seja ativado (WATSON, 2007). O desenvolvimento de mecanismos reguladores de cálcio, alterações na atividade do MPF e da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) e a redistribuição de organelas citoplasmáticas são outros eventos que estão intimamente ligados à aquisição de competência nos oócitos (ANGUITA et al. 2008).

A aquisição da competência oocitária em bubalinos pode ser influenciada por fatores tanto ambientais, como efeito da estação do ano e variações térmicas (NANDI et al. 2001; ZOHEIR et al. 2007; FRANCESCO et al. 2011; EL-NABY et al. 2013), quanto inerentes ao próprio animal, como presença de corpo lúteo nos ovários, tamanho do folículo, frequência de aspiração *in vivo*, número de camadas de células do *cumulus*, maturação *in vitro* ou *in vivo* e origem dos oócitos (SINGH et al. 2001; YOUSAF e CHOCHAN, 2003; WARRIACH e CHOCHAN, 2004; YINDEE et al. 2011; SHARMA et al. 2012; EL-NABY et al. 2013).

Em relação à temperatura ambiental, esta parece exercer efeito deletério sobre a quantidade de folículos disponíveis para aspiração e na qualidade dos oócitos recuperados nas búfalas (EL-NABY et al. 2013), influenciando na competência de desenvolvimento dos mesmos e refletindo diretamente na taxa de maturação (NANDI et al. 2001; ZOHEIR et al. 2007; EL-NABY et al. 2013), na taxa de clivagem e na produção de blastocistos *in vitro* (FRANCESCO et al. 2011).

A competência do oócito de bubalinos está diretamente ligada ao estado morfofuncional dos ovários. A aquisição de competência destes animais encontra-se dependente do tamanho do folículo da qual é obtido. Folículos maiores que 4mm são considerados em bubalinos ideais para obtenção de melhores resultados na produção *in vitro* de embriões (YOUSAF E CHOCHAN, 2003). A frequência da OPU também pode influenciar, uma vez que, oócitos obtidos a partir de seções de OPU duas vezes por

semana possuem maior capacidade de competência do que oócitos coletados semanalmente (YINDEE et al. 2011).

A fonte de obtenção dos oócitos em bubalinos é outro fator capaz de influenciar a aquisição da competência. Tendo em vista a origem do oócito, constatou-se que quando coletados de ovários de frigorífico os ovários possuem menor capacidade de se tornar um blastocisto do que quando coletados através da OPU (NEGLIA et al. 2003). Acredita-se que consecutivas aspirações acabam resultando em aumento da frequência das ondas foliculares, proporcionando obtenção de oócitos mais competentes (BONI et al. 1996). Possivelmente, por ser tratar de animais oriundo de descarte de rebanhos de produção de leite, o estado corporal e o nível de estresse destes animais constituem uma outra justificativa para este fato. Ainda sim, apesar de não saber a origem dos animais, Yindee et al. (2011) confirmaram não haver influência do estado reprodutivo dos animais (gestante ou não gestantes) na competência de desenvolvimento dos oócitos coletados. Comparando a maturação ocorrida dentro do ambiente folicular (*in vivo*) ou fora dele (*in vitro*), conclui-se que apesar de possuírem taxas semelhantes de maturação e clivagem, oócitos que completam a maturação *in vitro* refletem em menores taxas de produção de mórulas e blastocistos do que quando maturados *in vivo* (SHARMA et al. 2012).

Resultados relacionando à competência dos oócitos e a presença do corpo lúteo (CL) são ainda bem contraditórios em bubalinos. A presença de CL no ovário parece provocar a diminuição do número médio de oócitos disponíveis nos ovários de búfalas e na taxa de recuperação de oócitos de boa qualidade nestes ovários (SINGH et al. 2001; AMER et al. 2008). El-Naby et al. (2013) constataram um aumento significativo na taxa de maturação de oócitos obtidos a partir de ovários que não possuíam CL. Por outro lado, foi evidenciado que as taxas de clivagem e de produção de embriões foram superiores em ovários com presença de CL e sem a presença de folículo dominante (MANJUNATHA et al. 2007a).

Oócitos com camadas de células do *cumulus* intactas (>3 camadas) apresentaram maiores taxas de MIV do que oócitos sem células do *cumulus* (WARRIACH e CHOHAN 2004; AMER et al. 2008). Estes autores ainda sugerem que o co-cultivo de oócitos de pobre qualidade com células do *cumulus* representa uma alternativa para promover o aumento da competência oocitária.

No entanto, em bubalinos ainda persistem muitas dúvidas se as falhas na aquisição da competência dos oócitos maturados *in vitro* são inerentes somente aos oócitos ou também a inadequados sistemas de cultivo utilizados (NANDI et al. 2002).

2.4. Métodos de avaliação da qualidade oocitária

Cada vez mais tem se confirmado que o sucesso da PIVE está intimamente relacionada à qualidade do oócito e a capacidade do meio de maturação em fornecer a ele as condições necessárias para seu desenvolvimento (SEKHAR et al. 2012). Portanto, a fim de determinar a eficiência do meio de MIV e a capacidade de desenvolvimento do oócito até o estágio de blastocisto é fundamental uma avaliação rápida e confiável tanto de oócitos imaturos previamente a MIV quanto do grau de maturação destes após esta etapa.

A avaliação do oócito imaturo é rotineiramente baseada no grau de compactação das células do cumulus e na homogeneidade do ooplasma (CHAUHAN et al. 1998), embora, muitos oócitos com morfologia aparentemente normal possam estar no estágio inicial de degeneração (MANJUNATHA et al. 2007). Métodos não invasivos e seguros, como a utilização do azul cresil brilhante (ACB), é capaz de identificar a competência do oócito imaturo pela identificação de enzimas intracelulares ativas e têm sido testados com sucesso em bubalinos (Manjunatha et al. 2007). Este método é capaz de identificar antes da MIV, pela diferença de coloração, oócitos mais competentes que poderiam ser selecionados para obtenção de maiores taxas de produção blastocistos bubalinos.

Para avaliação da maturação nuclear *in vitro* é possível determinar os estádios da meiose a partir da identificação microscópica dos eventos nucleares dos oócitos. Dentre as alterações observadas, podemos citar a presença da vesícula germinativa (VG), a configuração cromossômica e a individualização do corpúsculo polar. Estas estruturas têm sido identificadas em oócitos bubalinos após utilização de protocolos de coloração com acetato-orceína (PUROHIT et al. 2005; KUMAR et al. 2012; ABDOON et al. 2014) e Hoechst (GASPARRINI et al. 2008; JAIN et al. 2012) ou ainda pela visualização sem corante após desnudamento dos oócitos (KATHIRVEL et al. 2013; KHAKI et al. 2014). Entretanto, a maioria dos protocolos que envolvem a utilização destes corantes, embora práticos e precisos, culmina com a morte das células avaliadas, inviabilizando a utilização das mesmas para posterior produção dos embriões *in vitro*.

Apesar de não servir como parâmetro isolado para determinar a maturação do oócito, a avaliação do grau de expansão das células do *cumulus* tem se tornado uma ferramenta auxiliar para determinação do grau de maturação oocitária. Rápida e facilmente realizada, esta avaliação na maioria das vezes é realizada juntamente com a determinação da configuração cromossômica. Alguns autores utilizam uma classificação por pontuação para determinar o grau de expansão do *cumulus*, estabelecida inicialmente

por Fagbohum e Downs (1990). Em bubalinos a avaliação das células do *cumulus* tem sido realizada em diversos trabalhos com MIV (SINGHAL et al. 2009; JAIN et al. 2012; KATHIRVEL et al. 2013; NATH et al. 2013; SADEESH et al. 2014).

Por se tratar de um processo altamente complexo e envolver vários eventos simultâneos, a determinação do grau de maturação citoplasmática do oócito, apesar de não ser rotineiramente utilizada, nem mesmo em procedimentos experimentais, pode ser determinada pela detecção de alterações no citoplasma dos oócitos. Dentre os parâmetros avaliados, podemos citar o potencial de membrana mitocondrial dos oócitos e a localização espacial tanto de mitocôndrias quanto dos grânulos corticais no ooplasma (GOTTARDI E MINGOTI, 2009).

A mitocôndria tem o importante papel de suprir a necessidade do ATP dos embriões e oócitos além de outras funções, como regulação da homeostase celular do cálcio e defesa das espécies reativas de oxigênio (EROs) presente nos meios de maturação e cultivo embrionário (DUMOLLARD et al. 2006). Assim, a função mitocondrial parece estar intimamente relacionada à sobrevivência celular e ao desenvolvimento embrionário. Todavia, a disfunção desta estrutura com consequente redução da produção de ATP é um dos principais fatores que levam ao comprometimento da qualidade oocitária (YU et al. 2010). Por essa razão o padrão mitocondrial tem sido associado à qualidade e capacidade de desenvolvimento dos oócitos e em embriões mamíferos (NAGAI et al. 2006; EGERSZEQUI et al. 2010). O potencial de membrana (TARAZONA et al. 2006), a distribuição (ADONA et al. 2008) e formação de agregados mitocondriais (clusters) (KATSKA-KSIAZKIEWICZ et al. 2011) são os principais critérios utilizados para avaliar a qualidade dos oócitos maturados *in vitro*.

Experimentalmente demonstrou-se que o potencial de membrana mitocondrial é menor em oócitos imaturos comparado aos maduros, e que a atividade mitocondrial está relacionada à competência oocitária (VAN BLERKOM et al. 2002; TARAZONA et al. 2006). Diante disso, em bovinos, em alguns estudos têm sido utilizado corantes fluorescentes como JC-1 para correlacionar o satisfatório desenvolvimento oocitário com a atividade mitocondrial (WILDING et al. 2001; VAN BLERKOM et al. 2002). Uma vez que o aumento da atividade mitocondrial está relacionada ao aumento da emissão de fluorescência, a intensidade de coloração das mitocôndrias pode estar associada a uma maior atividade, e consequentemente, maior competência do oócito (STOJKOVIC et al. 2001).

Outro parâmetro utilizado é a distribuição espacial das mitocôndrias dentro do ooplasma, que pode ser indicativo do grau de maturação do oócitos. Utilizando corantes fluorescentes associados a técnica de microscopia eletrônica, pesquisadores identificaram que em oócitos imaturos as mitocôndrias são encontradas predominantemente na periferia do citoplasma enquanto nos maduros estas estruturas estão na porção mais centralizada do oócito, como pode ser evidenciado em bovinos (STOJKOVIC et al. 2001; ADONA et al. 2008), equinos (AMBRUOSI et al. 2009) e bubalinos (MONDARONI et al. 2010). Contestando estas evidências Tarazona et al. (2006) observaram que enquanto em oócitos imaturos a distribuição mitocondrial é difusa, em oócitos maduros a distribuição tende a se tornar preferencialmente pericitoplasmática, apesar de excepcionalmente alguns oócitos continuarem apresentando distribuição difusa mesmo após a MIV.

Clusters mitocondriais são caracterizados pela agregação mitocondrial com o Reticulo Endoplasmático Liso (REL) e como são facilmente marcados por corantes fluorescentes, como o Mitotracker Orange, estes aglomerados podem ser utilizados como critério para avaliar a qualidade dos oócitos maturados *in vitro* (KATSKA-KSIAZKIEWICZ et al. 2011). Oócitos mais competentes demonstram aumento da formação de clusters durante toda maturação, desde o restabelecimento da meiose até a completa maturação oocitária (MACHATKOVA et al. 2012; JESETA et al. 2014). Stojkovic et al. (2001) demonstraram que o tamanho e o padrão de distribuição dos clusters também é um critério para determinar o grau de maturação do oócitos, uma vez que, após a maturação *in vitro*, os clusters anteriormente localizados na periferia migram para a região central do oócito e se tornam maiores e mais corados quanto comparados a oócitos imaturos. Contudo, outros autores preferem classificar o padrão de distribuição em homogêneo e heterogêneo, sendo que a heterogeneidade das mitocôndrias está associada à ativação do processo necessário para maturação citoplasmática dos oócitos (VAN BLERKO. 2004; KATSKA-KSIAZKIEWICZ et al. 2011).

Diante das informações apresentadas, o que de fato se percebe é que apesar dos inúmeros trabalhos, é impossível afirmar o estágio de maturação e a competência oocitária somente através de avaliações morfológicas, uma vez que, sobre estas situações estão envolvidos diversos eventos intracelulares não detectáveis por meio de testes que utilizam corantes fluorescentes e a observação visual. Além dos mais, a maioria dos métodos de avaliação utilizados são invasivos ao ponto de danificar e/ou matar a célula, não permitindo a continuidade do seu desenvolvimento. Diante disso, permanece o desafio de elaborar de técnicas que avaliem de forma rápida o estágio de maturação e a

competência oocitária sem subestimar a taxa de maturação real e sua capacidade de se tornar uma gestação (NANDI et al. 2002).

3. Estresse Oxidativo

A eficiência da produção *in vitro* de embriões está associada a diversos fatores que dependem tanto da fonte doadora de oócitos, como demonstrado anteriormente, quanto dos sistemas de cultivo dos embriões. Condições sub ótimas de cultivo podem representar uma das principais razões para as baixas taxas de PIVE (ELAMARAN et al. 2012) e um dos principais fatores que podem acarretar a redução da eficiência dos sistemas de cultivo oocitário e embrionário *in vitro* é o estresse oxidativo (NASR-ESFAHANI et al. 1990).

Espécies reativas de oxigênio (EROs) são espécies químicas fisiologicamente geradas durante o metabolismo aeróbico de todos tipos celulares, mesmo em condições basais (GUERIN et al. 2001). Entretanto, ao trabalhar com sistemas de produção de embriões, nas quais os oócitos e embriões são submetidos à condições *in vitro*, a produção de EROs é altamente acentuada. Isto porque situações de alta tensão de oxigênio, manipulação excessiva, exposição a fontes de luz e calor, presença de espermatozoides e ausência da proteção antioxidante materna, comumente encontrada nos cultivos *in vitro*, favorecem a produção das EROs (GUERIN et al. 2001). Diante deste cenário pode ocorrer um desequilíbrio entre a produção de EROs e a presença de substâncias antioxidantes, com predominância das primeiras, caracterizando o que chamamos de estresse oxidativo (ANDRADE et al. 2010).

A presença de elevadas concentrações de EROs desencadeia reações em série relacionadas a peroxidação lipídica e a alterações no DNA, RNA, proteínas e mitocôndrias, provocando danos celulares que induzem a altas taxas de apoptose e bloqueio da meiose oocitária. Diante disso, lesões estruturais e funcionais decorrentes destas reações reduzem a viabilidade oocitária e embrionária, por conseguinte, afetam negativamente nos índices de maturação e produção final de embriões (WANG et al. 2002).

Diante deste entrave, duas principais alternativas têm sido propostas para amenizar o efeito do estresse oxidativo na PIVE. Uma se refere a diminuição da tensão de oxigênio utilizada nos cultivos de oócitos e embriões. Assim, a atmosfera gasosa de sistemas de cultivo passaram a ter 5% de O₂, ao invés dos 20% normalmente utilizados.

Com a redução da porcentagem de O₂, aumentou-se a taxa de blastocistos produzindo *in vitro* em suínos (KITAGAWA et al. 2004), ovinos (THOMPSON et al. 1990) e bovinos (CORREA et al. 2008) assim como a qualidade dos embriões. Outra alternativa encontrada é a adição de substâncias antioxidantes nos meios de maturação e cultivo. Uma vez adicionados aos meios, estes compostos contribuem para eliminação das EROs levando ao aumento na produção de blastocistos tanto em bovinos (DE MATOS et al. 2002) quanto em bubalinos (ANAND et al. 2008).

3.1 Uso de antioxidantes nos meios de PIVE

Neste contexto, a suplementação dos meios de maturação e cultivo *in vitro* com agentes antioxidantes tem sido utilizada na tentativa de reduzir as perdas decorrentes ao estresse oxidativo. Compostos tióis de baixa massa molecular como a cisteamina e o β -mercaptoetanol têm sido associados ao aumento da produção de blastocitos em diversas espécies (ANAND et al. 2008). A cisteamina, por exemplo, tem mostrado um efeito benéfico sobre o meio MIV tanto em bovinos (DE MATOS E FURNUS, 2000) quanto em bubalinos (GASPARRINI et al. 2003; GASPARRINI et al. 2006). Nestes últimos comprovou-se o aumento da produção e eclosão dos blastocistos (ANAND et al. 2008) e redução da apoptose nos embriões (ELAMARAN et al. 2012) quando o meio MIV foi suplementado com 50 μ M de cisteamina.

Adição de cisteamina nos meios de maturação aumentam a síntese de glutathione (GSH) (DE MATOS E FURNUS, 2000), que é o composto sulfidril não protéico mais abundante nas células, responsável por protegê-las dos efeitos citotóxicos das EROs e manter o potencial redox intracelular (GASPARRINI, 2002). Além do mais, atuando no delicado processo de maturação citoplasmática (ZICARELLI E GASPARRINI, 2004), a cisteamina promove uma melhoria das taxas de maturação oocitária pelo efeito na proteção dos oócitos contra o estresse oxidativo (GASPARRINI et al. 2003). Estes achados estão de acordo com Eppig (1996), que demonstrou que o aumento dos níveis de GSH melhora a competência de desenvolvimento dos oócitos após a fertilização e clivagem.

3.1.1 *Lippia origanoides*

A comprovação do efeito benéfico de substâncias antioxidantes acrescidas em sistemas de maturação e cultivo *in vitro* para produção de embriões, possibilitou que outros compostos de interesse pudessem ao longo dos anos serem testados. Efeitos favoráveis sobre a taxa de produção de blastocistos têm sido obtidos com substâncias

como a quercetina, um flavonóide oriundo de frutas e grãos (GEMRA et al. 2013) e a peroxirredoxina (FAKRUZZAMAN et al. 2015).

Popularmente conhecido como orégano do monte, a *Lippia origanoides* (LO) é um arbusto nativo da América Central e do nordeste da América do Sul utilizado na medicina tradicional para tratamento de doenças intestinais e gastrorespiratórias (PASCUAL et al. 2005). O óleo essencial de *Lippia origanoides* (OELO) tem como principais compostos o carvacrol e o timol, os quais já demonstraram efeitos antimicrobianos e antioxidantes em trabalhos anteriores (ROJAS-GRAU et al. 2007; BENDAHOU et al. 2008). O carvacrol, presente em elevadas quantidades na LO, tem mostrado efeito inibitório sobre melanomas B16 em camundongos (HE et al. 1997) e sobre carcinoma de pulmão não-pequeno A549 em humanos (KOPARAL E ZEYTINOGLU, 2003). Já o timol aumentou significativamente a atividade de enzimas antioxidantes como superóxido dismutase e a glutathione peroxidase em ratos (YOUDIM E DEANS, 2000). Adicionalmente, tanto o carvacrol e o timol mostraram atividade antiogenotóxica contra a genotoxicidade induzida pelo peróxido de hidrogênio em linhagens celulares extraídas do cólon, do fígado e da medula óssea de humanos (HORVATHOVÁ et al. 2007; SLAMENOVÁ et al. 2007).

A partir das propriedades apresentadas, acredita-se que embora o OELO tenha atividade antioxidante comprovada apenas em cultivo celulares, sua constituição química revela a capacidade promissora do emprego desta substância também na maturação oocitária e no cultivo embrionário visando otimizar os índices da PIVE. Para tal, são necessários estudos para verificar seu potencial de redução das EROs e toxicidade quando acrescidos em meios de maturação e cultivo embrionário.

4. Parâmetros para avaliação da qualidade embrionária

A qualidade embrionária usualmente determinada pela avaliação visual das características morfológicas dos embriões é uma importante ferramenta para determinar a capacidade de desenvolvimento do embrião, entretanto, variável de acordo com o avaliador. Embora existam testes eficazes e não invasivos, como a identificação de biomarcadores genéticos recém reportada (KROOP E KHATIB, 2015), o custo elevado acaba se tornando uma limitação para aplicação prática e científica destas ferramentas. O número total de células assim como a avaliação do grau de apoptose dos embriões, são testes que tem sido comumente utilizados para determinar a qualidade embrionária (YUAN et al. 2003).

Conquanto não seja possível avaliar o número de células dos blastocistos anterior a sua inovulação, este parâmetro está altamente relacionado a qualidade do embrião. Segundo Van Soom et al. (1997) embriões bovinos com elevado número de células são mais desejáveis no processo de inovulação por possuírem maior possibilidade de obtenção de prenhez. Confirmou-se que blastocistos bovinos com menor número de células, além de possuírem menor capacidade de desenvolvimento, apresentam ainda maior incidência de apoptose (BYRNE et al. 1999). A comparação de embriões para prever a qualidade deve levar em conta o seu estágio de desenvolvimento, visto que a média de células encontrada em bovinos para blastocisto inicial (Bi), blastocisto (Bl) e blastocisto expandido (Bx) foi de $105,0 \pm 23,4$; $115,0 \pm 5,6$ e $159,0 \pm 14,1$, respectivamente (VAN SOON et al. 1997). Guimarães et al. (2015), avaliando diferentes sistemas de maturação, encontraram número médio de $150 \pm 26,7$ células para embriões bovinos no oitavo dia de cultivo (D8) no tratamento controle, que foi superior aos outros avaliados, tanto no número de células embrionárias, quanto nas taxas de clivagem e blastocistos. Logo, a maioria dos trabalhos científicos assumem que a comparação do número de células entre embriões, no mesmo estágio e dia de desenvolvimento, remete a qualidade destes embriões e a sua capacidade em progredir seu desenvolvimento (YUAN et al. 2003).

A apoptose, morte celular programada, constitui uma forma conservada e regulada de morte celular e que ocorre em todas as células, em diferentes graus de intensidade (ELAMARAN et al. 2012). Durante este processo fisiológico ativo, eventos como condensação da cromatina e do citoplasma, fragmentação do DNA, redução do volume celular e formação de vesículas na membrana, chamada de corpos apoptóticos, ocorrem de forma coordenada (MATWEE et al. 2000). Como resultado são eliminadas células desnecessárias, desuniformes, danificadas, que não possuem competência para o desenvolvimento e poderiam atrapalhar as sadias e funcionais (SCHWARTZMAN E CIDLOWSKI, 1993; BYRNE et al. 1999). Por outro lado, a elevação dos níveis de apoptose tem sido reportada com uma das principais maneiras na qual as EROs manifestam seu efeito deletério sobre as células (YANG et al. 1998).

No processo de produção *in vitro* de embriões tem sido demonstrado que o aumento da proporção de células em apoptose em relação as células normais está intimamente relacionado as perdas embrionárias (ANTUNES et al. 2010). Supreendentemente, em um estudo recente com oócitos bovino demonstrou maior competência em oócitos que apresentavam apoptose inicial identificado pela Anexina-V,

sugerindo assim que a apoptose inicial em oócitos pode ser requerida para o subsequente desenvolvimento até o estágio de blastocisto (LI et al. 2009). Em embriões, a apoptose ocorre normalmente em blastômeros danificados e anormais, sem efeito nas células circundantes (MATWEE et al. 2000). A identificação de células apoptóticas ocorre a partir do estágio de 8-16 células, reduzindo no estágio de mórula e aumentando a proporção de células em apoptose no estágio de blastocistos (BYRNE et al. 1999). Este efeito é ainda mais expressivo nos embriões produzidos *in vitro* comparado aos embriões produzidos *in vivo*, em razão das condições de cultivo na qual estes são submetidos (GJORRET et al. 2003). Acredita-se que elevado número de células com DNA fragmentado em relação ao número de células normais, que inclui taxas superiores a 15% de apoptose, provoque um efeito adverso sobre o desenvolvimento embrionário, contribuindo para o decréscimo das taxas de blastocistos durante a PIVE (ANTUNES et al. 2010).

A fragmentação do DNA em oócitos e embriões por si só não define absolutamente a incompetência de desenvolvimento dos oócitos. Todavia, testes baseados na marcação de fragmentos de DNA gerados por atividade endógena DNase, decorrente do processo de apoptose, como a reação de TUNEL (do inglês *terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP*) (GRAVIELI et al. 1992), têm sido amplamente utilizados para detecção *in situ* das células apoptóticas embrionárias (ANTUNES, et al. 2010). O TUNEL é um teste eficiente capaz de identificar células no estágio inicial de apoptose, até mesmo quando presentes em pequenas quantidades (BYRNE et al. 1999). A identificação de transcritos que atuam como marcadores do potencial de apoptose em oócitos e embriões é também uma estratégia para detectar a apoptose, sobretudo, nos estádios iniciais de desenvolvimento como demonstrado em bovinos (LI et al. 2009) e bubalinos (ELAMARAM et al. 2012).

BIBLIOGRAFIA

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**, Vol. 82, n.8, p. 1055-1067, 2014.

ADONA, P.R.; PIRES, P.R.L.; QUETGLAS, M.D.; SCHWARZ, K.R.L.; LEAL, C.L.V. Prematuration of bovine oocytes with butyrolactone I: Effects on meiosis progression, cytoskeleton, organelle distribution and embryo development. **Animal Reproduction Science**, Vol. 108 (1-2), p. 49-65, 2008.

ADONA, P.R. Efeito de diferentes inibidores específicos do fator promotor da maturação (MPF) na retenção da meiose em ovócitos bovinos in vitro. **Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias)** Universidade Estadual do Norte Fluminense, Faculdade de Ciências Agrárias, Rio de Janeiro, 68f., 2002.

AMBRUOSI, B.; LACALANDRA, G.M.; IORGA, A.I.; DE SANTIS, T.; MUGNIER, S.; MATARRESE, R.; GOUDET, G.; DELL'AQUILA, M.E. Cytoplasmatic lipid droplets and mitochondrial distribution in equine oocytes: Implications on oocyte maturation, fertilization and developmental competence after ICSI. **Theriogenology**, Vol.71, p. 1093-1104, 2009.

AMER, H.A.; HEGAB, A.O.; ZAABAL, S.M. Effects of ovarian morphology on oocyte quantity and quality, granulosa cells, in vitro maturation, and steroid hormone production in buffaloes. **Anim. Reprod.**, Vol.5, n.1/2, p.55-62, 2008.

ANAND, T.; KUMAR, D.; CHAUHAN, M.S.; MANIK, R.S.; PALTA, P. Cysteamine supplementation of in vitro maturation medium, in vitro culture medium or both media promotes in vitro development of buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. **Reprod Fertil Dev.** Vol.20, p.253–257, 2008.

ANDRADE, E.R.; MELO-STERZA, F.A.; SENEDA M.M.; ALFIERI, A.A. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Vol. 34, p.79-85, 2010.

ANGUITA, B.; PARAMIO, M.T.; JIMENEZ-MACEDO, A.R.; MORATÓ, R.; MOGAS, T.; IZQUIERDO, D. Total RNA and protein content, Cyclin B1 expression and developmental competence of prepubertal goat oocytes. **Animal Reproduction Science**, Vol.103, p.290-303, 2008.

ANTUNES, G.; CHAVEIRO, A.; SANTOS, P.; MARQUES, A.; JIN, H.S.; MOREIRA DA SILVA, F. Influence of apoptosis in bovine embryo's development. **Reprod. Domest. Anim.**, Vol. 45, p. 26–32, 2010.

BARKAWI, A. H.; IBRAHIM, S. A.; ASHOUR, G.; AMAL K.; EL-ASHEERI, Y. M.; HAFEZ, and FAHEEM, M.S. In vitro production of buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. **Egyptian J. Anim. Prod.**, Vol 44, nº1, p. 35-48, 2007.

BENDAHO, M.; MUSELLI, A.; GRIGNON-DUBOIS, M.; BENYOUCEF, M.; DESJOBERT, J.M.; BERNARDINI, A.F.; COSTA, J. Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum glandulosum* Desf. essential oils and extract obtained by microwave extraction: Comparison with hydrodistillation. **Food Chem.** Vol. 106, p. 132–139, 2008.

BLERKOM, V.J. Mitochondrial function in the human oocyte and embryo and their role in developmental competence. **Mitochondrion**, Vol. 11, p. 797–813, 2011.

BONI, R.; ROVIELLO, S.; ZICARELLI, L. Repeat ovum pick up in Italian Mediterranean buffalo cows. **Theriogenology**, Vol. 46, p.899-909, 1996.

BREVINI-GANDOLFI, T.A.L.; GANDOLFI, F. The maternal legacy to the embryo: cytoplasmatic componentes and their effects on early development. **Theriogenology**, Vol. 55, p. 1255-1276, 2001.

BYRNE, A. T.; SOUTHGATE, J.; BRISON, D. R.; LEESE, H. J. Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryo using tunel. **J Reprod Fertil**, Vol. 117 (1), p. 97-105, 1999.

CAMARGO, L.S.A.; VIANA, J.H.M.; SÁ, W.F.; FERREIRA, A.M.; RAMOS, A.A.; VALE FILHO, V.R. Factors influencing in vitro embryo production. **Anim. Reprod.**, Vol.3, p.19-28, 2006.

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. **Anim Reprod Sci.** Vol. 121, n.(1-2), p. 1-11, 2010.

CAN, A.; SEMIZ, O.; ÇINAR, O. Centrosome and microtubule dynamics during early stages of meiosis in mouse oocytes. **Mol Hum Reprod**, Vol.9, p.749-756, 2003.

CARVALHO, N.A.T.; BOMBONATO, P.P.; D'ANGELO, M.; BARUSELLI, P.S.; Caracterização anatomo funcional do sistema genital de fêmeas bubalinas (*Bubalus bubalis*) e suas implicações na múltipla ovulação e transferência de embriões. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Vol.35, n.2, p.95-103, 2011.

CHAUHAN, M.S.; SINGLA, S.K.; PALTA, P.; MANIK, R.S.; MADAN, M.L. Development of in vitro produced buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos in relation to time. **Asian Austr J Anim Sci**; Vol.11,p.398–403, 1998.

CORREA, G.A.; RUMPF, R.; MUNDIMA, T.C.D.; FRANCO, M.M.; DODEB, M.A.N. Oxygen tension during in vitro culture of bovine embryos: effect in production and

expression of genes related to oxidative stress. **Anim. Reprod. Sci.**, Vol. 104, p. 132–142, 2008.

DANELL, B. Estrus behaviour, ovarian morphology and cyclic variations in follicular system and endocrine pattern in water buffalo heifers. **PhD thesis**, Uppsala, Sweden: Sveriges Lantbruksuniversitet, 1986;

DE MATOS, D. G.; FURNUS, C. C.; MOSES, D. F.; AND BALDASSARRE, H. Effect of cysteamine on glutathione level and developmental capacity of bovine oocyte matured in vitro. **Mol. Reprod. Dev.**, Vol. 42, p. 432–436, 1995.

DE MATOS, D.G.; GASPARRINI, B.; PASQUALINI, S.R.; THOMPSON, J.G. Effect of glutathione stimulation during in vitro maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content. **Theriogenology**, Vol. 57, p. 1443-1451, 2002.

DI FRANCESCO, S.; BOCCIA, L.; CAMPANILE, G.; DI PALO, R.; VECCHIO, D.; NEGLIA, G.; ZICARELLI, L.; GASPARRINI, B. The effect of season on oocyte quality and developmental competence in Italian Mediterranean buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Animal Reproduction Science**, Vol.123,p.48–53, 2011.

DI FRANCESCO, S.; NOVOA, M.V.; VECCHIO, D.; NEGLIA, G.; BOCCIA, L.; CAMPANILE, G. Ovum pick-up and in vitro embryo production (OPU-IVEP) in Mediterranean Italian buffalo performed in different seasons. **Theriogenology**, Vol 77, p. 148-145, 2012.

DI PALO, R.; NEGLIA, G.; CAMPANILE, G.; PRESICCE, G.A.; SPADETTA, M.; CARACCILO DI BRIENZA, V.; GASPARRINI, B.; ZICARELLI, L. Seasonal effect on follicle production and oocyte recovery by ovum pick-up in the Mediterranean Italian Buffalo (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, Vol. 55, p. 404, 2001.

DIELEMAN, S.J.; HENDRIKSEN, P.J.M.; VIUFF, D.; THOMSEN, P.D. ET AL. Effects of in vivo prematuration and in vivo final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. **Theriogenology**, Vol. 57, p. 5-20, 2002.

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

DUMOLLARD, R.; DUCHEN, N.; SARDET, C. Calcium signals and mitochondria at fertilization. **Semin. Cell. Dev. Bio.**, Vol. 117, p. 314–323, 2006

DUSZEWSKA, A.M.; RAPALA, L.; TRZECIAK, P.; DABROWSKI, S.; PILISZEK, A. Obtaining farm animal embryos in vitro. **Journal of Animal and Feed Sciences**, Vol.21, p.217-233, 2012.

EDWARDS, J.L.; HANSEN, P.J. Differential responses of bovine oocytes and preimplantation embryos to heat shock. **Mol Reprod Dev.** Vol.46, p.138–45,1997.

EGERSZEGI, I.; ALM, H.; RATKY, J.; HELEIL, B.; BRÉUSSOW, K.P.; TORNER, H. Meiotic progression, mitochondrial features and fertilisation characteristics of porcine oocytes with different G6PDH activities. **Reprod. Fert. Dev.**, Vol. 22, p. 930–938, 2010.

ELAMARAN, G.; SINGH, K.P.; SINGH, M.K.; CHAUHAN, M.S.; MANIK, R.S.; PALTA, P. OXYGEN Concentration and Cysteamine Supplementation During In vitro Production of Buffalo (*Bubalus bubalis*) Embryos Affect mRNA Expression of BCL-2, BCL-XL, MCL-1, BAX and BID. **Reprod. Dom. Anim.** Vol. 47, p. 1027-1036, 2012.

EL-NABY, A.S.A.H.H.; MAHMOUD, K.G.H.M.; AHMED, Y.F.; ABOUEL-ROOS, M.E.A.; ABDEL-GHAFFAR, A.E. Effect of Season of the year and Ovarian Structures on Oocytes Recovery Rate, Quality and Meiotic Competence in Egyptian Buffaloes. **Global Veterinaria**. Vol.10, n.4, p.408-412, 2013.

EPPIG, J. Coordination of nuclear and cytoplasmic maturation in eutherian mammal. **Reprod. Fertil. Dev.** Vol. 8, p. 485–489, 1996.

FAGBOHUN, C.F.; DOWNS, S.M. Maturation of the mouse oocyte–cumulus cell complex: stimulation by lectins. **Biol. Reprod.** Vol.42, p.413–423, 1990.

FAGUNDES, N.S.; MICHALCZECHEN-LACERDA, V.A.; CAIXETA, E.S.; MACHADO, G.M.; RODRIGUES, F.C.; MELO E.O.; DODE, M.A.N.; FRANCO, M.M. Methylation status in the intragenic differentially methylated region of the IGF2 locus in *Bos taurus indicus* oocytes with different developmental competencies. **Molecular Human Reproduction**, Vol.17, p.85-91, 2011.

FAKRUZZAMAN, M.D.; GHANEM, N.; BANG, J.; HA, A.; LEE, K.; SOHN, S.; WANG, Z.; LEE, D.; KONGA, K. Effect of peroxiredoxinII on the quality and mitochondrial activity of pre-implantation bovine embryos. **Anim. Reprod. Sci.**, Vol. S0378-4320(15), p. 146-153, 2015.

FERREIRA, E.M.; VIREQUE, A.A.; ADONA, P.R.; MEIRELLES, F.V.; FERRIANI, R.A.; NAVARRO, P.A.A.S. Maturação citoplasmática de oócitos bovinos: aquisição de competência para o desenvolvimento. **Rev Bras Reprod Anim**, Vol.32, n.3, p.172-181, 2008.

FERREIRA, E.M.; VIREQUE, A.A.; ADONA, P.R.; MEIRELLES, F.V.; FERRIANI, R.A.; NAVARRO, P.A.A.S. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, Vol.71, p.836-848, 2009.

GARCIA, A.R.; Influência de fatores ambientais sobre as características reprodutivas de búfalos do rio (*Bubalus bubalis*). PALESTRA. **Rev. de Ciênc. Agrár.** n. 45, jan./jun.2006. Suplemento.

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

GASPARRINI, B.; SAYOUD, H.; NEGLIA, G.; DE MATOS, D. G.; DONNAY, I.; AND ZICARELLI, L. Glutathione synthesis during in vitro maturation of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes: effects of cysteamine on embryo development. **Theriogenology**, Vol. 60, p. 943–952, 2003.

GASPARRINI, B.; BOCCIA, L.; MARCHANDISE, J.; DI PALO, R.; GEORGE, F.; DONNAY, L.; ZICARELLI, L. Enrichment of in vitro maturation medium for buffalo (*Bubalus bubalis*) oocyte with thiol compounds: effect of cysteine on glutathione synthesis and embryo development. **Theriogenology**, Vol.66, p.275–287, 2006.

GASPARRINI, B. In vitro embryo production in buffalo: current situation and future perspectives. **Ital J Anim Sci**. Vol.6 (Suppl. 2), p.92-101, 2007.

GASPARRINI, B.; DE ROSA, A.; ATTANASIO, L.; BOCCIA, L.; DI PALO, R.; CAMPANILE, G.; ZICARELLI, L. Influence of the duration of in vitro maturation and gamete co-incubation on the efficiency of in vitro embryo development in Italian Mediterranean buffalo (*Bubalus bubalis*). **Animal Reproduction Science**, Vol.105, p.354–364, 2008.

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

GAVRIELI, Y.; SHERMAN, Y.; BEN SASSON, S.A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. **J Cell Biol**, Vol. 119, p. 493–501, 1992.

GJORRET, J.O.; KNIJN, H.M.; DIELEMAN, S.J.; AVERY, B.; LARSSON, L.; HYTTTEL, P.M. Chronology of Apoptosis in Bovine Embryos Produced In Vivo and In Vitro. **Biol Reprod**, Vol. 69 (4), p.1193-1200, 2003.

GORDON, I. Laboratory production of cattle embryos. **Wallingford, UK: CABI International**, 1994, 640p.

GOTTARDI, F.P.; MINGOTI, G.Z. Maturação de oócitos bovinos e influência na aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião. **Rev. Bras. Reprod. Anim.** Vol.33, n.2, p.82-84, 2009.

GUEMRA, S.; MONZANI, P.S.; SANTOS, E.S.; ZANIN, R.; OHASHI, O.M.; MIRANDA, M.S.; ADONA, P.R. Maturação in vitro de oócitos bovinos em meios suplementados com quercetina e seu efeito sobre o desenvolvimento embrionário. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Vol.65, n.6, p.1616-1624, 2013.

GUÉRIN, P.; EL MOUATASSIM, S.; MÉNÉZO, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. **Hum Reprod Update.**, Vol. 7, p. 175-189, 2001.

GUIMARÃES, A.L. Avaliação de diferentes sistemas de maturação para aumentar a competência de ovócitos bovinos. 2013. 84f. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Animais) - Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Veterinária, Brasília, 2013.

GUIMARÃES, A.L.; PEREIRA, S.A.; LEME, L.O.; DODE, M.A. Evaluation of the simulated physiological oocyte maturation system for improving bovine in vitro embryo production. **Theriogenology**. Vol. 83(1), p. 52-57, 2015.

GUPTA, V.; MANIK, R.S.; CHAUHAN, M.S.; SINGLA, S.K.; AKSHEY, Y.S.; PALTA, P. Repeated ultrasound-guided transvaginal oocyte retrieval from cyclic Murrah buffaloes (*Bubalus bubalis*): oocyte recovery and quality. **Animal Reproduction Science**, Vol. 91, p. 89–96; 2006.

HE, L.; MO, H.; HADISUSILU, S.; QURESNI, A.A.; ELSON, C.E. Isoprenoids suppress the growth of murine B16 melanomas in vitro and in vivo. **J Nutr**, Vol. 127(5), p. 668-674, 1997.

HORVATHOVA, E.; TURCANIOVA, V.; SLAMENOVA, D. Comparative study of DNA-damaging and DNA-protective effects of selected components of essential plant oils in human leukemic cells K562. **Neoplasma**, Vol. 54, p. 478–483, 2007.

JAIN, T.; JAIN, A.; KUMAR, P.; GOSWAMI, S.L.; DE S.; SINGH, D.; DATTA, T.K. Kinetics of GDF9 expression in buffalo oocytes during in vitro maturation and their associated development ability. **General and comparative Endocrinology**. Vol. 178, p. 477-484, 2012.

JESETA, M.; CTVRTLÍKOVÁ KNITLOVÁ, D.; HANZALOVÁ, K.; HULINSKÁ, P.; MILAKOVIC, I.; NEMCOVÁ, L.; KANKA, J.; MACHATKOVÁ, M. Mitochondrial Patterns in Bovine Oocytes with Different Meiotic Competence Related to their in Vitro Maturation. **Reproduction Domestic Animals**, Vol. 49, p. 467-475, 2014.

JONES, G.M.; CRAM, D.S.; SONG; MAGLI, M.C.; GIANAROLI, L.; KAPLAN, O.L.; FINDLAY, J.K.; JENKIN, G.; TROUNSON, A.O. Gene expression profiling of human oocytes following in vivo or in vitro maturation. **Hum. Reprod.** Vol. 23, p. 1138–1144, 2008.

KATHIRVELM; SOUNDIANE; KUMANAN, V. Differential expression dynamics of Growth differentiation factor9 (GDF9) and Bone morphogenetic factor15 (BMP15) mRNA transcripts during in vitro maturation of buffalo (*Bubalus bubalis*) cumulus–oocyte complexes. **SpringerPlus**. Vol. 2, p. 206, 2013.

KATSKA-KSIAZKIEWICZ, L.; ALM, H.; TORNER, H.; HELEIL, B.; TUCHSCHERER, A.; RYNSKA, B. Mitochondrial aggregation patterns and activity in in vitro cultured bovine oocytes recovered from early antral ovarian follicles. **Theriogenology**, Vol. 75, p. 662–670, 2011.

KAWAMURA, K.; KUMAGAI, J.; SUDO, S.; CHUN, S.Y.; PISARSKA, M.; MORITA, H.; TOPPARI, J.; FU, P.; WADE, J.D.; BATHGATE, R.A. Paracrine regulation of mammalian oocyte maturation and male germ cell survival. **Proc Natl Acad Sci USA**, Vol.101, p.7323-7328, 2004.

KHAKI, A.; BATAVANI, R.; NAJAFI, G.; TAHMASBIAN, H.; BELBASI, A.; MOKARIZADEH, A. Effect of Leptin on In Vitro Nuclear Maturation and Apoptosis of Buffalo (*Bubalus bubalis*) Oocyte. **International Journal of Fertility and Sterility**. Vol. 8, n. 1, p. 43-50, 2014.

KIM, B.K.; ANOWER, J.M.; KANG, S.R.; KIM, D.; CHANG-HEE, H.A.N.; HUH, M.K.; KAMAL, T. Effects of spermatozoa during in vitro meiosis progression in the porcine germinal vesicle oocytes. **Anim Reprod Sci**, vol.104, p.83-92, 2008.

KIM, N.H. The distribution and requirements of microtubules and microfilaments in bovine oocytes during in vitro maturation. **Zygote**. Vol.8, p.25-32, 2000.

KITAGAWA, Y.; SUZUKI, K.; YONEDA, A.; WATANABE, T. Effects of oxygen concentration and antioxidants on the in vitro developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. **Theriogenology**, Vol. 62, p. 1186-1197, 2004.

KOPARAL, A.T.; ZEYTINOGLU, M. Effects of Carvacrol on a Human Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) Cell Line, A549. **Cytotechnology**, Vol. 43 (1-3), p. 149-154, 2003.

KROPP, J.; KHATIB, H.; Characterization of microRNA in bovine in vitro culture media associated with embryo quality and development. **J Dairy Sci**. Vol. S0022-0302(15), p. 455-455, 2015.

KUMAR P, VERMA A, ROY B, RAJPUT S, OJHA S, ANAND S, YADAV P, ARORA J, DE S, GOSWAMI SL, DATTA TK. Effect of Varying Glucose Concentrations during In Vitro Maturation and Embryo Culture on Efficiency of In Vitro Embryo Production in Buffalo. **Reprod Dom Anim**, Vol. 47, p.269–273, 2012.

KUMAR, A.; SOLANKI, V.S.; JINDAL, S.K.; TRIPATHI, V.N.; JAIN, G.C. Oocytes retrieval and histological studies of follicular population in buffalo ovaries. **Anim Reprod Sci**, Vol. 47, . 189-195, 1997.

LI, H.J.; LIU, D.J.; CANG, M.; WANG, L.M.; JIN, M.Z.; MA, Y.Z.; SHORGAN, B. Early apoptosis is associated with improved developmental potential in bovine oocyte. **Anim. Reprod. Sci.**, Vol. 114, p. 89–98, 2009.

LIANG, X.; ZHANG, X.; YANG, B.; CHENG, M.; HUANG, F.; PANG, C.; QING, G.; LIAO, C.; WEI, S.; SENATORE, E.M.; BELLA, A.; PRESICCE, G.A. Pregnancy and calving rates following transfer of in vitro produced river and F1 (river x swamp) buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos in recipients on natural oestrus or synchronized for ovulation. **Reprod Fertil Dev**. Vol. 19, p.670–676, 2007.

LIANG, X.W.; LU, Y.Q.; CHEN, M.T.; ZHANG, X.F.; LU, S.S.; ZHANG, M.; PANG, C.Y.; HUANG, F.X.; LU, K.H. In vitro embryo production in buffalo (*Bubalus bubalis*) using sexed sperm and oocytes from ovum pick up. **Theriogenology**. Vol.69, p. 822–826, 2008.

LONERGAN, P.; GUTIERREZ-ADAN, A.; RIZOS, D.; PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J.; BOLAND, M.P. Relative messenger RNA abundance in bovine oocytes collected in vitro or in vivo before and 20 hr after the pre-ovulatory luteinizing hormone surge. **Mol Reprod Dev**. Vol. 66, p.297–305, 2003.

MACHATKOVA, M.; JESETA, M.; HULINSKA, P.; KNITLOVA, D.; NEMCOVA, L.; KANKA, J. Characteristics of bovine oocytes with different meiotic competence in terms of their mitochondrial status and expression of nuclear-encoded factors. **Reproduction Domestic Animals**, Vol. 47, p. 806–814, 2012.

MAJUND, A.R.; KATIY, P.K.; SINGH; TANEJA, V.K.; BHAT, P.N.; In: World **Buffalo Congress**, 2, 1988, New Delhi. Proceedings... New Delhi: WBC, 1988. v.1, p.54. Abstract

MANJUNATHA, B.M.; GUPTA, P.S.P.; RAVINDRA, J.P.; DEVARAJ, M.; NANDI, S. In vitro embryo development and blastocyst hatching rates following vitrification of river buffalo embryos produced from oocytes recovered from slaughterhouse ovaries or live animals by ovum pick-up. **Animal Reproduction Science**, Vol. 104, p. 419–426, 2008.

MANJUNATHA, B.M.; GUPTA, P.S.P.; RAVINDRA, J.P.; DEVARAJ, M.; RAMESH, H.S.; NANDI, S. In vitro developmental competence of buffalo oocytes collected at various stages of the estrous cycle. **Theriogenology**, Vol.68, p.882–888, 2007.

MANJUNATHA, B.M.; RAVINDRA, J.P.; GUPTA, P.S.; DEVARAJ, M.; NANDI, S. Effect of breeding season on in vivo oocyte recovery and embryo production in non-descriptive Indian river buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Animal Reproduction Science**, Vol. 111, n. (2-4), p. 376-383, 2009.

MATWEE, C.; DEAN, H.; BETTS AND KING, W. A. Apoptosis in the early bovine embryo. **Zygote**, Vol.8, p. 57-68, 1999.

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 applications of embryo technologies in the cattle breeding industry. **Theriogenology**, Vol.59, p.651-674, 2003.

MILLAR, J.B.A.; RUSSELLP. The cdc 25 m-phase inducer: an unconventional protein phosphatase. **Cell**, Vol.68, p.407-410, 1992.

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

MONDADORI, R.G.; SANTIN, T.R.; FIDELIS, A.A.G.; NAME, K.P.O.; SILVA, J.S.; RUMPF, R.; BÁO, S.N. Ultrastructure of in vitro oocyte maturation in buffalo (*Bubalus bubalis*). **Zygote**. Vol.18, p.309–314, 2010.

MONTIEL-URDANETA, N.; ROJAS, N.; ANGULO, F.; HERNÁNDEZ, A.; ZULETA, J.; CAHUAO, N.; TORRES, I. Efecto de algunos factores ambientales sobre la estacionalidad em los partos em búfalas. **Arch. Latinoam. Prod. Anim.**, Vol.5 (Supl. 1), p. 423-425, 1997

NAGAI, T.; FUNAHASHI, H.; YOSHIOKA, K.; KIKUCHI, K. Up date of in vitro production of porcine embryos. **Front Biosci**, Vol. 11, p. 2565–2573, 2006.

NANDI, S.; CHAUHAN, M.S.; PALTA, P. Effect of environmental temperature on quality and developmental competence in vitro of buffalo oocytes. **Veterinary Record**, Vol.148, p.278-279, 2001.

NANDI, S.; RAGHU, H.M.; RAVINDRANATHA, B.M.; CHAUHAN, M.S. Production of Buffalo (*Bubalus bubalis*) Embryos in vitro: Premises and Promises. **Reprod Dom Anim**. Vol. 37, p. 65-74, 2002.

NASR-ESFAHANI, M.H.; AITKEN, J.R.; JOHNSON, M.H. Hydrogen peroxide levels in mouse oocyte and early cleavage stages embryos developed in vitro or in vivo. **Development**. Vol. 109, p. 501-507, 1990.

NATH, A.; SHARMAV; DUBEYPK; PRATHEESHMD; GADENE; SAIKUMARGSHARMA, G.T. Impact of gonadotropin supplementation on the expression of germ cell marker genes (MATER, ZAR1, GDF9 and BMP15) during in vitro maturation of buffalo(*Bubalus bubalis*) oocyte. **In Vitro Cell. Dev. Bio. Animal**. Vol. 49, p. 34-41, 2013.

NEGLIA, G.; GASPARINI, B.; VECCHIO, D.; BOCCIA, L.; VARRICCHIO, E.; DI PALO, R.; ZICARELLI, L.; CAMPANILE, G. Long term effect of Ovum Pick-up in buffalo species. **Animal Reproduction Science**, Vol. 123, p.180-186, 2011.

NEGLIA, G.; GASPARRINI, B.; CARACCILO DI BRIENZA, 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**, Vol. 59, n.11, p. 23-30, 2003.

NEGLIA, G.; MARINO, M.; DI PALO, R.; WILDING, M.; CARACCILO DI BRIENZA, V.; DALE, B.; GASPARRINI, B.; ZICARELLI, L. A comparison of in vitro maturation in buffalo (*Bubalus bubalis*) and bovine oocytes using confocal microscopy. **Theriogenology**, Vol. 55, p.488, 2001.

OBA, E.; CAMARGOS, A.S. Produção in vitro de embriões bubalinos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, Vol.35, n.2, p.80-87, 2011

PALTA, P.; BANZAI, N.; PRAKASH, B.S.; MANIK, R.S.; MADAN, M.L. Endocrinological observation of atresia in individual buffalo ovarian follicles. **Ind J Anim Sci**, Vol. 68 p. 444-447, 1998.

PASCUAL, M.E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; SÁNCHEZ-MATA, D.; VILLAR, A. Lippia: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **J Ethnopharmacol**, Vol. 76, p. 201-214, 2001.

PAVASUTHIPAISIT, K.; HOYOAK, R.G.; TOCHARUS, C.; KITIYANANT, Y. Repeated transvaginal follicular aspiration in swamp buffalo. **Theriogenology**, Vol. n. 43, p. 295, 1995 (Abstract)

PAYTON, R.R.; COY, P.; ROMAR, R.; LAWRENCE, J.L.; EDWARDS, J.L. Heat shock increase glutathione in bovine oocytes. **J Anim Sci**, Vol.81(Suppl.1), pag.3, 2003a.

PAYTON, R.R.; LAWRENCE, J.L.; SAXTON, A.M.; DUNLAP, J.R.; EDWARDS, J.L. Cortical granule types and nuclear stage of bovine oocytes after exposure to elevated temperature during maturation. **Theriogenology**, Vol.59, pag.496, 2003b.

PICTON, H.M.; BRIGGS, D.; GOSDEN, R. The molecular basis of oocyte growth and development. **Mol Cell Endocrinol**, Vol.145, p.27-37, 1998.

PONTES, J.H.F.; MELO STERZA, F.A.; BASSO, A.C.; FERREIRA, C.R.; SANCHES, B.V.; RUBIN, K.C.P.; SENEDA, M.M. Ovum pick up, *in vitro* embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. **Theriogenology**, vol.75, p.1640–1646, 2011.

PRESICCE, G.A.; SENATORE, E.M.; DE SANTIS, G.; STECCO, R.; TERZANO, G.M.; BORGHESE, A. et al. Hormonal stimulation and oocyte maturational competence in prepubertal Mediterranean Italian buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, Vol. 57, p. 1877–1884, 2002.

PROMDIREG, A.; ADULYANUBAP, W.; SINGLOR, J.; NA-CHIENGMAI, A.; TECHAKUMPHU, M. Ovum Pick-up in Cycling and Lactating Postpartum Swamp Buffaloes. **Reproduction Domestic Animals**. Vol.40, p.145-149, 2005.

PUROHIT, G.N.; BRADY, M.S.; SHARMA, S.S. Influence of epidermal growth factor and insulin-like growth factor 1 on nuclear maturation and fertilization of buffalo cumulus oocyte complexes in serum free media and their subsequent development in vitro. **Animal Reproduction Science**. Vol. 87, p. 229-239, 2005.

RAGHU, H.M.; NANDI, S.; REDDY, S.M. Follicle size and oocyte diameter in relation to developmental competence of buffalo oocytes in vitro. **Repro Fert Deve**, Vol. 14, p.55-61, 2002.

REIS, A.; STAINES, M.E.; WATT, R.G.; DOLMAN, D.F.; MCEVOY, T.G. Embryo production using defined oocyte maturation and zygote culture media following repeated ovum pick-up (OPU) from FSH-stimulated Simmental heifers. **Anim Reprod Sci** Vol. 72, p.137–151, 2002.

ROJAS-GRAÜ, M.A.; AVENA-BUSTILLOS, R.J.; OLSEN, C.; FRIEDMAN, M.; HENIKA, P.R.; MARTÍ-BELLOSO, O.; PAN, Z.; MCHUGH, T.H. Effect of plant essential oils and oil compounds on mechanical barrier and antimicrobial properties of alginate-apple puree edible films. **J Food Eng.** Vol. 81, p. 634–641, 2007.

SÁ FILHO, M.F.; CARVALHO, N.A.; 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. **Anim Reprod Sci.** Jul, Vol. 113(1-4) p. 51-59, 2009

SADEESH, E.M.; SHAH, F.; BALHARA, A.K.; THIRUMARAN, S.M.K.; YADAV, S.; YADAV, P.S. Effect of growth factor and antioxidant on *in vitro* maturation of oocytes and cleavage rates of *in vitro* produced Indian buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. *Veterinarsky Arhiv*, vol. 84, p.459-474, 2014.

SAHA, A.; PANDA, S.K.; CHAUHAN, M.S.; MANIK, R.S.; PALTA, P.; SINGLASK. Birth of cloned calves from vitrified–warmed zona-free buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos produced by hand-made cloning. **Reprod. Fertil. Dev.** Vol. 25, p.860–865, 2013.

SALIBA, W.P.; DRUMOND, R.M.; BAYAO, E.X.; ALVIM, M.T.; BARUSELLI, P.S.; GIMENES, L.U.; LEITE, R.I.; BASTIANETTO, E.; GASPARRINI, B. Efficiency of OPU-IVF-ET of fresh and vitrified embryos in buffaloes. **XXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões**, Cumbuco, Brazil, 18-20 August, *Acta Sci Vet*, Vol. 39, p.404, 2011.

SCHWARTZMAN, R.A.; CIDLOWSKI, J.A. Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. **Endocr. Rev.**, Vol. 14, p. 133–151, 1993.

SEKHAR, T.K.; RAJU, K.G.S.; RAO, K.S. Efficacy of in vitro maturation of bubaline oocytes in TCM 199, TCM 199 + PMSG and follicular fluid. **Indian Journal of Animal Reproduction**, Vol.33, p33-36, 2012.

SHARMA, G.T.; DUBEY, P.K.; NATH, A.; SAIKUMAR, G. Co-culture of buffalo (*Bubalus bubalis*) preantral follicles with antral follicles: a comparative study of developmental competence of oocytes derived from in vivo developed and in vitro cultured antral follicles. **Zygote**.Vol.21, p.286–294, 2012.

SINGH, S.; DHANDA, O.P.; MALIK, R.K.; Effect of the Presence of Corpus Luteum on Oocyte Recovery and Subsequent in vitro Maturation and Fertilization in Buffaloes. **Asian-Aust. J Anim Sci.** Vol.14, n.12, p.1675-1677, 2001.

SINGHAL, S.; PRASAD, S.; SINGH, B.; PRASAD, J.K.; GUPTA, H.P. Effect of including growth factors and antioxidants in maturation medium used for in vitro culture of buffalo oocytes recovered in vivo. **Animal Repro Science**. Vol. 113, p. 44-50, 2009.

SIRARD, M.A. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. **Theriogenology**, Vol.55, p.1241-1254, 2001.

SIRARD, M.A.; COENEN, K.; BILODEAUS. Effects of fresh or cultured follicular fractions on meiotic resumption in bovine oocytes. **Theriogenology**, Vol.37, p.39-57, 1992.

SLAMENOVA, D.; HORVATHOVA, E.; SRAMKOVA AND MARSALKOVA, L. DNA-protective effects of two components of essential plant oils carvacrol and thymol on mammalian cells cultured in vitro. **Neoplasma**, Vol. 54, p. 108-112, 2007.

SOMFAI, T.; IMAI, K.; KANEDA, M.; AKAGI, S.; WATANABE, S.; HARAGUCHI, S.; MIZUTANI, E.; DANG-NGUYEN, T.Q.; INABA, Y.; GESHI, M.; NAGAI, T. The effect of ovary storage and in vitro maturation on mRNA levels in bovine oocytes; a possible impact of maternal ATP1A1 on blastocyst development in slaughterhouse-derived oocytes. **J Reprod Dev**. Vol. 57, p.723–730, 2011.

STITZEL, M.L.; SEYDOUX, G. Regulation of the oocyte-to-zygote-transition. **Science**. Vol. 316 p.407-408, 2007.

STOJKOVIC, M.; MACHADO, S.A.; STOJKOVIC, P.; ZAKHARTCHENKO V.; HUTZLER, P.; GONÇALVES, P.B.; WOLF, E. Mitochondrial Distribution and Adenosine Triphosphate Content of Bovine Oocytes before and after in vitro maturation: Correlation with Morphological Criteria and Developmental Capacity after In vitro Fertilization and Culture. **Biology of Reproduction**, Vol.64, p.904-9009, 2001.

SURRESH, K.P.; NANDI, S.; MONDAL, S. Factors affecting laboratory production of buffalo embryos: A meta-analysis. **Theriogenology**, Vol.72, p.978-985, 2009.

TARAZONA, A.M.; RODRIGUEZ, J.I.; RESTREPO, L.F.; OLIVERA-ANGEL, M. Mitochondrial activity, distribution and segregation in bovine oocytes and in embryos produced in vitro. **Reprod Domest Anim**, Vol. 41, p. 5 –11, 2006.

TECHAKUMPHU, M.; PROMDIREG, A.; NA-CHIENGMAI, A.; PHUTIKANIT, N. Repeated oocyte pick up in prepubertal swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) calves after FSH superstimulation. **Theriogenology**, Vol. 61, p.1705–1711, 2004.

THOMAS, R.E.; THOMPSON, J.; ARMSTRONG, C.G.; GILCHRIST, R.B.; Bovine cumulus-cell-oocyte gap junctional communication during in vitro maturation in response of cell-specific cyclic adenosine 3', 5'- monophosphate cyclic levels. **Biology of Reproduction**, Vol. 70, p.548-556, 2004.

THOMPSON, J.G.; SIMPSON, A.C.; PUGH, P.A.; DONNELLY, P.E.; TERVIT, H.R. Effect of oxygen concentration on in-vitro development of pre implantation sheep and cattle embryos. **J. Reprod. Fertil**, Vol. 89, p. 573– 578, 1990.

VALE, W.G. Effects of environment on buffalo reproduction. **Ital. J. Anim. Sci.** Vol. 6, (Suppl. 2), p. 130-142, 2007

VAN BLERKOM, J.; DAVIS, P.; MATHWIG, V.; ALEXANDER, S. Domains of high-polarized and low-polarized mitochondria may occur in mouse and human oocytes and early embryos. **Hum Reprod**, Vol.17, p.393-406. 2002

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**. Vol.63, p.1717-51, 2005.

VAN SOOM, A.; YSEBAERT, M. AND DE KRUIF, A. Relationship between timing of development, morula morphology and cell allocation to the inner cell mass and trophectoderm in in vitro produced embryos. **Molecular Reproduction and Development**, Vol. 47, p. 47-56, 1997.

WANG, X.; FALCONE, T.; ATTARAN, M.; GOLDBERG, J.M.; AGARWAL, A.; SHARMA, R.K. Vitamin C and Vitamin E supplementation reduce oxidative stress-induced embryo toxicity and improve the blastocyst development rate. **Fertil Steril**.; Vol.78, p.1272-1277, 2002.

WARRIACH, H.M.; CHOCHAN, K.R. Thickness of cumulus cell layer is a significant factor in meiotic competence of buffalo oocytes. **J. Vet. Sci.** Vol.5,n.3, p.247–251, 2004.

WATSON, A.J. Oocyte cytoplasmic maturation: a key mediator of oocyte and embryo developmental competence. **J Anim Sci.**Vol.85, p.E1–E3, 2007.

WATSON, A.J.; DE SOUSA, P.; CAVENEY, A.; BARCROFT, L.C.; NATALE, D.; URQUHART, J.; WESTHUSIN, M.E. Impact of bovine oocyte maturation media on oocyte transcript levels, blastocyst development, cell number and apoptosis. **BMC Biology of Reproduction**, Vol.62, p.355-364, 2000.

WILDING, M.; DALE, B.; MARINO, M.; DI MATEO, L.; ALVIGGI, C.; PISATURO, L.M.; LOMBARDI, L.; DE PLACIDO, G. Mitochondrial aggregation patterns and activity in human oocytes and pre implantation embryos. **Hum. Reprod.** Vol. 16, p. 909–917, 2001.

YADAV, A.; SINGH, K.; SINGH, M.; SAINI, N.; PALTA, P.; MANIK, R.; SINGLA, S.; UPADHYAY, R. AND CHAUHAN, M. Effect of Physiologically Relevant Heat Shock on Development, Apoptosis and Expression of Some Genes in Buffalo (*Bubalus bubalis*) Embryos Produced In Vitro. **Reproduction in Domestic Animals**, Vol.48, p.858–865, 2013.

YANG, H.W.; HWANG, K.J.; KWON, H.C.; KIM, H.S.; CHOI, K.W.; OH, K.S. Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. **Hum. Reprod.** Vol. 13, p. 998–1002, 1998.

YINDEE, M.; TECHAKUMPHU, M.; LOHACHIT, C.; SIRIVAIIDYAPONG, S.; NACHIANGMAL, A.; ROELEN, B.A.J.; COLENBRANDER, B. Maturation Competence of Swamp Buffalo Oocytes Obtained by Ovum Pick-Up and from Slaughterhouse Ovaries. **Reprod Dom Anim.** Vol.46, p.824–831, 2011.

YOKOO, M.; SATO, E. Cumulus–oocyte complex interactions during oocytematuration, **Int. Rev. Cytol.** Vol. 91 p.235–251, 2004.

YOUSAF, K.A.; DEANS, S.G. Effect of thyme oil and thymol dietary supplementation on the antioxidant status and fatty acid composition of the ageing rat brain. **Br. J. Nutr.**, Vol.83, p. 87-93, 2000

YOUSAF, M.R.; CHOHAN, K.R. Nuclear morphology, diameter and meiotic competence of buffalo oocytes relative to follicle size. **Reprod. Fertil. Dev.** n.15, p.223–229, 2003.

YU, Y.; DUMOLLARD, R.; ROSSBACH, A.; LAI, F.A. Redistribubtion of mitochondria leads to burst of ATP production during spontaneous mouse oocyte maturation. **Journal of Cellular Physiology.** Vol. 224(3), p. 672–680, 2010

YUAN, Y.Q.; VAN SOOM, V.A.; COOPMAN, F.O.J.; MINTIENS, K.; BOERJAN, M.L.; VAN ZEVEEREN, A. KRUIF, A.; PEELMAN, L.J. Influence of oxygen tension on apoptosis and hatching in bovine embryos cultured in vitro, **Theriogenology**, Vol. 59, n. 7, p. 1585-1596, 2003.

ZICARELLI, L. Stagionalità riproduttiva nella bufala. In: **International Course of Biotechnology in Buffalo Reproduction**, 3 th Napoli, Italia. Proceedings ... Napoli: Bubalus bubalis Suppl., p. 29-52, 1997

ZOHEIR, K.M.A.; ADBOON, A.S.; MAHROUS, K.F.; AMER, M.A.; ZAHER, M.M.; LI-GUO, Y.; EL-NAHASS, E.M. Effects of season on the quality and in vitro maturation rate of Egyptian buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes. **Journal of Cell and Animal Biology**, Vol.1, p.29-33, 2007.

HIPÓTESES

Hipótese 1

A utilização de protocolos de sincronização da onda folicular em búfalas aumenta a qualidade e quantidade de oócitos recuperados pela aspiração folicular guiada por ultrassom em bubalinos. Além disso, considerando a fonte de obtenção dos oócitos, quando recuperado de frigorífico a quantidade e a qualidade de oócitos recuperados é superior comparado dos animais aspirados *in vivo*.

Hipótese 2

A redução da luminosidade dos dias proporciona aumento da qualidade e quantidade de oócitos recuperados tanto de frigorífico quanto por aspiração folicular guiada por ultrassom.

Hipótese 3

Adição do óleo essencial de *Lippia origanoides* durante a etapa de maturação *in vitro* destes oócitos melhora a competência de desenvolvimento dos mesmos, resultando em maiores taxas e melhor qualidade dos embriões produzidos *in vitro*.

OBJETIVOS

Para testar a hipótese 1 os objetivos foram:

- Avaliar os efeitos protocolos de sincronização da onda folicular de doadoras bubalinas sobre o número e a qualidade de oócitos recuperados por aspiração folicular guiada por ultrassom;
- Comparar a fonte de obtenção de oócitos (ovários de frigorífico x ovários aspirados de animais *in vivo*) sobre a qualidade e quantidade de oócitos recuperados;

Para testar a hipótese 2 os objetivos foram:

- Avaliar o efeito da sazonalidade sobre a qualidade e quantidade de oócitos bubalinos recuperados de ovários oriundos de frigorífico e por aspiração folicular guiada por ultrassom e a produção final de embriões tendo como parâmetro os embriões bovinos produzidos no mesmo período;

Para testar a hipótese 3 os objetivos foram:

- Avaliar o efeito da adição do antioxidante *Lippia origanoides* no meio de maturação *in vitro* sobre a maturação oocitária, produção e qualidade dos embriões produzidos *in vitro* de bovinos e bubalinos;

- Comparar as taxas de maturação nuclear e citoplasmática, produção e nível de apoptose dos embriões produzidos *in vitro* de bovinos e bubalinos submetidos as mesmas condições.

CAPÍTULO 1

Trabalho a ser submetido à revista “Reproduction in Domestic Animals”

As normas de publicação exigidas pelo periódico estão disponíveis no site:

[http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1439-0531](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1439-0531)

**Eficiência da sincronização do crescimento da onda folicular na produção de
oócitos de bubalinos**

RESUMO

O reduzido número e a baixa qualidade dos oócitos recuperados em bubalinos são fatores que limitam a produção *in vitro* de embriões em larga escala nesta espécie. Estratégias como a utilização de gonadotrofinas são adotadas no intuito de aumentar o número de estruturas recuperadas. Diante disso, o presente estudo buscou averiguar o efeito de diferentes protocolos de sincronização da onda folicular de doadoras de oócitos bubalinas sobre o número de folículos, a taxa de recuperação, o número de oócitos produzidos e a qualidade dos mesmos, tendo como controle os oócitos obtidos a partir de animais de abatedouro. Foram utilizadas 12 búfalas adultas submetidas a diferentes protocolos de sincronização de crescimento folicular que resultavam na aspiração dos folículos guiada por ultrassom (OPU) 2 ou 3 dias após a emergência da onda folicular. Os tratamentos foram constituídos de: Tratamento 1(T1); animais não protocolados com OPU realizada em dia aleatório do ciclo estral. Tratamento 2 (T2); onda de crescimento folicular reiniciada com aspiração prévia de todos folículos ovarianos, realizando-se a OPU 3-4 dias depois. Tratamento 03 (T3); Colocação de dispositivo intravaginal de liberação lenta de progesterona (1g Progesterona) por 6 dias, associado a 2mg de benzoato de estradiol, 50mg de progesterona injetável e 150µg de prostaglandina (d-cloprostenol), sendo a OPU realizada na retirada do implante. Tratamento 04 (T4); similar ao T3, no entanto, no T4 foi aplicado no D4 à tarde ou D5 pela manhã, 36-48 horas antes da OPU, 100mg de Hormônio Foliculo Estimulante. No momento da OPU, os animais foram avaliados quanto ao número e tamanhos dos folículos, classificando-os em pequenos (2-5 mm), médios (6-9 mm) e grandes (≥ 9 mm). Após a coleta, os oócitos foram processados e classificados de acordo com as características morfológicas em: Grau A, Grau B, Grau C, Grau D, expandidos ou desnudos. Ovários de abatedouro foram coletados contemporaneamente e o mesmo critério de avaliação dos oócitos foi utilizado para os mesmos. Para análise estatística foi realizado o teste ANOVA/Teste Duncan ou Teste Kruskal-Wallis e o nível de significância considerado foi $p < 0,05$. Quando se realizou a aspiração prévia dos folículos para reiniciar a onda de crescimento folicular (T2) notou-se uma redução do número de folículos e da qualidade de oócitos recuperados ($p < 0,05$). O tamanho dos folículos não diferiu entre os tratamentos ($p > 0,05$). Comparando a fonte de obtenção dos oócitos, quando oriundos de frigoríficos, os ovários apresentam maior número de folículos e oócitos recuperados, além de maior qualidade dos oócitos recuperados comparado aos recuperados pela OPU ($p < 0,05$). Diante disso, podemos

afirmar que os protocolos propostos não foram eficientes para melhorar o número e a qualidade de estruturas recuperadas na OPU, e quando se utiliza os ovários de frigorífico como fonte de oócitos, a qualidade e o número de estruturas recuperadas é superior comparada aos animais aspirados *in vivo*.

1. Introdução

Tecnologias de reprodução assistida como a inseminação artificial (IA), a transferência de embriões *in vivo* (TE) e produção de embriões *in vitro* (PIVE) representam excelentes alternativas para aumentar o número de descendentes de animais selecionados no rebanho, reduzindo assim o intervalo entre gerações e proporcionando significativo incremento genético nos rebanhos bubalinos (Suresh et al. 2009). Associado a isso, em razão da ineficiência da TE em bubalinos, devido as baixas taxas de recuperação de embriões (Carvalho et al. 2011), a PIVE tem ganhado uma importância ainda maior nestes animais. Dentre as etapas que constituem a PIVE, a obtenção de oócitos é determinante para predizer a capacidade de produção final de cada animal pois irá definir o número de estruturas que eventualmente serão utilizadas no sistema de produção dos embriões (Kumar e Anand, 2012).

A aspiração de ovários de matadouro e aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassom (OPU) de animais vivos, descrita com sucesso em bufálas (Neglia et al. 2003), constituem as principais fontes de obtenção de oócitos em bubalinos para PIVE. Apesar de não haver diferença em relação ao número de estruturas recuperadas, demonstrou-se que a taxa de produção de blastocistos é significativamente maior ($30,7\% \pm 4,3$ vs $18,5\% \pm 1,8$) quando a fonte utilizada de oócitos são os animais vivos (Manjunatha et al. 2008). Entretanto, o número de estruturas viáveis recuperadas/búfalo/sessão de OPU, que varia entre 0,7 (Di Francesco et al. 2012) e 3,26 (Liang et al. 2008) na maioria dos trabalhos encontrados, ainda é muito insatisfatória quando comparado a média de 23,35 oócitos obtidos na OPU de bovinos da raça Nelore (Pontes et al. 2011). Além do mais, a competência dos oócitos recuperados parece ser altamente influenciada pela sazonalidade, reportada em bubalinos (Di Francesco et al. 2012). Particularmente em búfalas, o reduzido número e qualidade dos oócitos recuperados através da OPU ainda representa um limitante para PIVE, visto que em algumas situações o pequeno número estruturas inviabiliza a produção final de embriões.

Diante disso, a estimulação da proliferação folicular com gonadotrofinas exógenas e a sincronização do ciclo estral parecem ser alternativas viáveis para otimizar

a PIVE (Techakumphu et al. 2004; Getz et al. 2011). Em bovinos foi demonstrado que a eliminação do efeito do folículo dominante (FD), por aspirações realizadas com a frequência de duas vezes por semana, pode melhorar a qualidade dos oócitos recuperados justamente pela eliminação do efeito do FD sobre os outros folículos (Merton et al. 2003). Já a pré-estimulação com FSH demonstrou melhorar tanto a qualidade dos oócitos recuperados em bovinos (Ramos et al. 2006) como o número de folículos disponíveis para a OPU em bubalinos (Promdireg et al. 2005).

Considerando a situação exposta, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes protocolos de sincronização de doadoras de oócitos bubalinas sobre a população folicular, a taxa de recuperação, o número de oócitos produzidos e a qualidade dos mesmos, tendo como controle os oócitos de abatedouro.

2. Material e Métodos

Animais

Todos procedimentos realizados durante a etapa experimental foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP/Botucatu, protocolo nº92/2014-CEUA.

Este estudo foi conduzido no Centro de Biotecnologia em Bubalinocultura pertencente a Universidade Federal de Minas Gerais, localizando no município de Pedro Leopoldo/MG, durante 12 meses, de junho de 2014 até abril de 2015. Foram utilizadas 12 búfalas mestiças (Murrah x Mediterrâneo), com idade aproximada de 2 anos e escore corporal variando de 3 a 4, em uma escala de 1 a 5. Estes animais apresentavam-se em período de lactação e sem nenhuma alteração no exame ginecológico realizado previamente ao experimento. As búfalas foram mantidas em piquetes com alimentação à pasto e água *ad libitum* durante o período de outubro a março. No período de menor oferta de alimentos, as mesmas receberam suplementação com silagem e concentrado.

Sincronização da onda de crescimento folicular

A emergência da onda de crescimento folicular foi realizada por meio da aspiração e tratamento hormonal, conforme esquematizado na Figura 1. Todos os tratamentos, exceto o tratamento 1, objetivaram sincronizar os animais para que a aspiração fosse realizada no dia 2 (D2) ou 3 (D3) após a emergência da onda folicular. O tratamento 1 (T1) constituiu na aspiração folicular dos animais em dia aleatório do ciclo estral. No tratamento 2 (T2), a onda de crescimento folicular já reiniciada com uma aspiração prévia e exatamente 2-3 dias após realizou-se o procedimento de OPU. Considerando que a

aspiração de todos os folículos representaram uma forma mecânica de reinício da onda de crescimento folicular, esse dia era considerado o D0, enquanto a aspiração válida para o tratamento foi realizada no D2-D3 da onda de crescimento folicular. No tratamento 3 (T3), em dia aleatório do ciclo estral foi inserido um dispositivo intravaginal de liberação lenta de progesterona (1g Progesterona, Sincrogest®, Ouro Fino Saúde Animal), associado a 2mg de benzoato de estradiol (Ciclovar®, Jofadel) e 50mg de progesterona injetável (Sincrogest®, Ouro Fino Saúde Animal). Com intuito de provocar a lise do corpo lúteo aplicou-se 150µg de prostaglandina (150µg de D-cloprostenol; Ciosin®, MSD Saúde Animal). O período de permanência do dispositivo intravaginal foi de 6 dias, sendo que a aspiração foi realizada no ato da retirada do implante. De acordo com Gimenes (2010), estima-se que o início de uma nova onda ocorra 3-4 dias após aplicação de BE no D0, sendo assim, a OPU foi realizada no D2 ou D3 do ciclo estral. O tratamento 4 (T4) foi semelhante ao tratamento 3, no entanto, no T4 com intuito de aumentar o tamanho e facilitar a visualização dos folículos, foi aplicado no D4 à tarde ou D5 pela manhã, 36-48 horas antes da aspiração, 100mg de hormônio folículo estimulante (FSH) (Folltropin®, Bioniche Animal Health).

Todos os animais passaram por todos os protocolos de sincronização, em delineamento experimental alternado (“*cross-over*”), de forma que todas as búfalas foram submetidas a cada tratamento experimental aproximadamente o mesmo número de vezes. Como foram executadas aspirações durante o período de 12 meses, sempre mesclando a realização dos tratamentos experimentais em cada sessão de OPU, o efeito do fotoperíodo sobre os tratamentos foi desconsiderado neste experimento.

Tratamento	Protocolo
T1	OPU em dia aleatório do ciclo estral
T2	-----↑-----◻
T3	↓-----◻ CIDR
T4	↓-----Δ-----◻ CIDR
	Dias 0 1 2 3 4 5 6

Figura 1 – Representação esquemática dos tratamentos utilizados para sincronização do momento da aspiração folicular. ↑= remoção de todos folículos ≥ 2 mm do ovário por aspiração folicular; ↓= colocação do implante intravaginal de 1g progesterona + 2mg de

benzoato de estradiol + 50mg de progesterona injetável + 150 µg de D-cloprostenol; Δ= 100mg de FSH; ◻= OPU.

Aspiração folicular guiada por ultrassom

Foram realizadas 12 sessões de OPU na qual foram aspirados 7-8 animais/sessão, incluídos em diferentes tratamentos. As aspirações foram realizadas com intervalo médio de 20 dias, tempo suficiente para surgimento de nova onda de crescimento folicular, descartando o efeito da frequência de aspiração.

Para realização da OPU os animais foram contidos no brete e seguidamente foram submetidos à anestesia epidural. A aplicação de 3mL de lidocaína 2% (Lidovet®, Bravet) foi realizada entre a última vertebra sacral e primeira coccígena e pouco depois, o sucesso do procedimento foi confirmado pela perda dos reflexos da cauda. Na sequência, removeu-se manualmente todo excesso de fezes e realizou-se a higienização da região perineal e vulva com água e sabão.

Anteriormente a cada procedimento de aspiração, todos os folículos do ovário foram contados e, em metade das sessões de OPU, realizou-se a mensuração dos folículos para classificá-los em: pequenos (2-5 mm), médios (6-9 mm) e grandes (≥ 9 mm), como anteriormente descrito por Promdireg et al. (2005). O procedimento de avaliação dos folículos assim como a aspiração folicular foi realizada com aparelho de ultrassonografia (DP-2200, Mindray®) acoplado a uma probe microconvexa multifrequencial, usada na frequência de 7,5 MHz. A essa probe foi acoplada uma guia de aspiração folicular (WTA-Watanabe Tecnologia Aplicada®) que sustentava uma linha de aspiração folicular de teflon de 1,7 mm de diâmetro e 80 cm de comprimento e uma agulha de 1,3 x 83mm (18G) (WTA- Watanabe Tecnologia Aplicada®). A pressão da bomba de vácuo utilizada foi de aproximadamente 70-80mmHg (12 a 15 mL água/minuto). O sistema de aspiração foi previamente lavado com solução fisiológica 0,9% acrescida de heparina sódica (5000 UI/mL; Hemofol®, Cristália) e 1% de soro fetal bovino (SFB; Nutricell), previamente aquecida a 37 °C, que após a lavagem permaneceu no tubo de coleta. Todos os folículos $\geq 2,0$ mm, visíveis no ultrassom foram puncionados e recolhidos em tubo cônico de 50mL.

Processamento dos oócitos

Após o procedimento de aspiração o tubo foi identificado e imediatamente levado até o laboratório montado na própria fazenda para rastreamento e classificação. No laboratório o conteúdo do tubo foi passado para um filtro de colheita de embriões (WTA-Watanabe Tecnologia Aplicada®) e lavado com meio usado na OPU até a obtenção de

um líquido translúcido. Em seguida, o conteúdo do filtro foi vertido em uma placa Petri 100 x 20mm que foi levada até uma lupa estereoscópica para a procura, lavagem e classificação dos complexos *cumulus* oócitos recuperados. Os oócitos foram classificados em diferentes categorias de acordo com a morfologia, seguindo a classificação padrão adotada para bubalinos, proposta por Di Francesco et al. (2011): grau A; oócitos com citoplasma homogêneo e com toda superfície cercada de várias camadas de células do *cumulus*; grau B; oócitos com citoplasma homogêneo e com pelo menos 70% da superfície envolvida por múltiplas camadas de células do *cumulus*; grau C; oócitos com poucas camadas de células; grau D; oócitos com evidentes sinais de degeneração citoplasmática; Expandidos; oócitos envolvidos por células do *cumulus* expandidas e com clusters; Desnudos; oócitos completamente sem células do *cumulus*.

Após a classificação, os oócitos foram lavados em gotas de aproximadamente 70µL de meio de lavagem (ML) (TCM 199 Hepes + 10% SFB + 22µg/mL piruvato + 83,4 µg/mL de amicacina) e armazenados em criotubos de 2mL nesta mesma solução, na qual foram transportados à uma temperatura de 37°C em garrafa térmica em um intervalo máximo de 2 horas até o Laboratório de Células Tronco Embrionárias e Animais Transgênicos da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Ao chegar no laboratório, os oócitos foram reclassificados e colocados no meio de maturação objetivando a produção *in vitro* de embriões. No entanto, o desenvolvimento dos embriões foi comprometido em razão da contaminação que ocorreu durante a etapa de fertilização *in vitro*, em várias sessões de aspiração. Assim, mesmo após a substituição do antibiótico e solução do problema, os dados foram excluídos e esta etapa experimental foi desconsiderada neste trabalho.

Coleta e processamento dos ovários de frigorífico

Para efeito de comparação da fonte de obtenção dos oócitos, durante o mesmo período das aspirações (junho de 2014 até abril de 2015) foram coletados ovários de búfalas em lactação abatidas em um frigorífico localizado na cidade de Pará de Minas, MG. Os ovários foram coletados no momento da evisceração dos animais e foram imediatamente colocados em solução salina à 37°C. Dentro de um intervalo máximo de 2 horas os ovários foram transportados para o Laboratório de Células Embrionárias e produção de Animais Transgênicos/UFMG onde foram devidamente processados.

Ao chegar no laboratório o número de folículos visíveis de cada ovário foi registrado e todos foram aspirados com auxílio de uma agulha 40x12mm acoplada a uma

seringa de 3mL. O líquido proveniente da aspiração foi reunido em um tubo de 15mL até o total preenchimento do mesmo. Em seguida, este tubo foi lacrado e aguardou-se dez minutos após a aspiração do último ovário para promover a decantação dos oócitos. Após este intervalo, retirou-se cuidadosamente todo sobrenadante do tubo até restar aproximadamente 3 mL. O conteúdo restante foi vertido em uma placa de Petri de 100 x 20 mm para o rastreamento dos oócitos. Utilizou-se o mesmo ML descrito na OPU para fazer a lavagem do tubo, facilitando a visualização dos oócitos. Todos os oócitos encontrados foram classificados seguindo os parâmetros descritos por Di Francesco et al. (2011), nas quais foram também usados para os oócitos recolhidos por OPU. Em seguida, os oócitos grau A e B foram utilizados para produção de embriões, contudo, em razão deste procedimento não ter sido realizado com oócitos da aspiração de animais *in vivo*, os dados não puderam ser utilizados a título de comparação, logo, não foram considerados neste trabalho.

Análise estatística

O teste de Shapiro Wilk foi utilizado para avaliar a normalidade das variáveis contínuas: número de folículos visualizados, número de oócitos totais recuperados, taxa de recuperação (número de oócitos totais/número de folículos visualizados) e qualidade dos oócitos recuperados (grau A, B, C, D, expandido e desnudo).

Para análise das variáveis contínuas em relação ao tipo de tratamento realizado, as variáveis normais e as que atenderam as premissas de normalidade após a transformação foram analisadas pelo teste ANOVA seguido do teste Duncan. Na impossibilidade de se obter a normalidade das variáveis, a análise estatística foi realizada pelo teste Kruskal-Wallis. Para a realização da análise das variáveis contínuas de acordo o tipo de recuperação dos oócitos (frigorífico x OPU), utilizou-se o teste de Mann-Whitney.

Todas as análises foram realizadas com a versão 17.0 do programa SPSS (SPSS Inc, Chicago, EUA), e o nível de significância considerado foi de $p < 0,05$.

3. Resultados

De acordo com a Tabela 1, o número de folículos observados em animais submetidos ao tratamento 2 (T2) de sincronização da onda de crescimento folicular com a própria aspiração, não diferiu dos animais não sincronizados (T1) ($p > 0,05$), porém, foi inferior aos animais sincronizados com tratamentos hormonais (T3 e T4) ($p < 0,05$). Em relação a qualidade, o número de oócitos grau A recuperados no tratamento T3 foi

superior aos oócitos recuperados no T2 ($p<0,05$), não diferindo dos outros tratamentos. Por outro lado, a taxa de recuperação de oócitos, o número de oócitos recuperados por animal e o número de oócitos grau B, grau C, grau D, desnudos e expandidos não alterou entre os animais submetidos aos diferentes tratamentos ($p>0,05$).

Como demonstrado na Tabela 2, os tratamentos de sincronização da onda folicular em bubalinos, seja utilizando hormônios (T3, T4) ou não (T2), não alterou o número médio de folículos pequenos, médios e grandes encontrados no momento da aspiração, já que não diferiram dos animais não sincronizados (T1) ($p>0,05$). Não houve diferença também entre o número total de folículos observados no momento da OPU entre os diferentes tratamentos ($p>0,05$). Entretanto, comparando o número de folículos entre o mesmo grupo observou-se maior número de folículos pequenos em relação aos folículos médios e grandes ($p<0,05$).

Comparando o tipo de recuperação dos oócitos (frigorífico x OPU), encontrou-se que o número de folículos/ovário e o número de oócitos recuperados/ovários encontrados em ovários oriundos de matadouro foi maior do que em ovários submetidos a OPU em animais *in vivo* ($p<0,0001$) (Tabela 03). Porém, a taxa de recuperação dos oócitos, determinada pelo número de oócitos recuperados dividido pelo número de folículos presentes, não diferiu, considerando-se a fonte de obtenção dos oócitos ($p=0,63$). Em relação a qualidade dos oócitos recuperados, o número de oócitos grau A, grau B e expandidos recuperados a partir de ovários de matadouro foi superior em relação aos oócitos recuperados pela OPU ($p<0,001$). Não foi encontrada diferença entre o número de oócitos grau C ($p=0,53$), grau D ($p=0,07$) e desnudos ($p=0,27$) por ovário quando se comparou a recuperação a partir de frigorífico ou pela OPU.

4. Discussão

Uma das maiores limitações para produção de embriões *in vitro*, principalmente em bubalinos, é o número de estruturas recuperadas durante a aspiração folicular guiada por ultrassom (Gasparrini, 2011). Acredita-se que este fator esteja ligado as características inerentes a espécie, que incluem menor tamanho dos ovários (Leal et al. 2007), menor número de folículos primordiais (Le-Van et al. 1989) e antrais (Le-Van et al. 1993) e maior número de folículos em atresia (Palta et al. 1998). A ocorrência de menor número de oócitos remetidos para a PIVE implica não somente na menor produção total de embrião mas também menores taxas de embriões produzidos, visto que existe um efeito considerável de sinergismo entre os embriões durante o cultivo *in vitro* (O'Neill,

1997). Tendo em vista a restrição encontrada nesta espécie, protocolos e estratégias para elevar a qualidade e o número de oócitos recuperados têm sido descritas em bubalinos (Techakumphu et al. 2000b; Promdireg et al. 2005).

A realização de uma punção em todos folículos ovarianos, anteriormente a sessão de OPU para PIVE, é descrita como um método eficiente para eliminação de todos folículos presentes no ovário >2mm. Este procedimento garante que a população folicular seja uniformemente renovada proporcionando menor grau de atresia dos folículos na nova onda (Boni et al. 1995; Boni et al. 1996; Gasparrini, 2011) e impede a dominância de alguns folículos sobre os subordinados (Neglia et al. 2011). Esta manipulação da população folicular é inclusive utilizada em búfalas submetidas à protocolos de superovulação (Zicarelli et al. 1995). Entretanto, no presente trabalho notou-se que aspiração prévia dos folículos do ovário para reinício da onda não só diminuiu o número total de folículos como reduziu a quantidade de oócitos grau A recuperados. Estudos tem apontado que a média de folículos disponíveis não diferem quando estes são colhidos em intervalos 2, 3 e 4 dias (Gasparrini, 2011; Pavasuthipaisit et al. 1995). Por outro lado, quando as búfalas foram puncionadas duas vezes por semana observou-se uma redução de folículos disponíveis e competência oocitária comparado aos animais aspirados semanalmente (Pavasuthipaisit et al. 1995; Neglia et al. 2011), corroborando com os resultados do presente trabalho. Apesar da comprovação de que punções ovarianas realizadas duas vezes na semana seja tempo suficiente para recrutamento de nova onda folicular em búfalas (Baruselli et al. 1997), acredita-se que a OPU realizada três dias após o reinício da onda no presente trabalho, induzida pela punção de todos folículos, não tenha sido tempo suficiente para aparecimento de estruturas maiores que 3mm visíveis ao ultrassom, capazes de serem aspiradas.

Apesar de não ter sido notado uma diferença estatística, neste estudo percebeu-se uma tendência do número de folículos disponíveis nos ovários ser maior nos animais hormonalmente sincronizados frente aos animais não sincronizados, corroborando com os resultados encontrados em bovinos por Seneda et al (2005). De forma geral, no presente trabalho, tanto de animais sincronizados ou não, a maioria dos oócitos recuperados foram de boa qualidade (grau A +B), confirmando os achados de Promdireg et al. (2005). A taxa de recuperação dos oócitos encontrada no presente experimento variou de 33,35 a 57,40%, semelhante aos valores de 51,9% a 56,3 % encontrados por Techakumphu et al.(2000b) na OPU em bubalinos.

A utilização de hormônios para reinício da onda de crescimento folicular condiciona a aspiração no momento onde não haja estabelecimento de dominância dos folículos, proporcionando uma melhor qualidade dos mesmos (Gimenes et al. 2015). Contudo, no presente trabalho, entre os animais sincronizados com utilização de hormônios, não foi observada diferença no número de folículos, número de oócitos e na qualidade dos oócitos recuperados quando se utilizou ou não o FSH. A aplicação de FSH exógeno contribuiu para o resgate de pequenos folículos e folículos em estágio inicial de atresia, fornecendo um ambiente apropriado para seu desenvolvimento (Taneja et al. 1995; Reis et al. 2002). Diante disso, vários trabalhos apontaram um incremento no número de folículos disponíveis para OPU quando tratados com FSH tanto em animais pré púberes (Techakumphu et al. 2000a) como em animais cíclicos e em lactação (Promdireg et al. 2005). De acordo com estes estudos a administração do FSH promove o aumento da disponibilidade de folículos antrais, de oócitos colhidos e da qualidade dos oócitos e embriões transferidos por sessão (Boni 1994; Boni et al. 1997; Techakumphu et al. 2000a, b; 2004), fato não comprovado no presente estudo. Por outro, em concordância com o presente trabalho, Promdireg et al. (2005) não apontaram melhoria da qualidade dos oócitos quando os animais foram tratados com FSH exógeno. Todavia, no presente estudo utilizou-se 100mg de FSH, quantidade menor do que os 180mg e 400mg fracionado em seis doses utilizada em trabalhos anteriores (Techakumpu et al. 2004a, Promdireg et al. 2005). Além disso, uma única aplicação de FSH, assim como demonstrado por Seneda et al. (2005) em bovinos, pode não ser suficiente para provocar um efeito superestimulatório e aumentar o número de folículos disponíveis. Outra hipótese é que o tempo de aplicação do FSH antes da OPU utilizada neste trabalho (36-48 horas antes da OPU) não tenha sido suficiente para provocar um efeito superestimulatório nos animais.

Folículos de maior tamanho demonstraram ter melhor competência de desenvolvimento do que folículos pequenos em bubalinos (Raghu et al. 2002; Manjunatha et al. 2007). Todavia, folículos de tamanho grande (>9mm) não são desejáveis durante o procedimento da OPU em razão de dificultar a execução do procedimento, ocupar grande área física no ovário, provocar efeito atrésico em folículos circunvizinhos e reduzir as taxas de recuperação de oócitos (Seneda et al. 2005). Adicionalmente, foi demonstrado que o folículo dominante é capaz de atuar negativamente sobre a competência dos oócitos provenientes de folículos subordinados (Manjunatha et al. 2007). Diante disso, quando trabalha-se com aspiração para posterior produção *in vitro* de embriões, o que se busca é

uma população folicular padronizada, evitando o excesso de folículos muito grandes. Tais estruturas poderiam dificultar a recuperação dos oócitos assim como a manipulação do ovário após aspiração do folículo dominante e provocar o extravasamento de líquido folicular (Seneda et al. 2005). No presente estudo foi observado que os tratamentos de sincronização não alteraram o número de folículos pequenos, médios e grandes nos ovários. Os resultados encontrados divergem dos encontrados por Techakumphu et al. (2000b) que encontraram elevação do número de folículos pequenos e médios em búfalas sincronizadas com FSH e GnRH. Na presente pesquisa quando se comparou dentro de cada tratamento, o número de folículos menores foi maior do que os folículos médios e grandes, mesmo nos animais não sincronizados. Estes achados estão de acordo com os encontrados por Techakumpu et al. 2004 e Promdireg et al. (2005), os quais verificaram que a administração do FSH eleva não somente o número de folículos disponíveis mas o número de folículos menores. Contudo, a não observação do aumento de folículo menores nos animais sincronizados comparado aos animais não sincronizados pode ser explicado pela não utilização do GnRH nos protocolos, que demonstrou elevar o número de folículos pequenos e médios quando utilizado em protocolos de sincronização (Techakumphu et al. 2000b). Segundo este autor a combinação GnRH com FSH proporciona maior disponibilidade de FSH sérico, responsável pela seleção de folículos para crescimento.

O método de obtenção dos COCs é também discutido cientificamente pois pode interferir diretamente na produção de embriões *in vitro* em bubalinos. A colheita de oócitos de ovários de abatedouro é uma forma fácil e de baixo custo para obtenção de gametas femininos para PIVE. Estudos têm mostrado que, embora a qualidade dos oócitos de matadouro seja melhor (Neglia et al. 2003), a competência dos oócitos é inferior quando comparados a oócitos aspirados de animais *in vivo* (Neglia et al. 2003; Manjunatha et al. 2008). Em bovinos foi demonstrado que a melhoria da qualidade dos oócitos obtidos de frigorífico ocorre devido a manutenção das características da integridade destes após a aspiração, em razão da perda de aderência das células do *cumulus* à parede folicular, consequência do efeito *post-mortem* (Merton et al. 2003). Entretanto, estas características morfológicas não condizem com a competência oocitária, uma vez que os mesmos autores, ao comparar os oócitos cujas fontes foram frigorífico e OPU, encontraram maiores taxas de produção de blastocistos quando aspirados *in vivo*. Essa situação pode ser justificada pelo fato das búfalas destinadas ao abate, na maioria das vezes, serem animais produtores de leite apresentando baixo escore corporal, de idade

avançada e/ou apresentarem problemas reprodutivos, razão pela qual estão sendo descartadas (Gasparrini, 2011). Outra hipótese é que o tempo de transporte dos ovários desde a evisceração dos animais até o processamento no laboratório possa causar efeitos deletérios na capacidade de desenvolvimento dos oócitos, por persistirem mais tempo em ambiente inapropriado comparado aos recuperados pela OPU. Esta situação é mais agravada em bubalinos, por possuírem oócitos mais sensíveis ao estresse comparados à bovinos (Neglia et al. 2003).

No presente trabalho observou-se que o número de oócitos recuperados/ovário dos animais de frigorífico foi superior aos animais da OPU, tendo relação direta com o número de folículos visualizados, concordando com os dados revisados por Drost (2007) e Gasparrini (2011). Corroborando com estes achados, Manjunatha et al. (2007) definiram que ovários de bubalinos de frigorífico fornecem em média 2,7 oócitos/ovário enquanto búfalas aspiradas *in vivo* apresentam 1,16 oócito/animal (Neglia et al. 2011). Acredita-se que este evento ocorra em razão da facilidade de visualização dos folículos dos ovários de frigorífico no momento da aspiração comparado a visualização ultrassonográfica dos folículos durante a OPU. Apesar de não ter encontrado diferença entre as taxas de recuperação no presente estudo, o número de oócitos/doadora foi superior durante a aspiração dos ovários de frigorífico, refletindo o maior número de folículos identificados nestes animais. Os valores de 3,89 oócitos/ovários recuperados no presente trabalho estão próximo aos valores de 2,2 (Zoheir et al. 2007), 2,58 (El-Naby et al. 2013), 3,6 (Amer et al. 2008) e 4,1 (Di Francesco et al. 2011) descritos na literatura.

Em relação a qualidade dos COCs, encontrou-se maior número de estruturas grau A e B nos COCs recuperados de frigorífico comparado à OPU. Estes achados estão de acordo com Neglia et al. (2003) que também encontraram melhor qualidade dos oócitos bubalinos quando recuperados de matadouro. Maior quantidade de oócitos morfolologicamente superiores, representa uma importante característica para os sistemas de produção *in vitro* de embriões em búfalos, visto que aumenta a disponibilidade de estruturas possíveis de serem introduzidas no sistema, embora não necessariamente reflita em maiores taxas de produção de embriões. Além disso, observou-se maior número de COCs expandidos quando a fonte de oócitos foi de ovários de frigorífico. Acredita-se que animais submetidos a aspiração *in vivo*, por serem submetidos a maior frequência de aspirações e programas de sincronização, impede o estabelecimento de dominância de folículos, reduzindo o número de oócitos expandidos recuperados comparados aos animais de frigorífico, concordando com o encontrado por Manjunatha et al. (2007).

A punção de todos os folículos previamente a OPU para PIVE reduziu o número de folículos disponíveis para aspiração e o número de oócitos grau A em animais sincronizados ou não. A utilização de 100mg de FSH em dosagem única, 36-48 horas antes da OPU não promoveu aumento no número de folículos, no número de oócitos recuperados nem mesmo efeito benéfico sobre a qualidade dos folículos recuperados. Além disso, a realização da sincronização com utilização de hormônios ou por meio da punção dos folículos, não promoveu efeito sobre o tamanho dos folículos em búfalas. Por fim, encontrou-se que quando a fonte de obtenção dos oócitos foi o frigorífico, maior número de COCs totais, grau A e grau B são recuperados durante a aspiração, fornecendo maior número de estruturas para o procedimento de PIVE.

5. Conclusão

Os protocolos de sincronização das doadoras de oócitos bubalinos não alteraram a população folicular, a taxa de recuperação, o número de oócitos recuperados por sessão de aspiração e a qualidade dos mesmos, exceto quando se aspirou o ovário previamente a OPU visando restabelecer nova onda de crescimento folicular. Neste caso, observou-se uma redução da população folicular e do número de COCs grau A recuperados. Além disso, constatou-se que ovários de animais de frigorífico possuem maior número de folículos/ovário e fornecem maior quantidade de COCs totais e COCs grau A, B e expandidos comparado a aspiração folicular guiada por ultrassom de animais *in vivo*.

Agradecimento

Este trabalho foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil (096/10).

Referências

- Amer HA, Hegab AO, Zaabal SM, 2008: Effects of ovarian morphology on oocyte quantity and quality, granulosa cells, in vitro maturation, and steroid hormone production in buffaloes. *Anim. Reprod* **5**, 55-62.
- Baruselli PS, Mucciolo RG, Visintin JA, Viana WG, Arruda RP, Madureira EH, Oliveira CA, Molero-Fiho JR, 1997: Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology* **47**, 1531–1547.

- Boni R, 1994: In vivo collection of oocytes and embryos in bovine and buffalo species. *Buffalo J* **2**, (Suppl) 161–171.
- Boni R, Zicarelli L, Kruip TAM, 1995: Impact of Ovum Pick-Up (OPU) technique for research and animal breeding. In: Enne G, Greppi GF, Lauria A (Ed.). *Reproduction and Animal Breeding: Advances and Strategy*. Amsterdam: Elsevier. pp. 211-221.
- Boni R, Roviello S, Campanile G, Di Palo R, Zicarelli L, 1995: Single ovum pick-up performed from the sixth to the eleventh estrous cycle day in buffalo cows. In: *Proceedings of the Symposium on Reproduction Animal Breeding: Advances and Strategies*. pp. 357-358.
- Boni R, Roviello S, Zicarelli L, 1996: Repeated ovum pick up in Italian Mediterranean buffalo cows. *Theriogenology* **46**, 899-909.
- Boni R, Roviello S, Gasparini B, Zicarelli L, 1997: Pregnancies established after transferring embryos yielded by ovum pick-up and in vitro embryo production in Italian buffalo cows. *Proc V World Buffalo Congress, Caserta, Italy*, pp. 787–792.
- Carvalho NAT, Bombonato PP, D'Angelo M, Baruselli OS, 2011: Caracterização anatomofuncional do sistema genital de fêmeas bubalinas (*Bubalus bubalis*) e suas implicações na múltipla ovulação e transferência de embriões. *Rev. Bras. Reprod. Anim* **35**, 95-103.
- Di Francesco S, Boccia L, Campanile G, Di Palo R, Vecchio D, Neglia G, Zicarelli L, Gasparini B, 2011: The effect of season on oocyte quality and developmental competence in Italian Mediterranean buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Anim Reprod Sci* **123**, 48–53.
- Di Francesco S, Novoa MV, Vecchio D, Neglia G, Boccia L, Campanile G, 2012: Ovum pick-up and in vitro embryo production (OPU-IVEP) in Mediterranean Italian buffalo performed in diferente seasons. *Theriogenology* **77**, 148-145.
- Drost M, 2007: Advanced reproductive technology in the water buffalo. *Theriogenology*, **68**, 450-453.

El-Naby ASAAH, Mahmoud KGHM, Ahmed YF, Abouel-Roos MEA, Abdel-Ghaffar AE, 2013: Effect of Season of the year and Ovarian Structures on Oocytes Recovery Rate, Quality and Meiotic Competence in Egyptian Buffaloes. *Global Veterinaria* **10**, 408-412.

Gasparrini, B, 2011: Ovum pick-up and in vitro embryo production in buffalo species: na update. *Acta Sci Vet* **39** (Suppl1), 317- 335.

Getz I, Karadjole M, Matkovic M, Karadjole T, Bacic G, Makek Z, Grizelj J. Cergolj M, Macesic N 2011: Comparison of different synchronization treatments in donor heifers for embryo production *in vitro*. *Veterinarski Arhiv* **81**, 545-556.

Gimenes LU, Fantinato Neto P, Arango JSP, Ayrea H, Baruselli PS, 2009: Follicular dynamics of *Bos indicus*, *Bos taurus* and *Bubalus bubalis* heifers treated with norgestomed ear implant associated or not to injectable progesterone. *Anim. Reprod* **6**, 256, (Abstract).

Gimemes LU 2010: Taxa de recuperação *in vivo* e competência *in vitro* de oócitos bubalinos, zebuínos e taurinos aspirados em diferentes fases da onda de crescimento folicular. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia p 122.

Gimenes LU, Ferraz ML, Fantinato-Neto P, Chiaratti MR, Mesquita LG, Sá Filho M F, Meirelles, FV, Trinca, LA, Rennó FP, Watanabe YF, Baruselli PS, 2015: 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*, 83,385-393.

Kumar D, Anand T, 2012: In vitro embryo production in buffalo: Basic Concepts. *J. Buffalo Sci* **1**, 50-54.

Leal LS, Oba E, Fernandes CB, Moya CF, Martins LR, Martin I, Landim-Alvarenga FC, 2007: Ovarian morphometric characterization and in vitro maturation of oocytes obtained from buffalo (*Bubalus bubalis*) ovaries – partial results. *Ital J Anim Sci* **6**, (Suppl. 2), 804-806.

Le-Van T, Nguyen BX, Chupin D, Driancourt MA, 1989: Histological study of follicular population in swamp buffaloes. *Proc II Word Buffalo Congr.* 122 (abstract).

- Le-VanT, Nguyen BX, Son HN, Driancourt MA, 1993: Superovulation and ovarian follicular population of juvenile buffaloes and calves. *Anim Reprod Sci* **35**, 191-199.
- Liang XW, Lu YQ, Chen MT, Zhang XF, Lu SS, Zhang M, Pang CY, Huang FX, Lu KH, 2008: In vitro embryo production in buffalo (*Bubalus bubalis*) using sexed sperm and oocytes from ovum pick up. *Theriogenology* **69**, 822–826.
- Manjunatha BM, Gupta PSP, Ravindra JP, Devaraj M, Ramesh HS, Nandi, S, 2007 : In vitro developmental competence of buffalo oocytes collected at various stages of the estrous cycle. *Theriogenology* **68**, 882–888.
- Manjunatha BM, Gupta PSP, Ravindra JP, Devaraj M, Nandi S, 2008: In vitro embryo development and blastocyst hatching rates following vitrification of river buffalo embryos produced from oocytes recovered from slaughterhouse ovaries or live animals by ovum pick-up. *Anim Reprod Sci* **104**, 419–426.
- Merton JS, de Roos APW, Mullaart E, de Ruigh L, Kaal L, Vos PLAM, Dieleman SJ, 2003: Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial applications of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology* **59**, 651-674.
- Murphy MG, Boland MP, Roche JF, 1990: Pattern of follicular growth and resumption of ovarian activity in postpartum beef suckler cows. *J Reprod Fert* **90**, 523–533.
- Neglia G, Gasparini B, Brienza VC, Di- Palo R, Di- Campanile G, Presicce GA, Zicarelli L, 2003: Bovine and buffalo in vitro embryo production using oocytes derived from abattoir ovaries or collected by transvaginal follicle aspiration. *Theriogenology* **59**, 1123–1130.
- Neglia, G, Gasparini B, Vecchio D, Boccia L, Varricchio E, Di Palo, R, Zicarelli L, Campanile G, 2011: Long term effect of Ovum Pick-up in buffalo species. *Anim Reprod Sci* **123**, 180-186.
- O'Neill C, 1997: Evidence for the requirement of autocrine growth factors for development of mouse preimplantation embryo in vitro. *Biol. Reprod.* **56**, 229–37.
- Palta P, Banzai N, Prakash BS, Manik RS, MADAN ML, 1998: Endocrinological observation of atresia in individual buffalo ovarian follicles. *Ind J Anim Sci* **68**, 444-447.

- Pavasuthipaisit K, Hoyoak RG, Tocharus C, Kitiyanant Y, 1995: Repeated transvaginal follicular aspiration in swamp buffalo. *Theriogenology* **43**, 295. (Abstract).
- Pontes JHF, Melo Sterza FA, Basso AC, Ferreira CR, Sanches BV, Rubin KCP, Seneda MM. Ovum pick up, *in vitro* embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology* **75**, 1640–1646.
- Promdireg A, Adulyanubap W, Singlor J, Na-Chiangmai A, Techakumphu M, 2005: Ovum Pick-up in Cycling and Lactating Postpartum Swamp Buffaloes. *Reprod Domestic Anim* **40**, 145-149.
- Ramos AA, Ferreira AM, Sá WF, Camargo LSA, Vian JHM, Henry MRJM, 2006: Protocolos para produção *in vitro* de embriões da Raça Gir. *Arq Bras Med Vet Zootec* **58**, 341-347.
- Raghu HM, Nandi S, REDDY SM, 2002: Follicle size and oocyte diameter in relation to developmental competence of buffalo oocytes *in vitro*. *Repro Fert Deve* **14**, 55-61.
- Reis A, Staines ME, Watt RG, Dolman DF, McEvoy TG, 2002: Embryo production using defined oocyte maturation and zygote culture media following repeated ovum pick-up (OPU) from FSH-stimulated Simmental heifers. *Anim Reprod Sci* **72**, 137–151.
- Seneda MM, Esper CR, Andrade, ER, Binelli M, Max, MC, Oliveira JA, Garcia JM, 2005: Relationship between follicle size after FSH treatment and efficiency of oocyte recovery. *Anim. Reprod* **2**, 178-182.
- Suresh KP, Nandi S, Mondal S, 2009: Factors affecting laboratory production of buffalo embryos: A meta-analysis. *Theriogenology* **72**, 978-985.
- Taneja M, Singh G, Totey SM, Ali A, 1995: Follicular dynamics in water buffalo superovulated in presence or absence of a dominant follicle. *Theriogenology* **44**, 581–597.
- Techakumphu M, Lohachit C, Tantasuparuk W, Intaramongkol C, Intaramongkol S, 2000a: Ovarian responses and oocyte recovery in prepubertal swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) calves after FSH or PMSG treatment. *Theriogenology* **54**, 305–12.

Techakumphu M, Phutikanit N, Suadsong S, Bhumibhanom T, Pita A, Coygasem G, 2000b: The effect of GnRH supplement of FSH and PMSG treatments for prepubertal swamp buffalo calves (*Bubalus bubalis*). J Vet Med Sci **62**, 269–272.

Techakumphu M, Promdireg A, Na-Chiangmai A, Phutikanit N, 2004: Repeated oocyte pick up in prepubertal swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) calves after FSH superstimulation. Theriogenology **61**, 1705–1711.

Zicarelli L, Boni R, Campanile G, Di Palo R, Esposito L, 1995: Effect of OPU priming on superovulatory response in Italian buffalo cows. In: Enne G, Greppi GF, Lauria A (Ed.). Reproduction and Animal Breeding: Advances and Strategy. Amsterdam: Elsevier. pp. 455-456.

Zoheir KMA, Adboon AS, Mahrous KF, Amer MA, Zaher MM, Li-Guo Y, El-Nahass EM, 2007: Effects of season on the quality and in vitro maturation rate of Egyptian buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes. J. Cell Anim. Biol **1**, 29-33.

Tabela 1. Efeito de diferentes protocolos de sincronização da onda de crescimento folicular de doadoras de oócitos bubalinas sobre o número de folículos visualizados no ovário, taxa de recuperação, número de oócitos recuperados/animal e qualidade dos oócitos recuperados/animal através da OPU.

Parâmetros Avaliados	Tratamentos			
	T1	T2	T3	T4
#Número de folículos/animal	9,39 ± 0,66 ^{ab}	7,50 ± 0,63 ^a	10,44 ± 0,92 ^b	11,39 ± 0,67 ^b
*Taxa de recuperação (%)	33,35 ± 3,53	41,53 ± 7,42	57,40 ± 7,88	36,19 ± 5,41
#Número de oócitos/animal	3,35 ± 0,47	3,29 ± 0,66	6,44 ± 1,12	4,06 ± 0,62
*Grau A	0,78 ± 0,22 ^{ab}	0,36 ± 0,20 ^b	2,00 ± 0,50 ^a	0,82 ± 0,32 ^{ab}
*Grau B	0,87 ± 0,21	0,57 ± 0,20	1,56 ± 0,32	0,71 ± 0,29
*Grau C	0,52 ± 0,15	0,50 ± 0,20	0,88 ± 0,29	1,29 ± 0,47
*Grau D	0,43 ± 0,12	0,79 ± 0,37	0,63 ± 0,22	0,18 ± 0,09
*Desnudos	0,61 ± 0,16	0,86 ± 0,31	0,94 ± 0,38	0,67 ± 0,19
*Expandidos	0,13 ± 0,07	0,21 ± 0,21	0,44 ± 0,26	0,33 ± 0,16

Dados foram expressos em médias ± erro padrão da média. A taxa de recuperação foi calculada considerando o número de estruturas recuperadas por folículo aspirado.

T1 (Animais não protocolados); T2 (Protocolados com a própria aspiração); T3 (BE+implante de P4+P4 injetável+PGF2 α); T4 (BE+implante de P4+P4 injetável+PGF2 α +FSH).

Letras sobrescritas diferentes indicam diferenças entre as colunas (p<0,05).

#Anova/Duncan

*Teste de Kruskal-Wallis

Tabela 2. Efeito dos tratamentos de sincronização sobre o tamanho do folículo no momento da aspiração folicular guiada por ultrassom.

Tamanho dos Folículos	Tratamentos			
	T1	T2	T3	T4
*Pequenos (3-5 mm)	5,62 ± 1,13 ^A	4,00 ± 0,88 ^A	5,75 ± 1,41 ^A	5,64 ± 1,40 ^A
*Médios (6-9 mm)	1,23 ± 0,41 ^B	2,50 ± 0,72 ^B	2,38 ± 0,37 ^B	1,27 ± 0,59 ^B
*Grandes (>9 mm)	0,69 ± 0,17 ^B	0,93 ± 0,27 ^B	1,38 ± 0,18 ^B	0,55 ± 0,16 ^B
#Média Folículos Totais	7,53 ± 1,09	7,42 ± 0,80	9,50 ± 1,45	7,45 ± 1,46

Folículos pequenos (3-5 mm), folículos médios (6-9 mm), folículos grandes (>9 mm).

T1 (Animais não protocolados); T2 (Protocolados com a própria aspiração); T3 (BE+implante de P4+P4 injetável+PGF2 α); T4 (BE+implante de P4+P4 injetável+PGF2 α +FSH).

Não foi encontrada diferença estatística entre os tratamentos (p>0,05). Letras maiúsculas sobrescritas diferentes indicam diferenças entre o tamanho dos folículos (p<0,05).

#Anova/Duncan

*Teste de Kruskal-Wallis

Tabela 3. Comparação da fonte de obtenção dos ovários (Frigorífico x *Ovum Pick up*) sobre o número de folículos, taxa de recuperação, número e qualidade dos oócitos recuperados.

Parâmetros Avaliados	Tipo de recuperação dos oócitos		Valor de p
	Ovários de Frigorífico	* <i>Ovum Pick Up</i>	
Número de folículos/ovário	9,77 ± 0,49	4,82 ± 0,19	p<0,0001
Taxa de recuperação (%)	41,53 ± 3,33	42,18 ± 3,43	p=0,63
Número de oócitos recuperados/ovário	3,89 ± 0,31	2,10 ± 0,19	p<0,0001
Grau A	1,51 ± 0,14	0,50 ± 0,08	p<0,0001
Grau B	0,96 ± 0,09	0,46 ± 0,06	p<0,0001
Grau C	0,29 ± 0,06	0,39 ± 0,07	P=0,53
Grau D	0,22 ± 0,03	0,23 ± 0,05	P=0,07
Desnudo	0,34 ± 0,10	0,37 ± 0,06	P=0,27
Expandido	0,54 ± 0,07	0,13 ± 0,04	p<0,0001

Dados foram expressos em médias ± erro padrão da média. A taxa de recuperação foi calculada considerando o número de estruturas recuperadas por folículo aspirado.

* Dados representam somatórios de todos tratamentos experimentais.

Teste Mann-Whitney

CAPÍTULO 2

Trabalho a ser submetido à revista “Animal Reproduction Science”

As normas de publicação exigidas pelo periódico estão disponíveis no site:

<http://www.elsevier.com/journals/animal-reproduction-science/0378-4320/guide-for-authors>

**Efeito da sazonalidade sobre a qualidade e disponibilidade dos oócitos e produção
in vitro de embriões bubalinos em clima tropical**

RESUMO

Os bubalinos possuem marcante efeito do fotoperíodo sobre a reprodução, concentrando as atividades reprodutivas durante os períodos de redução da luminosidade dos dias. Entretanto, este efeito não se restringe apenas as condições ovarianas, mas está ligado também a aplicação das biotecnologias de reprodução assistida. Diante disso, no presente trabalho avaliou-se o efeito da redução do fotoperíodo natural no estado de Minas Gerais/Brasil sobre o número de folículos/ovário, a qualidade, o número de oócitos recuperados e competência oocitária, expressa pela taxa de produção *in vitro* de embriões (PIVE). Utilizou-se os índices obtidos em bovinos durante a mesma época do ano para controle de produção do laboratório. De acordo com a duração dos dias, as épocas do ano foram divididas em período desfavorável para reprodução (outubro a fevereiro), favorável para reprodução (março a junho) e período de transição (julho a setembro). Os oócitos foram coletados por aspiração folicular de búfalas *in vivo* e oriundas de frigorífico. Após a colheita estes oócitos foram classificados de acordo com a morfologia e os oócitos obtidos de animais de frigorífico foram submetidos ao processo de maturação *in vitro* por 22 a 24 horas, em seguida fertilização por 18 a 20 horas e cultivo embrionário por 7 dias. A taxa de clivagem foi avaliada de 48 (D2) a 72 (D3) horas pós inseminação (hpi) e as taxas de blastocistos foram observadas 168hpi (D7) e 192hpi (D8), para embriões bovinos e bubalinos. Para análise estatística foram utilizados o teste ANOVA/Duncan ou Kruskal-Wallis e o nível de significância considerado foi $p < 0,05$. O número de folículos e oócitos/animal não alterou durante as épocas do ano ($p > 0,05$), entretanto, notou-se uma maior qualidade dos oócitos bubalinos obtidos pela OPU durante a época favorável para reprodução ($p < 0,05$). Em relação aos oócitos bubalinos oriundos de frigorífico, notou-se que as épocas do ano não interferiram no número de folículos/animal, na taxa de recuperação, número de oócitos recuperados/animal e na qualidade dos oócitos recuperados ($p > 0,05$). Na PIVE em bubalinos notou-se uma melhoria das taxas de clivagem e blastocistos durante a época favorável para reprodução ($p < 0,05$), diferença não constatada em bovinos ($p > 0,05$). Comparando-se as duas espécies nas diferentes épocas do ano, verificou-se que durante a época favorável para reprodução, a taxa de blastocistos de bubalinos foi superior a encontrada para bovinos ($p < 0,05$), sob as mesmas condições de cultivo. No entanto, nas outras épocas do ano notou-se uma superioridade da clivagem de bovinos em relação aos bubalinos ($p < 0,05$). A produção total de blastocistos entre as espécies, desconsiderando a época do ano não diferiu ($p > 0,05$). Diante do exposto, conclui-se que a redução do fotoperíodo influencia positivamente a

PIVE em bubalinos, no entanto, nas outras épocas do ano a produção é semelhante à de bovinos. Essa situação sugere a necessidade de adoção de estratégias para o direcionamento da produção *in vitro* de embriões bubalinos de acordo com época do ano.

1. Introdução

Em razão do crescente interesse na exploração dos bubalinos, as biotecnologias da reprodução têm se tornando ferramentas cada vez mais importantes no progresso genético dos rebanhos a partir do material genético materno (Gasparrini et al. 2014). Neste contexto, a produção de embriões *in vitro* (PIVE) em búfalos tem se mostrado uma excelente alternativa, visto que a transferência de embriões convencional nestes animais apresentam substanciais limitações que comprometem os resultados (Drost, 2007).

Diante disso, a aspiração folicular guiada por ultrassom combinada com os procedimentos de maturação *in vitro* (MIV), fertilização *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV), que constituem as partes integrantes da PIVE bubalinos, tem ganhado notoriedade científica, visando a conquista de melhores resultados (Aquino e Ocampo, 2014). Apesar de obter resultados satisfatórios na maturação oocitária, e modestos na fertilização e clivagem (Boccia et al. 2013), as taxas de blastocistos produzidos em bubalinos apresentam resultados inconsistentes e poucos satisfatórias (Drost, 2007).

Em búfalos, em trabalhos utilizando meios de maturação convencionais, suplementados apenas com hormônios, são encontradas taxas de maturação nuclear de 74,7% (Purohit et al. 2005; Khaki et al. 2014), 79,7% (Aquino e Ocampo, 2014) e 92,8% (Gasparrini et al. 2006) e taxas de clivagem de 31,0% (Purohit et al. 2005), 50,4% (Gasparrini et al. 2006) e 67,0% (Gasparrini et al. 2003). Entretanto, quando se analisa as taxas de produção de blastocistos nota-se que dificilmente os valores ultrapassam 20% nesta espécie. As taxas descritas variam entre 11,8% a 19,4% (Gasparrini et al. 2006; Kadoom et al. 2014; Elamaram et al. 2012; Liang et al. 2008; Boccia et al. 2013). A variação das taxas de PIVE é atribuída à diversos fatores, que incluem desde condições de cultivo até características relacionadas a doadora dos oócitos. Além disso, em razão da sazonalidade reprodutiva em bubalinos, a época do ano é outro fator que pode interferir diretamente na eficiência das biotécnicas da reprodução (Di Francesco et al. 2012).

Búfalos são animais sazonais de dias curtos, portanto, a reprodução é concentrada principalmente durante o outono, quando existe menor duração de luz do dia (Campanile et al. 2010). O efeito da sazonalidade se torna mais significativo em regiões mais afastadas da linha do Equador, onde a variação da duração dos dias é ainda maior. Além

do mais, a interferência do fotoperíodo não se restringe apenas às condições ovarianas, mas parece estar relacionado também ao sucesso da aplicação das biotecnologias da reprodução, por interferir na disponibilidade de oócitos (Di Palo et al. 2001; Manjunatha et al. 2009) e na produção final de embriões (Di Francesco et al. 2012).

O número de folículos disponíveis assim como o número de oócitos recuperados pela OPU foi maior durante a época favorável, considerada o período de menor duração dos dias, comparado a época desfavorável para reprodução em bubalinos (4,8 folículos observados e 1,6 oócitos recuperados na época favorável contra 3,1 folículos observados e 1,0 oócitos recuperado na época desfavorável para reprodução) (Manjunatha et al. 2009). Além disso, a competência oocitária parece variar de acordo com época do ano, situação comprovada por Di Francesco et al. (2011) que descreveram taxas de 26,5% de produção de embriões na época favorável contra 18,8% na época desfavorável. Tal fato foi confirmado posteriormente por estes mesmos autores que encontraram maiores taxas de mórula/blastocitos no outono (30,9%) comparado aos outros dois períodos do ano analisados (13,3% e 10,3% no primavera-verão e inverno, respectivamente) (Di Francesco et al. 2011). Assim, presume-se que o efeito da sazonalidade sobre a produção de embriões parece estar relacionado, sobretudo, ao maior número de folículos disponíveis para aspiração e oócitos recuperados (Manjunatha et al. 2009) assim como a capacidade destes oócitos em se tornarem embriões (Di Francesco et al. 2012).

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da época do ano sobre o número de folículos presentes nos ovários e o número e qualidade dos oócitos bubalinos recuperados de frigoríficos e pela OPU, e a competência dos mesmos quando submetidos ao procedimento de PIVE, adotando-se os parâmetros dos ovários bovinos obtidos em frigorífico como critério de controle do laboratório.

2. Material e Métodos

A menos que especificado, todos os reagentes utilizados foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EUA).

Definição do período experimental

Este estudo foi conduzido durante maio/2014 à maio/2015, período no qual foram coletados os dados de luminosidade e temperaturas máxima e mínima no Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), referentes a microrregião de Belo Horizonte/MG (Latitude 19,93 S; Longitude 43,93 O). Tendo em vista que a duração de luz dos dias é

um dos principais fatores que podem interferir na capacidade reprodutiva dos bubalinos, os dados de luminosidade foram dispostos em gráfico e a partir deles foram definidos 3 períodos experimentais, assim como proposto por Di Francesco et al. (2012): Época de maior duração dos dias ($13,03 \pm 0,18$ horas de luz) (desfavorável a reprodução – outubro a fevereiro), época com menor duração dos dias ($11,29 \pm 0,29$ horas de luz) (favorável a reprodução – março a junho) e época de duração intermediária dos dias ($11,49 \pm 0,46$ horas de luz) (período de transição – julho a setembro) (Figura 1).

Animais

Foram utilizadas 12 búfalas mestiças (Murrah x Mediterrâneo), com idade aproximada de 2 anos e escore corporal variando de 3 a 4 em uma escala de 1 a 5. Estes animais apresentavam-se em período de lactação e sem alterações no exame ginecológico realizado previamente ao experimento. Todas as fêmeas foram mantidas em piquetes com alimentação à pasto e água *ad libitum* durante o período de outubro a maio. No período de menor oferta de alimentos, junho a setembro, os animais receberam suplementação com silagem e concentrado. O presente trabalho foi conduzido no Centro de Biotecnologia em Bubalinocultura pertencente a Universidade Federal de Minas Gerais, localizando no município de Pedro Leopoldo/MG.

Aspiração folicular guiada por ultrassom

Foram realizadas em momento aleatório do ciclo estral 10 sessões de OPU na qual foram aspirados 6-7 animais/sessão, durante o período experimental pré-estabelecido. O intervalo médio entre as aspirações foi de 30 dias, sendo o mesmo número de aspirações em cada período pré-definido.

Para realização da OPU os animais foram contidos no brete seguidamente foram submetidos à anestesia epidural. A aplicação de 3ml de lidocaína 2% (Lidovet®, Bravet) foi realizada entre a última vertebra sacral e primeira coccígena e pouco depois, a eficiência do procedimento era confirmado pela perda dos reflexos da cauda. Em sequência, removeu-se manualmente todo excesso de fezes e realizou-se a higienização da região perineal e vulva com água.

Anteriormente a cada procedimento de aspiração, todos os folículos do ovário foram contados. O procedimento de avaliação dos folículos assim como a aspiração folicular foi realizada com aparelho de ultrassonografia (DP-2200, Mindray®) acoplado de uma probe microconvexa multifrequencial, usada na frequência de 7,5 MHz. À essa

probe foi acoplada uma guia de aspiração folicular (WTA- Watanabe Tecnologia Aplicada®) que sustentava uma linha de aspiração folicular de teflon de 1,7 mm de diâmetro e 80 cm de comprimento e uma agulha de 1,3 x 83mm (18G) (WTA- Watanabe Tecnologia Aplicada®). A pressão da bomba de vácuo utilizada foi de aproximadamente 80mmHg (12 a 15 mL água/minuto). O sistema de aspiração foi previamente lavado com solução fisiológica 0,9% acrescida de heparina sódica (5000 UI/mL; Hemofol ®, Cristália) e 1% de soro fetal bovino (SFB; Nutricell), previamente aquecida a 37 °C, que após a lavagem permanecia no tubo de coleta. Todos folículos $\geq 2,0$ mm, visíveis no ultrassom foram puncionados e recolhidos em tubo cônico de 50mL.

Processamento dos oócitos

Após o procedimento de aspiração o tubo foi identificado e imediatamente levado ao laboratório montado na própria fazenda para rastreamento e classificação dos oócitos. Ao chegar no laboratório o tubo era despejado em um filtro de colheita de embriões (WTA- Watanabe Tecnologia Aplicada®) e lavado com o mesmo meio utilizado para OPU, até a obtenção de uma solução translúcida. Em seguida, o conteúdo do filtro foi vertido em uma placa Petri 100 x 20mm e com auxílio de uma lupa estereoscópica realizou-se a procura, lavagem e classificação dos complexos *cumulus* oócitos recuperados. Os oócitos foram classificados em diferentes categorias de acordo com a morfologia, seguindo a classificação proposta por Di Francesco et al. (2011): Grau A: oócitos com citoplasma homogêneo e com toda superfície cercada de várias camadas de células do *cumulus*; Grau B: oócitos com citoplasma homogêneo e com pelo menos 70% da superfície envolvida por múltiplas camadas de células do *cumulus*; Grau C: oócitos com poucas camadas de células; Grau D: Oócitos com evidentes sinais de degeneração citoplasmática; Expandidos: Oócitos envolvidos por células do *cumulus* expandidas e com *clusters*; Desnudos: Oócitos completamente sem células do *cumulus*.

Após a classificação, os oócitos foram lavados em gotas de aproximadamente 70µL de meio de lavagem (ML) (TCM 199 Hepes + 10% SFB + 22µg/mL Piruvato + 83,4 µg/mL de Amicacina + 0,2mM Piruvato de Sódio) e armazenados em criotubos de 2mL nesta mesmo meio, onde eram transportados em um intervalo máximo de 2 horas à temperatura de 37°C em garrafa térmica até o Laboratório de Células Tronco Embrionárias e Animais Transgênicos da UFMG. Ao chegar no laboratório os oócitos foram reclassificados e colocados no meio de maturação com o objetivo de produção *in vitro* de embriões. No entanto, o desenvolvimento dos embriões foi comprometido em

razão da contaminação que ocorreu durante a etapa de fertilização *in vitro*, em várias sessões de aspiração. Assim, mesmo após a substituição do antibiótico e solução do problema, os dados foram excluídos e esta etapa experimental foi desconsiderada neste trabalho.

Coleta e processamento dos ovários de frigorífico

Para efeito de comparação da fonte de obtenção dos oócitos de acordo com a época do ano, durante o mesmo período das sessões de OPU (maio de 2014 até maio de 2015) foram coletados ovários de búfalas em lactação abatidas em um frigorífico localizado na cidade de Pará de Minas, MG. Os ovários foram coletados no momento da evisceração dos animais e foram imediatamente acondicionados em solução salina à 37°C. Dentro de um intervalo máximo de 2 horas os ovários foram transportados para o Laboratório de Células Embrionárias e Produção de Animais Transgênicos/UFMG onde foram devidamente processados.

No laboratório o número de folículos visíveis de cada ovário foi registrado e todos eram aspirados com auxílio de uma agulha 40x12mm acoplada de uma seringa de 3mL. O líquido proveniente da aspiração foi reunido em um tubo de 15mL até o total preenchimento do mesmo. Em seguida, aguardou-se 10 minutos após a aspiração do último ovário para a decantação dos complexos *cumulus*-oócitos. Após este intervalo, retirou-se cuidadosamente todo sobrenadante do tubo até restar aproximadamente 3 mL, assim o conteúdo restante foi vertido em uma placa de Petri 100x20 mm para o rasteamento dos oócitos. Utilizou-se o mesmo ML descrito na OPU para fazer a lavagem do tubo e diluição do líquido folicular, facilitando a visualização dos oócitos.

Foram identificados todos oócitos bubalinos presentes na placa e em seguida os mesmos foram classificados seguindo os parâmetros descritos por Di Francesco et al. (2011), nas quais foram também usados para os oócitos recolhidos por OPU.

A título de comparação foi realizada a coleta e processamento de oócitos de ovários de frigorífico também em bovinos. Os procedimentos realizados em bovinos foram os mesmos descritos para bubalinos, entretanto, a classificação dos oócitos foi realizada de acordo com os critérios estabelecidos previamente por Viana et al. (2004).

Produção *in vitro* dos embriões

Após a seleção, somente os oócitos grau A e grau B de bubalinos e grau I e grau II de bovinos oriundos do frigorífico foram processados para maturação. O meio de

maturação utilizado foi constituído de TCM-199 bicarbonato (Gibco®), suplementado com 50 µM de cisteamina, 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco®), 83 µg/mL de amicacina (Nova Farma®), 22 µg/mL de piruvato de sódio, 0,5 µg/mL de FSH (Folltropin®, Bioniche) e 5 UI/mL de LH (Chorulon®, MSD Saúde Animal) e 1 µg/mL de estradiol. A maturação foi realizada em gotas de 70 µL, sob óleo mineral, temperatura de 38,5°C, atmosfera gasosa controlada de 5% CO₂, umidade de aproximadamente 95% por um período médio de 22-24 horas. Cada gota continha aproximadamente 15 oócitos bovinos ou bubalinos e realizou-se 120 repetições durante todo período experimental.

Ao final da maturação, os oócitos foram submetidos à fecundação *in vitro* (FIV). Para tanto uma palheta de um touro bovino ou bubalino, com fertilidade anteriormente comprovada na PIVE, foi descongelada à 37°C por 30 segundos. Os espermatozoides viáveis foram obtidos por centrifugação por 5 minutos em gradiente de Percoll (2mL 45% Percoll + 2mL de 90% Percoll) e posteriormente foi realizada a lavagem do *pellet* em meio de lavagem TL-Sêmen. A fecundação (considerada dia 0; D0) foi realizada em uma gota de 70 µL em meio *Tyrodé's-albumina-lactato-piruvato* (TALP) suplementado com 83 µg/mL de amicacina, 44 µL/mL da solução PHE (penicilamina 68 µg/mL, hipotaurina 25 µg/mL, epinefrina 8,1 µg/mL), 0,6% de albumina sérica bovina (BSA), 0,2mM de piruvato de sódio e 10 µg/mL de heparina. Os espermatozoides foram adicionados às gotas de FIV em uma concentração final de 2×10^6 células/mL. As gotas foram cobertas com óleo mineral e incubadas sob as mesmas condições de MIV por um período de aproximadamente 18 a 20 horas.

Ao término da FIV, os prováveis zigotos foram submetidos ao procedimento de desnudamento mecânico por pipetagens consecutivas para retirada das células do *cumulus* e em seguida foram lavados e transferidos para o cultivo *in vitro* (CIV). O cultivo foi realizado em gotas de 70 µL constituídas de meio sintético de fluido de oviduto (SOF) suplementado com 0,2 mM de piruvato de sódio, 83 µg/mL de amicacina, 0,5% BSA livre de ácido graxo fração V e 2,5% de soro fetal bovino (SFB) sob óleo mineral contendo aproximadamente 15 oócitos/gota. O cultivo foi realizado à temperatura de 38,5°C sob baixa tensão de oxigênio (5%O₂, 5%CO₂ e 90%N₂). Os embriões permaneceram no cultivo por 8 dias em ambas as espécies.

A taxa de clivagem foi avaliada 48 (D2) a 72 (D3) horas pós inseminação (hpi) sob microscópio estereoscópio (aumento de 40x), quando os embriões de 2 a 8 células foram contabilizados. Todas as estruturas encontradas, sejam elas clivadas ou não, foram mantidas até o final do cultivo. No momento da avaliação da clivagem foi realizado o

procedimento de *feeding*, na qual aproximadamente 40% do volume da gota (30µL) foi substituído por meio novo. Este procedimento foi novamente realizado 96hpi (D4) a 120hpi (D5), contudo, nesta etapa o meio CIV adicionado continha 5mM de glicose. As taxas de blastocistos foram observadas 168hpi (D7) e 192hpi (D8) para os embriões bovinos e bubalinos.

Análise estatística

O teste de Shapiro Wilk foi utilizado para avaliar a normalidade das variáveis contínuas: número de folículos visualizados, número de oócitos totais recuperados, taxa de recuperação (número de oócitos totais/número de folículos visualizados), qualidade dos oócitos recuperados (grau A, B, C, D, expandido e desnudo), taxa de clivagem, porcentagem de embriões no D7 e D8 e taxa de blastocistos.

Para análise das variáveis contínuas em relação a época do ano (favorável, transição ou desfavorável), as variáveis normais e as que atenderam as premissas de normalidade após a transformação foram analisadas pelo teste ANOVA seguido do teste Duncan. Na impossibilidade de se obter a normalidade das variáveis, a análise estatística foi realizada pelo teste Kruskal-Wallis. Para a realização da análise das variáveis contínuas em relação ao tipo de espécie (bovinos ou búfalos) as variáveis normais e as que atenderam as premissas de normalidade após a transformação foram analisadas pelo teste t. Na impossibilidade de se obter a normalidade das variáveis, a análise estatística foi realizada pelo teste de Mann-Whitney.

Todas as análises foram realizadas com a versão 17.0 do programa SPSS (SPSS Inc, Chicago, EUA), e o nível de significância considerado foi de $p < 0,05$.

3. Resultados

De acordo com a Tabela 2, na OPU o número de folículos e oócitos/animal não foram alterados pela época do ano ($p > 0,05$), entretanto, a taxa de recuperação dos oócitos foi maior durante a época favorável para reprodução de bubalinos ($p < 0,05$). No presente estudo pode-se notar uma melhoria da qualidade dos oócitos recuperados na OPU durante a época favorável para reprodução. Tal fato pode ser constatado pela elevação do número de oócitos Grau A + B durante época favorável para reprodução das búfalas comparado a época desfavorável e o período de transição ($p < 0,05$). O número de oócitos grau C, grau D, expandidos e desnudos não alterou durante as diferentes épocas do ano ($p > 0,05$).

Em relação aos ovários recolhidos no frigorífico notou-se que durante as diferentes épocas do ano, não alterou-se o número de folículos/animal, a taxa de

recuperação e número de oócitos recuperados/animal ($p>0,05$) (Tabela 03). Além disso, a qualidade dos oócitos representada pelo número de oócitos grau A, B, C, D, desnudos e expandidos também não alterou de acordo com a variação da época do ano ($p>0,05$).

Comparando espécies separadamente entre as diferentes épocas do ano, constatou-se que em bubalinos durante a época favorável para reprodução, representada pelos meses de Março a Junho, notou-se um aumento das taxas de clivagem e blastocistos ($p<0,05$) (Tabela 04). Ainda em bubalinos, notou-se uma redução da porcentagem de blastocistos no D7 durante o período de transição, comparado a época favorável e desfavorável para reprodução ($p<0,05$). Por outro lado, a porcentagem de blastocistos no D8 não alterou durante as diferentes épocas do ano ($p>0,05$). Em bovinos, a única diferença notada ao longo das épocas do ano foi em relação a taxa de clivagem, que reduziu durante o período de transição comparado a época favorável e desfavorável para reprodução de bubalinos ($p<0,05$). A porcentagem de blastocistos encontrados no D7 e D8, além da taxa de blastocistos, não alterou durante as diferentes épocas do ano ($p>0,05$).

Como demonstrando na Tabela 04, comparando as espécies durante as mesmas épocas do ano, comprovou-se que a taxa de clivagem dos embriões de bubalinos durante as épocas desfavorável e período de transição foi menor que as taxas de clivagem encontrada em bovinos ($p<0,05$). Durante a época favorável para reprodução a taxa de clivagem não diferiu entre as duas espécies ($p>0,05$). A porcentagem de blastocistos encontrados tanto no D7 quanto no D8 não diferiu entre búfalos e bovinos nas épocas desfavorável e favorável para reprodução ($p>0,05$). Somente durante o período de transição notou-se maior taxa de blastócitos no D7 e menor taxa de blastócitos no D8 em bovinos comparado aos bubalinos ($p<0,05$). Um dos resultados mais expressivos do presente trabalho foi a diferença entre a taxa de blastocistos de bovinos e búfalos nas diferentes épocas do ano. Enquanto essa taxa não apresentou diferença durante a época desfavorável e período de transição entre as duas espécies ($p>0,05$), durante a época favorável para reprodução de bubalinos encontrou-se maior taxa de produção de blastocistos em búfalos quando comparado aos bovinos ($p<0,05$).

Como exposto na Tabela 05, ao comparar todas rotinas de produção de embriões em bovinos e bubalinos ao longo de todo período experimental, independente da época do ano, notou-se maior taxa de clivagem em bovinos quando comparado à bubalinos ($p<0,05$). Entretanto, a porcentagem de embriões no D7 e no D8, assim como a taxa de blastocistos produzidos não diferiram entre as duas espécies ($p>0,05$).

4. Discussão

O presente estudo avaliou se as condições de variação da sazonalidade encontradas na região Sudeste do Brasil poderiam influenciar na população folicular e na qualidade dos oócitos recuperados de frigorífico ou pela aspiração folicular de animais *in vivo* e, consequentemente, na produção final de embriões *in vitro* dos bubalinos. Além disso, buscou-se estabelecer os índices relacionados a PIVE obtidos em bubalinos tomando como parâmetro os mesmos índices obtidos em bovinos durante um período amostral de um ano.

As características reprodutivas dos bubalinos são altamente influenciáveis pelas variações do fotoperíodo, como demonstrado em trabalhos anteriores (Campanile et al. 2010; Di Francesco et al. 2011). A atividade reprodutiva destes animais tende a aumentar com a redução da luminosidade dos dias (outono), e o aumento da luz dos dias provoca uma redução da atividade cíclica levando ao quadro de anestro sazonal, sobretudo quando localizados em regiões subtropicais (Zicareli, 2010). Entretanto, o crescimento folicular dos mesmos não cessa e sucessivas ondas foliculares continuam a se desenvolverem durante o anestro (Boni et al. 1994).

O Brasil por se constituir de extensa área territorial, a influência da sazonalidade depende muito da região na qual os animais se encontram. Estudos prévios na região Norte do país, demonstraram que a influência da sazonalidade sobre a reprodução nesta região está relacionada muito mais com a disponibilidade de alimentos e regime de cheia dos rios do que sobre outros fatores, até porque, se tratando de uma região equatorial, não existe considerável variação de luminosidade ao longo dos dias (Vale et al. 1990; Vale et al. 1996). Entretanto, na região Sudeste do país, estudos prévios demonstraram que a maioria das concepções ocorrem entre Abril e Junho, época que a luminosidade diária na região vai se tornando cada vez menor (Garcia, 2006). Neste estudo, constatou-se a ocorrência de variação das horas de luz entre as diferentes épocas do ano no local onde foi realizado o experimento (Tabela 01). Diante disso, foi proposta uma divisão do período experimental em época favorável, desfavorável e período de transição, representado pelos intervalos de meses de Março a Junho, Outubro a Fevereiro e Julho a Setembro, respectivamente (Figura 01).

Embora durante a época favorável para reprodução a hipótese seja mais responsiva, aumentando o número de folículos recrutados e consequentemente o número de folículos e oócitos presentes nos ovários durante a aspiração folicular de animais *in vivo*, este fato não foi observado no presente experimento, corroborando com os achados

de Di Francesco et al. (2012). Este autor, apesar de ter encontrado menores taxas de folículos/animal (4,6) e oócitos recuperados/búfala/sessão de OPU (2,3), relata não haver diferença entre estes parâmetros ao longo do ano em regiões de alta latitude. Entretanto, vários outros autores apontam a existência de diferença do número de folículos e oócitos por animal ao longo do ano em animais Murrah (Gupta et al. 2006), Mediterrâneo (Di Palo et al. 2001; Neglia et al. 2011) e búfalas do rio (Manjunatha et al. 2008; 2009).

Uma possível explicação para tal fato consiste que o plano alimentar pode afetar a dinâmica folicular em bubalinos (Smith, 1984), acredita-se que o bom estado nutricional das búfalas incluídas no presente experimento submetidas à OPU possa ter influenciado na manutenção do número de folículos recrutados ao longo do ano nestes, reduzindo o efeito do fotoperíodo durante as épocas desfavoráveis e o período de transição. Além disso, em razão das sessões de aspirações no presente estudo ocorrerem em intervalos consideráveis, de aproximadamente 2 semanas, não houve a possibilidade de ocorrência da exaustão funcional dos ovários, que poderia provocar a redução do número de oócitos recuperados (Di Palo et al. 2001). Em razão dos procedimentos de OPU ser realizados por apenas um indivíduo e sob as mesmas condições durante todo período experimental, a variação da taxa de recuperação pode ter ocorrido em razão do aumento do tamanho dos folículos na época favorável, na qual poderia proporcionar perdas de líquido folicular e oócitos recuperados. Entretanto, o tamanho dos folículos neste trabalho não foi mensurado.

Em relação a qualidade, a redução do número de oócitos de grau A durante o período de transição e o aumento dos oócitos grau B durante a época favorável estão em desacordo com outros autores (Manjunatha et al. 2009; Gasparrini, 2011; Di Francesco et al. 2012). Entretanto, nestes trabalhos as aspirações foram realizadas com uma frequência de duas ou uma vez por semana, frequências maiores que o presente trabalho. Além disso, aspirações contínuas proporcionam frequente renovação de folículos por onda, aumentando a qualidade dos oócitos recuperados que se mantem constante por todo período experimental (Manjunatha et al. 2009). Oócitos grau C, D, desnudos e expandidos não apresentaram variações, assim como descrito por outros autores (Gupta et al. 2006; Gasparrini, 2011).

Ovários coletados a partir de animais abatidos de frigorífico são considerados importante fonte de obtenção de oócitos, tanto com fins científicos quanto comerciais, visto que em bubalinos o número de oócitos recuperados por sessão é bem inferior aos bovinos (Neglia et al. 2003). Todavia, no presente trabalho não foram encontradas

diferenças entre o número total de folículos/animal, a taxa de recuperação e o número total de oócitos/animal nas diferentes épocas do ano, corroborando com os achados de Di Francesco et al. (2011). Estes dados contrariam Di Palo et al. (2001) que constatou uma redução tanto no número de folículos quanto dos complexos *cumulus-oophorus* durante o período de primavera-verão comparado ao outono-inverno.

Em relação a qualidade, no presente estudo não foi notada diferença entre o número de oócitos grau A, grau B, grau C, grau D, expandidos e desnudos de acordo com época do ano. Contrariamente, o número de oócitos degenerados e pequenos foram aumentados entre a época desfavorável e favorável para búfalos na Itália (Di Francesco et al. 2011). Acredita-se que a manutenção da qualidade, do número de folículos e oócitos recuperados de frigorífico, ocorreu em razão da inexistência de diferença significativa das condições pluviométricas ao longo do ano, como demonstrado na Tabela 01, possibilitando a regular oferta de alimentos dos animais mantidos a pasto, ou em virtude da discreta interferência do fotoperíodo nestes parâmetros, como mostrando para oócitos recuperados por OPU (Di Francesco et al; 2012). Outra possibilidade é que a classificação morfológica de qualidade dos oócitos, baseada apenas no aspecto visual das células do *cumulus* e ooplasma, não seja capaz de prever a competência dos mesmos (Manjunatha et al. 2007), visto que produção de embriões encontrada para estes mesmos oócitos variou de acordo com época do ano.

Um expressivo resultado deste experimento foi a influência do fotoperíodo na produção *in vitro* de embriões bubalinos. Ao comparar as diferentes épocas do ano observou-se um significativo aumento na taxa de clivagem e taxa de blastocistos em bubalinos durante os meses Março a Junho (fotoperíodo negativo), fato não encontrado em bovinos. Esse aumento ocorre de forma tão expressiva, que durante esta época a taxa de blastocistos em bubalinos foi superior a encontrada para bovinos, cultivados sob as mesmas condições laboratoriais. Esse comportamento sazonal sobre as taxas de produção de embriões está de acordo com as constatações de outros autores (Di Francesco et al. 2011; Neglia et al. 2011, Di Francesco et al. 2012) que relataram aumento da competência oocitária em búfalas durante a redução das horas de luz dos dias. Acredita-se que este efeito esteja ligado principalmente a fatores autócrinos dos ovários (Di Francesco et al. 2011). Já Manjunatha et al. (2009) não encontrou este efeito, entretanto, em seu trabalho foi realizado sob condições climáticas que não apresentaram grande variação ao longo do ano. Portanto, no presente estudo constatou-se que apesar da qualidade não ter sido alterada, a competência do oócitos a serem fertilizados *in vitro* para o desenvolvimento

até o estágio de blastocistos elevou consideravelmente na época favorável em relação a época desfavorável e o período de transição.

Embriões bubalinos apresentam desenvolvimento em 12 a 24 horas mais precoce do que embriões bovinos, tanto *in vivo* (Gasparrini et al. 2002) quanto *in vitro* (Neglia et al. 2001). No entanto, no presente estudo a porcentagem de blastocistos no D7 e D8 não diferiu entre as espécies e as épocas do ano, exceto, durante o período de transição quando notou-se uma redução do aparecimento de blastocistos no D7 em bubalinos comparado à outras épocas do ano e aos bovinos. Tal fato sugere um retardamento do desenvolvimento dos embriões de bubalinos durante este período do ano, que pode ter ocorrido por fatores intrínsecos relacionados à doadora de oócitos, que não puderam ser detectados em razão de serem animais oriundos de matadouro.

Segundo Manjunatha et al. (2009), o número de embriões bubalinos transferíveis por sessão de OPU, tanto na época favorável e desfavorável, são menores do que bovinos, discordando dos dados encontrados no presente trabalho. Considerando a produção total de embriões, indiferente da época do ano, única diferença constatada foram as maiores taxas de clivagem obtidas em bubalinos em comparação com os bovinos. Essa constatação pode ser justificada pela dificuldade de observação da clivagem nos embriões bubalinos encontrada no presente trabalho. Em razão desta avaliação ter sido realizada no D3, com possível estágio de 8-16 células (Neglia et al. 2001), ocasionalmente pelo fato dos embriões apresentarem coloração muito escura os mesmos podem ter sido considerados degenerados ao invés de clivados, subestimando a real taxa de clivagem. Contudo, apesar da menor população de folículos recrutáveis, reduzida taxa de crescimento e alta taxa de atresia dos folículos verificada em bubalinos (Aboul-Ela, 2000), a velocidade de desenvolvimento dos embriões e a taxa de produção total de blastocistos assemelhou-se as encontradas em bovinos, sob as condições experimentais propostas.

Diante dos dados apresentados, sugere-se que o efeito do fotoperíodo negativo não pode ser subestimado na região estudada, visto que foi constatado que com a redução de luz dos dias elevou-se a qualidade dos oócitos, sobretudo quando coletados através da OPU, além de melhorar as taxas de clivagem e de produção de blastocistos. Assim como no trabalho realizado por Di Francesco et al. (2011), no presente estudo foi demonstrado que fotoperíodo pode exercer influência no oócito desde o estágio inicial do seu desenvolvimento, alterando não só sua qualidade inicial, mas a capacidade de desenvolvimento.

5. Conclusão

Foi demonstrado que na região Sudeste do Brasil, no estado de Minas Gerais, a redução do fotoperíodo durante os meses de Março a Junho pode interferir positivamente na qualidade dos oócitos bubalinos recuperados a partir da aspiração de animais *in vivo*. Além disso, constatou-se que a produção de embriões *in vitro* em bubalinos é consideravelmente maior durante a época favorável para reprodução (Março a Junho) assemelhando aos índices encontrados para bovinos durante a mesma época. Essa informação mostra a importância do direcionamento dos programas de reprodução assistida em bubalinos na região Sudeste do Brasil.

Agradecimento

Este trabalho foi financiado pelo Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil (096/10).

Referências

- Aboul-Ela, M.B.E., 2000. Superovulation in the buffaloes: constraints and manipulation. *Buffalo J.* 16, 1-20.
- Aquino, F.P., Ocampo, M.P., 2014. In vitro maturation of bubaline oocytes using bubaline (Swamp Buffalo) follicular fluid. *Euro. J. Biotechnol. Biosci.* 2, 35-38.
- Boccia, L., Di Francesco, S., Neglia, G., De Blasi, M., Longobardi, V., Campanile, G., Gasparrini, B., 2013. Osteopontin improves sperm capacitation and *in vitro* fertilization efficiency in buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*. 80, 212-217.
- Boni, R., Di Palo, R., Barbieri, V., Zicarelli, L. 1994. Ovum pick-up in deep anestrus buffaloes. In *Proc. IV World Buffalo Congress*, vol. 3, pp.480-482.
- Campanile, G., Baruselli, P.S., Neglia, G., Vecchio, D., Gasparrini, B., Gimenes, L.U., Zicarelli, L., D'Occhio, M.J., 2010. Ovarian function in the buffalo and implications for embryo development and assisted reproduction. *Anim Reprod Sci.* 121(1-2), 1-11.
- Di Francesco, S., Boccia, L., Campanile, G., Di Palo, R., Vecchio, D., Neglia, G., Zicarelli, L., Gasparrini, B., 2011. The effect of season on oocyte quality and developmental competence in Italian Mediterranean buffaloes (*Bubalus bubalis*). 123, 48-53.
- Di Francesco, S., Novoa, M.V., Vecchio, D., Neglia, G., Boccia, L., 2012. Campanile G et al. Ovum pick-up and in vitro embryo production (OPU-IVEP) in Mediterranean Italian buffalo performed in different seasons. *Theriogenology*. 77, 148-145.

- Di Palo, R., Neglia, G., Campanile, G., Presicce, G.A., Spadetta, M., Caracciolo di Brienza, V., Gasparrini, B., Zicarelli, L., 2001. Seasonal effect on follicle production and oocyte recovery by ovum pick-up in the Mediterranean Italian Buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*. 55, 404.
- Drost, M., 2007. Advanced reproductive technology in the water buffalo. *Theriogenology* 68, 450-453.
- Elamaram, G.; Singh, K.P.; Singh, M.K.; Chauhan, M.S.; Manik, R.S.; Palta, P., 2012. Oxygen concentration and cysteamine supplementation during in vitro production of buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos affect mRNA Expression of BCL-2, BCL-XL, MCL-1, BAX and BID. *Reprod. Dom. Anim.* 47, 1027-1036.
- Garcia, A.R., 2006. Influência de fatores ambientais sobre as características reprodutivas de búfalos do rio (*Bubalus bubalis*). *Rev. de Ciênc. Agrár.* 45, 1-13 (Supl).
- Gasparrini, B., Sayoud, H., Neglia, G., de Matos, D.G., Donnay, I., Zicarelli, L., 2003. Glutathione synthesis during in vitro maturation of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes: effects of cysteamine on embryo development. *Theriogenology*. 60, 943-952.
- Gasparrini, B., Boccia, L., Marchandise, J., Di Palo, R., George, F., Donnay, L., Zicarelli L., 2006. Enrichment of in vitro maturation medium for buffalo (*Bubalus bubalis*) oocyte with thiol compounds: effect of cysteine on glutathione synthesis and embryo development. *Theriogenology*. 66, 275-287.
- Gasparrini, B., 2011. Ovum pick-up and in vitro embryo production in buffalo species: na update. *Acta Sci Vet.* 39 (Suppl1), 317- 335.
- Gasparrini, B., Neglia, G., Di Palo, R., Vechio D., Albero, G., Esposito, L., Campanile, G., Zicarelli, L., 2014. Influence of oocyte donor in vitro embryo production in buffalo. *Anim Reprod Sci* .144, 95-101.
- Gupta, V., Manik, R.S., Chauhan, M.S., Singla, S.K., Akshey, Y.S., Palta, P., 2006. Repeated ultrasound-guided transvaginal oocyte retrieval from cyclic Murrah buffaloes (*Bubalus bubalis*): oocyte recovery and quality. *Anim. Reprod. Sci.* 91, 89-96.
- INMET - Instituto Nacional de Meteorologia. Ministério da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento. Base de dados BPMED. Disponível em: www.inmet.gov.br. Acesso em: 02/06/2015.
- Kadoom, A.K., Abdel-Khalek, A.E., Shamiah, Sh.M., El-Sharawy, M.E., El-Razek, I.M.A., 2014. In vitro maturation, fertilization and development of prepubertal and mature buffalo oocytes. *Egyptian J. Anim. Prod.* 51, 65-69.
- Khaki, A., Batavani, R., Najafi, G., Tahmasbian, H., Belbasi, A., Mokarizadeh, A., 2014. Effect of Leptin on In Vitro Nuclear Maturation and Apoptosis of Buffalo (*Bubalus bubalis*) Oocyte. *Int J Fertil Steril.* 8, 43-50.

- Liang, X.W., Lu, Y.Q., Chen, M.T., Zhang, X.F., Lu, S.S., Zhang, M., Pang, C.Y., Huang, F.X., Lu, K.H., 2008. In vitro embryo production in buffalo (*Bubalus bubalis*) using sexed sperm and oocytes from ovum pick up. *Theriogenology*. 69, 822–826.
- Manjunatha, B.M., Gupta, P.S.P., Ravindra, J.P., Devaraj, M., Ramesh, H.S., Nandi, S., 2007. In vitro developmental competence of buffalo oocytes collected at various stages of the estrous cycle. *Theriogenology* 68, 882–888.
- Manjunatha, B.M., Gupta, P.S.P., Ravindra, J.P., Devaraj, M., Nandi, S., 2008. In vitro embryo development and blastocyst hatching rates following vitrification of river buffalo embryos produced from oocytes recovered from slaughterhouse ovaries or live animals by ovum pick-up. *Anim. Reprod. Sci.* 104, 419–426.
- Manjunatha, B.M., Ravindra, J.P., Gupta, P.S. Devaraj, M., Nandi, S., 2009. Effect of breeding season on in vivo oocyte recovery and embryo production in non-descriptive Indian river buffaloes(*Bubalus bubalis*). *Anim Reprod Sci.* 111, 376-83.
- Neglia, G., Marino, M., Di Palo, R., Wilding, M., Caracciolo Di Brienza, V., Dale, B., Gasparrini, B., Zicarelli, L. A., 2001. Comparison of in vitro maturation in buffalo (*Bubalus bubalis*) and bovine oocytes using confocal microscopy. *Theriogenology*. 55, p.488.
- Neglia, G.; Gasparrini, B.; Caracciolo Di Brienza, V.; Di Palo, R.; Campanile, G.; Presicce, G.A.; Zicarelli, L., 2003 Bovine and buffalo in vitro embryo production using oocytes derived from abattoir ovaries or collected by transvaginal follicle aspiration. *Theriogenology*, 59, 23-30.
- Neglia, G.; Gasparini, B.; Vecchio, D.; Boccia, L.; Varricchio, E.; Di Palo, R.; Zicarelli, L.; Campanile, G., 2011. Long term effect of Ovum Pick-up in buffalo species. *Anim. Reprod. Sci.*, 123, 180-186.
- Purohit, G.N., Brady, M.S., Sharma, S.S., 2005. Influence of epidermal growth factor and insulin-like growth factor 1 on nuclear maturation and fertilization of buffalo cumulus oocyte complexes in serum free media and their subsequent development in vitro. *Anim. Reprod. Sci.* 87, 229-239.
- Smith, J.F., 1984. Protein, energy and ovulation rate. In Land, R.B.; Robinson, D.W. (Eds). *Genetics of Reproduction in Sheep*. Butterworth, London, pp.349-359.
- Vale, W.G., Ohashi, O.M., Sousa, J.S., Ribeiro, H.F.L., 1990. Studies on the reproduction of water buffalo in the Amazon Valley, Brazil. In *Livestock Reproduction in Latin America*, International Atomic Energy Agency, Vienna, pp. 201-210.
- Vale, W.G., Ribeiro, H.F.L., Silva, A.O.A., Sousa, J.S., Ohashi, O.M., Souza, H.E.M., 1996. Buffalo a non-seasonal breeder in the Amazon Valley, Brazil. 13th Int. Cong. *Anim. Reprod. Proc.* 3, 19-33.
- Viana, J.H.M., Camargo, L.S.A., Ferreira, A.M. De Sa, W.F., Fernandes, C.A.C. Junior, A.P.M., 2004. Short intervals between ultrasonographically guided follicle aspiration

improve oocyte quality but not prevent establishment of dominant follicle in the Gir breed (*Bos indicus*) of cattle. Anim. Reprod. Sci. v. 84, p. 1-1.

Zicareli, L., 2010. Enhancing reproductive performance in domestic dairy water buffalo (*Bubalus bubalis*). In: Reproduction in Domestic Ruminants VII, Nottingham University Press, Nottingham, United Kingdom, p443.

Tabela 1. Parâmetros Meteorológicos registrados durante os meses de Maio/14 à Maio/15 na região metropolitana de Belo Horizonte/MG.

Época	Precipitação (mm)	Temp Max (°C)	Temp Min (°C)	Temp Média (°C)	Umidade (%)	Duração dos dias (hs)
Desfavorável	158,12 ± 80,13	29,39 ± 1,10	19,14 ± 1,69	23,81 ± 1,11 ^a	58,55 ± 7,42	13,03 ± 0,18 ^b
Transição	17,73 ± 26,30	26,62 ± 2,58	15,35 ± 1,15	20,58 ± 1,78 ^b	53,49 ± 8,50	11,49 ± 0,46 ^a
Favorável	86,87 ± 104,53	26,92 ± 1,46	17,84 ± 2,39	21,74 ± 1,77 ^{ab}	64,62 ± 2,66	11,29 ± 0,29 ^a

Dados foram expressos em médias ± desvio padrão da média.

Época Desfavorável (Outubro a Fevereiro), Período de Transição (Julho a Setembro), Período Favorável (Março a Junho).

Letras sobrescritas diferentes indicam diferenças entre as colunas (p<0,05).

Fonte: Base de dados BPMED/INMET

Tabela 2. Influência das diferentes épocas do ano sobre o número de folículos visualizados no ovário, taxa de recuperação, número de oócitos recuperados/animal e qualidade dos oócitos recuperados/animal através da OPU em bubalinos.

Parâmetros Avaliados	Época desfavorável	Período de Transição	Época favorável
#Número de folículos/animal	10,03 ± 0,59	10,59 ± 0,84	8,83 ± 0,63
*Taxa de recuperação (%)	35,00 ± 3,89 ^a	33,83 ± 5,39 ^a	53,87 ± 5,90 ^b
#Número de oócitos/animal	3,73 ± 0,51	3,47 ± 0,55	5,33 ± 0,81
*Grau A	0,97 ± 0,21 ^a	0,18 ± 0,09 ^b	1,58 ± 0,38 ^a
*Grau B	0,69 ± 0,20 ^a	0,82 ± 0,27 ^{ab}	1,29 ± 0,22 ^b
*Grau C	0,55 ± 0,11	1,24 ± 0,47	0,75 ± 0,22
*Grau D	0,48 ± 0,13	0,47 ± 0,15	0,50 ± 0,22
*Desnudos	0,79 ± 0,18	0,47 ± 0,17	0,92 ± 0,27
*Expandidos	0,17 ± 0,08	0,29 ± 0,18	0,29 ± 0,17

Dados foram expressos em médias ± erro padrão da média. A taxa de recuperação foi calculada considerando o número de estruturas recuperadas por folículo aspirado.

Época desfavorável (Outubro a Fevereiro), Período de Transição (Julho a Setembro), Período Favorável (Março a Junho).

Letras sobrescritas diferentes indicam diferenças entre as colunas (p<0,05).

#Anova

*Teste de Kruskal-Wallis

Tabela 3. Influência das diferentes épocas do ano sobre o número de folículos visualizados no ovário, taxa de recuperação, número de oócitos recuperados/ovário e qualidade dos oócitos recuperados/ovário através de ovários bubalinos de frigorífico.

Parâmetros Avaliados	Época Desfavorável	Período de Transição	Época Favorável
#Número de folículos/animal	9,85 ± 0,66	10,96 ± 1,28	8,65 ± 0,70
*Taxa de recuperação (%)	36,39 ± 5,27	44,58 ± 5,49	46,67 ± 6,26
#Número de oócitos/animal	3,29 ± 0,33	4,86 ± 0,70	3,98 ± 0,63
#Grau A	1,43 ± 0,09	1,75 ± 0,33	1,45 ± 0,37
#Grau B	0,83 ± 0,12	1,16 ± 0,26	1,00 ± 0,16
#Grau C	0,21 ± 0,05	0,40 ± 0,15	0,32 ± 0,14
#Grau D	0,22 ± 0,05	0,13 ± 0,07	0,31 ± 0,08
#Desnudos	0,19 ± 0,06	0,62 ± 0,39	0,33 ± 0,10
#Expandidos	0,40 ± 0,07	0,78 ± 0,14	0,55 ± 0,16

Dados foram expressos em médias ± erro padrão da média.

A taxa de recuperação foi calculada considerando o número de estruturas recuperadas por folículo aspirado. Época desfavorável (Outubro a Fevereiro), Período de Transição (Julho a Setembro), Período Favorável (Março a Junho).

Não houve diferença dos parâmetros em relação a época do ano ($p > 0,05$).

#Anova

*Teste de Kruskal-Wallis

Tabela 4. Efeito da época do ano sobre as taxas de clivagem e de blastocistos, % embriões no D7 e no D8 de bovinos e bubalinos.

Parâmetros Avaliados	Época desfavorável		Período de Transição		Época favorável	
	Búfalo	Bovino	Búfalo	Bovino	Búfalo	Bovino
*Taxa de Clivagem (%)	38,66 ± 3,5 ^{aA}	67,34 ± 2,14 ^{bA}	35,92 ± 3,39 ^{aA}	56,18 ± 2,60 ^{bB}	63,36 ± 7,00 ^B	66,39 ± 2,23 ^A
#Blastocistos no D7 (%)	84,32 ± 4,06 ^A	91,72 ± 2,62	45,54 ± 11,94 ^{aB}	82,87 ± 4,82 ^b	86,88 ± 3,81 ^A	90,91 ± 3,04
#Blastocistos no D8 (%)	15,68 ± 4,06	8,28 ± 2,62	45,36 ± 11,93 ^a	17,13 ± 4,82 ^b	13,12 ± 3,81	9,08 ± 3,04
*Taxa de blastocistos	28,80 ± 2,99 ^A	26,68 ± 1,96	20,18 ± 3,76 ^A	25,98 ± 2,28	47,96 ± 5,01 ^{aB}	28,91 ± 2,09 ^b

Dados foram expressos em médias ± erro padrão da média.

Época desfavorável (Outubro a Fevereiro), Período de Transição (Julho a Setembro), Período Favorável (Março a Junho).

Taxa de clivagem: obtida a partir de estruturas de 4-8 células contadas no D3/número total de oócitos cultivados. % de blastocistos no D7 e D8: calculada pelo número de Blastocistos (BL) no D7 ou D8/total de blastocistos produzidos. Taxa de blastocistos: calculada pelo número total de BL/número de oócitos cultivados.

Letras minúsculas diferentes apontam diferenças entre as espécies em uma mesma época do ano, letras maiúsculas diferentes apontam diferenças entre as épocas do ano em uma mesma espécie.

#Mann-Whitney/Kruskal-Wallis

*Teste T/Anova-Duncan

Tabela 5. Comparação entre a taxa de clivagem, % blastocistos no Dia 7 (D7), % blastocistos no Dia 8 (D8) e taxa de produção de embriões entre bovinos e búfalos.

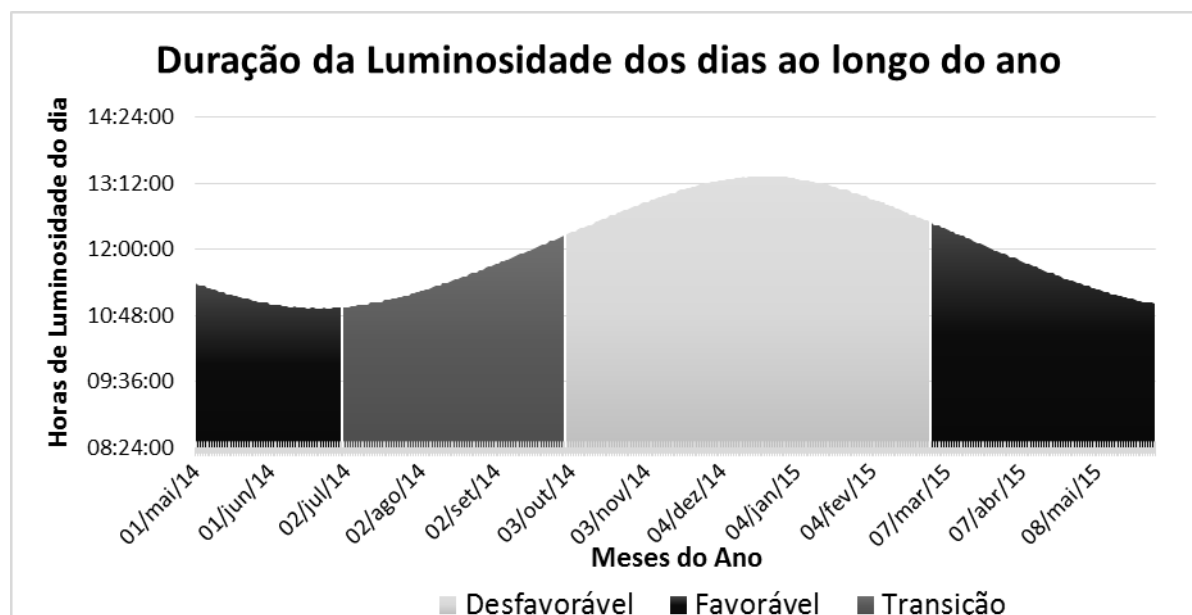
Parâmetros Avaliados	Búfalo	Bovino
*Taxa Clivagem (%)	35,69 ± 6,28 ^a	63,22 ± 3,30 ^b
#Blastocistos no D7 (%)	77,78 ± 13,43	79,39 ± 6,72
#Blastocistos D8 (%)	22,11 ± 13,43	20,60 ± 6,72
*Taxa de produção de blastocistos	25,07 ± 6,34	27,92 ± 3,54

Dados foram expressos em médias ± erro padrão da média.

Taxa de clivagem: obtida a partir de estruturas de 4-8 células contadas no D3/número total de oócitos cultivados. % de blastocistos no D7 e D8: calculada pelo número de Blastocistos (BL) no D7 ou D8/total de blastocistos produzidos. Taxa de blastocistos: calculada pelo número total de BL/número de oócitos cultivados

#Teste T

*Teste Mann-Whitney



Fonte: Base de dados BPMED/INMET

Figura 1. Demonstração da variação das horas de luz de Maio/2014 à Maio/2015. Época desfavorável (Outubro a Fevereiro), Período de Transição (Julho a Setembro), Período Favorável (Março a Junho).

CAPÍTULO 3

Trabalho a ser submetido à revista “Theriogenology”

As normas de publicação exigidas pelo periódico estão disponíveis no site*:

<http://www.elsevier.com/journals/theriogenology/0093-691X/guide-for-authors>

Maturação *in vitro* de oócitos bovinos e bubalinos com meio suplementado com óleo essencial de *Lippia origanoides* e seu efeito sobre o desenvolvimento embrionário

*Com intuito de facilitar a leitura e compreensão do texto por parte da banca examinadora, as citações ao longo do texto foram referenciadas de acordo com o nome do autor, e não com números, como consta nas normas exigidas pelo periódico.

RESUMO

Durante as etapas de maturação *in vitro* (MIV) e cultivo *in vitro* (CIV) dos embriões, as condições atmosféricas e de manipulação destes intensifica a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), responsáveis por causar danos celulares, levando a morte embrionária. Uma das estratégias para minimizar esses efeitos é o enriquecimento dos meios MIV e CIV com antioxidantes, buscando-se eliminar o excesso de radicais livres. Diante disso, o presente trabalho avaliou o efeito da suplementação do meio MIV com o óleo essencial de *Lippia origanoides* (OELO) em diferentes concentrações, sobre as taxas de maturação nuclear, citoplasmática, de blastocistos e qualidade dos embriões bovinos e bubalinos produzidos *in vitro*. Foram utilizados para maturação 3304 oócitos bovinos e 963 oócitos bubalinos recuperados de ovários oriundos de abatedouro, na qual os classificados como Grau A e B foram divididos em 5 tratamentos: T1 (Meio Base (MB): TCM 199 bicarbonato suplementado com 10% SFB, 22µg/mL Piruvato, 5UI/mL LH, 0,5µg/mL FSH, 1µg/mL Estradiol, 83 µg/mL de Amicacina), T2 (MB+50 µM/mL de cisteamina), T3 (MB+2,5µg/mL de OELO), T4 (MB+5 µg/mL de OELO) e T5 (MB+10 µg/mL de OELO). Os oócitos foram maturados por 24 horas, e em seguida uma parcela destes foram fertilizados e subsquentemente cultivados até o estágio de blastocistos. A taxa de clivagem foi verificada após 48 horas de cultivo e a produção de blastocistos nos dias 7 e 8. Outra parcela dos oócitos foram avaliados quanto a maturação nuclear e citoplasmática através do padrão de distribuição da cromatina e das mitocôndrias, marcadas com 4'6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) e MitoTacker Orange, respectivamente. Além disso, para verificação da qualidade, os embriões foram submetidos ao teste TUNEL para determinar a taxa de apoptose e número total de células. O meio maturação após a MIV foi analisado com o Kit QuantiChrom™ Peroxidase Assay para determinar a concentração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Para a comparação de médias foi utilizado ANOVA e Teste Duncan. O nível de significância considerado foi $p < 0,05$. Notou-se um aumento da taxa de maturação nuclear quando se utilizou o 2,5µg/mL de OELO (T3) frente ao meio sem antioxidante (T1) ($p < 0,05$). Entre os oócitos maturados *in vitro*, a taxa de maturação citoplasmática não diferiu entre os tratamentos ($p > 0,05$). Ao comparar a taxa de expansão do *cumulus*, a taxa de clivagem e a taxa de blastocistos em bovinos e bubalinos de acordo com os diferentes tratamentos, constatou-se não haver diferença significativa entre as duas espécies ($p > 0,05$). O número total de células se mostrou superior em embriões bubalinos maturados em meios MIV

enriquecidos com 2,5 e 5,0µg/mL de OELO ($p<0,05$). Tanto a taxa de apoptose dos embriões quanto de concentração de peróxido nos meios MIV não alteraram de acordo com os tratamentos ($p>0,05$). O enriquecimento do meio MIV com 2,5µg/mL a 5µg/mL de óleo essencial de *Lippia origanoides* sugerem uma melhoria das taxas de maturação e qualidade embrionária nos embriões produzidos *in vitro*, criando uma expectativa favorável para incorporação futura desta substância nos sistemas de produção *in vitro* de embriões.

1. Introdução

A maturação *in vitro* (MIV) dos oócitos mamíferos é um dos eventos mais importantes para o processo de produção *in vitro* de embriões (PIVE), uma vez que determina o potencial de sucesso da atividade (Gotardi e Mingoti, 2009). Esta etapa envolve alterações tanto nucleares quanto citoplasmáticas, que apesar de serem eventos distintos, acredita-se que estejam interligados e ocorram concomitantemente, indicando a capacidade do gameta evoluir até o estabelecimento de uma gestação (Ferreira et al. 2009).

A maturação nuclear diz respeito aos eventos relacionados a progressão dos oócitos desde a fase de dictióteno da Meiose I até a Metáfase da Meiose II resultando na extrusão do 1º corpúsculo polar, requerida para formação adequada do fuso meiótico (Yindee et al. 2011). Experimentalmente, esta progressão pode ser determinada pela visualização da configuração cromossômica através de corantes fluorescentes tanto em bovinos (Guemra et al. 2013) quanto em bubalinos (Gasparrini et al. 2008). Já a maturação citoplasmática envolve inúmeros eventos que incluem a redistribuição citoplasmática das organelas, dinâmica dos filamentos do citoesqueleto e maturação molecular (Ferreira et al. 2009). A complexidade destes eventos reflete na dificuldade de precisar exatamente o grau de maturação citoplasmática nos oócitos, entretanto, o padrão de distribuição e agregação das mitocôndrias no ooplasma têm sido utilizados em pesquisas para determinar o sucesso dos procedimentos de MIV (Katska-Ksiazkiewicz et al. 2011; Jeseta et al. 2012).

A realização da MIV em condições subótimas é responsável por reduzir as taxas de PIVE tanto em bovinos quanto em bubalinos, assim, busca-se a realização de estudos com intuito de determinar condições ideais que proporcionariam a elevação das taxas de PIVE atualmente encontradas (Elmaran et al. 2012). Contudo, este procedimento não é

tão simples, uma vez que, vários fatores podem interferir na maturação oocitária (Santos et al. 2002). Durante a MIV, a alta tensão de oxigênio, exposição à luz e excesso de manipulação decorrentes das condições *in vitro* são responsáveis pela elevação dos níveis de ânions superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^-), conhecidas como espécies reativas de oxigênio (EROs) (Sadeesh et al. 2014). A elevação dos níveis de EROs pode culminar com um desequilíbrio em relação ao sistema antioxidante da célula, levando a um evento conhecido como estresse oxidativo (Andrade et al. 2010). Esta situação acarreta alterações irreversíveis em oócitos e embriões que incluem danos no DNA, RNA e proteínas, além da peroxidação lipídica que leva à disfunção mitocondrial, ocasionando elevação dos níveis de apoptose e falhas no desenvolvimento dos oócitos, expressas pela redução das taxas de blastocistos (Elmaram et al. 2012). Oócitos e embriões bubalinos parecem ser mais sensíveis ainda ao estresse oxidativo em razão do alto conteúdo lipídico dos mesmos (Boni et al. 1992).

Diante disso, o incremento dos meios de maturação com antioxidantes tem sido sugerido na tentativa de auxiliar a redução dos EROs, especialmente em sistemas de alta concentração de oxigênio, mantendo as funções dos oócitos e proporcionando melhoria das taxas de produção *in vitro* de embriões bovinos e bubalinos (Guemra et al. 2013; Sadeesh et al. 2014). Neste contexto, a utilização do óleo essencial de *Lippia origanoides* (OELO) representa uma real alternativa que poderia proporcionar melhoria dos sistemas já utilizados. A *Lippia origanoides* é um arbusto aromático nativo da América Central e norte da América do Sul que tem sido usado na medicina tradicional para tratamento de doenças gastrointestinais e respiratórias (Teles et al. 2014). O OELO apresenta poderoso efeito antioxidante devido à alta concentração principalmente do composto carvacrol (41,51%) e do timol (4,86%) (Teixeira et al. 2014), que possuem elevado potencial antioxidante, uma vez que, são derivados dos compostos fenólicos, capazes de doar átomos de hidrogênio. Estas características representam favoráveis perspectivas de utilização desta substância em cultivos celulares e embrionários.

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito antioxidante da adição do óleo essencial de *Lippia origanoides* no meio de maturação *in vitro* sobre as taxas de maturação nuclear e citoplasmática dos oócitos bovinos além de verificar o efeito deste óleo sobre a qualidade e a taxa de produção *in vitro* de embriões bovinos e bubalinos.

2. Material e Métodos

Materiais e Reagentes

Todos reagentes e meios utilizados foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EUA), a menos que seja especificado. Dos materiais plásticos utilizados, as placas de Petri de 100 x 20mm e 60 x 15mm e Tubos Falcon de 15 e 50 mL eram da marca TPP®(Trasadingen, Switzerland) e ponteiros da marca Axygen (Union City, CA, USA).

Produção *in vitro* de embriões

Coleta dos oócitos

Ovários de vacas zebuínas e búfalas foram coletados em um abatedouro localizando na cidade de Pará de Minas/MG, durante o período de Abril de 2014 até Março de 2015. Estes ovários foram coletados no momento da evisceração dos animais e acondicionados em uma garrafa térmica contendo solução salina 0,9% acrescida de 1ml/L de solução antibiótica (0,05g/L Penicilina G Potássica, 0,05g/L Sulfato de estreptomicina, 0,1g/L Sulfato de Gentamicina) mantida à 35-37°C. Neste recipiente, em um intervalo de no máximo 2 horas, os ovários foram transportados para o Laboratório de Células Embrionárias e produção de Animais Transgênicos/UFMG onde foram devidamente processados.

No laboratório os ovários eram imediatamente aspirados com agulhas de 40x12mm acoplada de seringa de 3mL. O líquido resultante da aspiração folicular foi depositado em tubos Falcon de 15 mL ao qual permaneciam em banho-maria à temperatura de 37°C. Após o preenchimento destes, aguardou-se aproximadamente 10-15 minutos para decantação dos complexos *cumulus*-oócitos e em seguida realizou-se a retirada do excesso de líquido folicular. Posteriormente, o conteúdo do tubo foi vertido em uma placa de Petri 100 x 20 mm e o interior do mesmo foi lavado com meio de lavagem (ML) constituído de TCM 199 Hepes (Gibco®) acrescido de 10% Soro Fetal Bovino (SFB) (Gibco®), 83 µg/mL de Amicacina (Nova Farma®), 0,2mM de piruvato de sódio.

Os oócitos bubalinos foram classificados de acordo com o aspecto morfológico seguindo os parâmetros estabelecidos por Di Francesco et al. (2011), de forma que apenas oócitos Grau A (citoplasma homogêneo e superfície cercada de várias camadas de células do *cumulus*) e Grau B (citoplasma homogêneos e com pelo menos 70% da superfície envolvida por múltiplas camadas de células do *cumulus*) foram incluídos nos

procedimentos de maturação. De forma semelhante, apenas os oócitos bovinos classificados em Grau I (Complexo *cummulus-oophorus* (COCs) compacto, mais de três camadas de células e citoplasma homogêneo) e Grau II (COCs compacto com número de camadas de células do *cummulus* igual ou menor a três, e citoplasma levemente heterogêneo), de acordo com a os parâmetros descritos por Viana et al. (2004), foram submetidos à MIV.

Maturação in vitro

Nesta etapa os oócitos de ambas as espécies foram separados em diferentes tratamentos de acordo com a constituição do meio de maturação. O tratamento 1 (T1) era representado pelo meio de maturação base (MB) constituído de TCM-199 bicarbonato (Gibco®), suplementado com 10% de SFB, 22µg/mL Piruvato, 83 µg/mL de amicacina (Nova Farma®), 0,5 µg/mL de FSH (Folltropin®, Bioniche) e 5 UI/mL de LH (Chorulon®, MSD Saúde Animal) e 1 µg/mL de estradiol. O tratamento 2 (T2) foi constituído do MB suplementado com 50 µM de cisteamina. O tratamento 3 (T3), o tratamento 4 (T4) e o tratamento 5 (T5) foram constituídos do MB acrescido de 2,5; 5,0 e 10,0 µg/mL de OELO, respectivamente. A maturação foi realizada em gotas de 70 µL, sob óleo mineral, temperatura de 38,5°C, atmosfera gasosa controlada de 5% CO₂, umidade de aproximadamente 95% por um período médio de 22-24 horas. Cada gota continha aproximadamente 15 oócitos bovinos ou bubalinos.

FIV e CIV

Ao final da maturação, os oócitos foram submetidos à fecundação *in vitro* (FIV). Para tanto uma palheta de um touro bovino ou bubalino, foi descongelada à 37°C por 30 segundos. Os espermatozoides viáveis eram obtidos por centrifugação a 750rpm por 5 minutos em gradiente Percoll (2mL 45% Percoll + 2mL de 90% Percoll) e posteriormente realizado a lavagem do pellet em meio de lavagem TL-Sêmen. A fecundação (considerada dia 0; D0) foi realizada em uma gota de 70 µL em meio *Tyrodé's-albumina-lactato-piruvato* (TALP) suplementado com 83 µg/mL de amicacina, 44 µL/mL da solução PHE, 0,6% de albumina sérica bovina (BSA), 0,2mM de piruvato de sódio e 10 µg/mL de heparina. Os espermatozoides foram adicionados às gotas de FIV em uma concentração final de 2×10^6 células/mL. As gotas foram cobertas com óleo mineral e incubadas sob as mesmas condições da MIV por um período de aproximadamente 18 a 20 horas.

Ao término da FIV, os prováveis zigotos foram submetidos ao procedimento de desnudamento mecânico através de pipetagens consecutivas para retirada das células do *cumulus*, e em seguida, foram lavados e transferidos para o cultivo *in vitro* (CIV). O cultivo foi realizado em gotas de 70 µL constituídas de meio sintético de fluido de oviduto (SOF) suplementado com 0,2 mM de piruvato de sódio, 83 µg/mL de amicacina, 0,5% BSA livre de ácido graxo fração V e 2,5% de SFB sob óleo mineral. O cultivo foi realizado à temperatura de 38,5°C sob baixa tensão de oxigênio (5%O₂, 5%CO₂ e 90%N₂). Os embriões permaneceram no cultivo por 7 a 8 dias em ambas as espécies.

Para determinação da taxa de clivagem os embriões de todos tratamentos foram avaliados 48 (D2) a 72 (D3) horas pós inseminação (hpi) sob microscópio estereoscópio (aumento de 40x), quando continham 2 a 8 células. Neste momento foi realizado também o procedimento de *feeding*, na qual aproximadamente 40% do volume da gota (30µL) foi substituído por meio novo. Este procedimento foi novamente realizado 106hpi (D4) a 120hpi (D5), contudo nesta etapa o meio CIV adicionado continha 5mM de glicose. As taxas de blastocistos de todos tratamentos foram observadas 168hpi (D7) e 192hpi (D8) para os embriões bovinos e bubalinos.

Avaliação da maturação nuclear e citoplasmática

Para avaliação da taxa de maturação oocitária, os parâmetros analisados foram a expansão do *cumulus*, a configuração cromossômica e o padrão de distribuição mitocondrial.

Primeiramente, logo após a MIV, todos oócitos de cada tratamento foram classificados de acordo com a ocorrência ou não da expansão das células do *cumulus*, seguindo os parâmetros adotados por Sadeesh et al. (2014). Em sequência, a parcela de oócitos que não foram destinados a PIVE, mais um grupo de oócitos não maturados (controle imaturos), foram submetidos ao processo de coloração para determinar a maturação nuclear e citoplasmática, de acordo com a metodologia proposta por Jeseta et al. (2014). Para tal, os oócitos foram incubados por 30 minutos à 38,5°C a 5% CO₂ com *phosphate buffered saline* (PBS) suplementado com 4% BSA e 280nM Mitotracker Orange (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Desta forma, apenas mitocôndrias que estavam fisiologicamente ativas foram coradas. Após a lavagem os oócitos permaneceram por 5 minutos em uma solução de Hialuorindase a 5%, previamente aquecida, para auxiliar no procedimento de remoção das células do *cumulus*, e em seguida, estas células foram removidas por pipetagens consecutivas. Após lavagem em

PBS sem BSA os oócitos foram fixados em formaldeído 3,7%, por 60 minutos, à temperatura ambiente. Após a fixação, foram realizadas lavagens consecutivas e os oócitos foram colocados sobre a lâmina, onde se adicionou uma gota de Fluoroshield com 4'6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), objetivando marcar a configuração cromossômica para determinação da maturação nuclear. As lâminas foram então armazenadas a 4°C até a leitura.

A configuração da cromatina foi avaliada sob microscópio de epifluorescência (EVOS® FL Cell Imaging System, Life Technologies). Com filtro de excitação de 365nm e de emissão de 420 nm os oócitos foram classificados em Quebra da Vesícula Germinativa (QVG), Metáfase I (MI), Metáfase II (MII) seguindo os critérios adotados por Santos et al. (2002).

Para determinação da atividade mitocondrial, os oócitos foram avaliados e as imagens capturadas no Microscópio Confocal LSM 510 Meta (ZEISS) (onda emissão de 543nm e onda de excitação de 585 a 649nm). O padrão de distribuição mitocondrial foi definido como: distribuição homogênea das mitocôndrias por todo ooplasma, distribuição heterogênea das mitocôndrias pelo citoplasma e distribuição periférica das mitocôndrias (Figura 01), seguindo o padrão adotado por Katska-Ksiazkiewicz et al. (2011). Todas as imagens foram avaliadas e processadas utilizando o software Zeiss LSM Image Browser Version 4.2.0.121.

Avaliação do número total de células e apoptose

Para determinação da qualidade dos embriões, foi adotado o critério de avaliação do número total de células e determinação da taxa de apoptose. O número total de células foi avaliado em embriões bovinos e bubalinos. Em relação a apoptose foi realizado o teste TUNEL para ambas as espécies, no entanto, foram considerados apenas os resultados de bubalinos, visto que, os embriões bovinos apresentaram resultados imprecisos, em razão do elevado tempo de armazenamento que pode ter provocado a degradação do DNA dos blastômeros ponto de não serem visualizados.

A fragmentação do DNA foi avaliada como indicador de apoptose em células embrionárias, utilizando o Kit comercial Dead End Fluorimetric TUNEL System (Promega, Madison, WI, EUA). Após o D8 de cultivo, blastocistos bubalinos provenientes dos cinco tratamentos da maturação foram lavados separadamente em gotas de 100 µl de solução PBS acrescida de 0,1% BSA, em seguida foram fixados em formaldeído 4%, lavados novamente e armazenados em criotubos com solução salina

fosfatada acrescida de 0,1% BSA por 1 a 2 meses a 4°C. O teste para avaliação da apoptose foi realizado de acordo com as recomendações descritas no Kit. Primeiramente, os embriões foram permeabilizados em solução PBS acrescida de 0,2% de Triton X-100, e incubados em gotas de tampão de equilíbrio, mix de nucleotídeos, enzima rTdT e corante de fluoresceína-12-dUTP, que cora o DNA fragmentado, onde permaneceram a 37°C por 1 hora em câmara úmida coberta com papel alumínio. No controle negativo, os embriões foram incubados com tampão de equilíbrio sem enzima rTdT. No controle positivo, os embriões foram incubados com tampão de equilíbrio, enzima DNase (que promoveu a degradação do DNA nas células do embrião) e a enzima fluoresceína-12-dUTP. Na etapa subsequente, os embriões foram transferidos para lâmina, corados com *Fluoroshield* contendo DAPI e recobertos com *cover slip*. Todos os blastômeros embrionários foram marcados pelo DAPI e visualizados em azul no filtro de 460 nm do microscópio de fluorescência (Leica DM 4000B, Wetzlar, Germany). As células embrionárias em apoptose foram identificadas no filtro de 520 ± 20 nm corando-se de cor verde pela fluoresceína. As lâminas foram observadas em microscópio de epifluorescência e as imagens foram capturadas utilizando o programa Image-Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics, Silver Spring, EUA). Posteriormente, o número total de células e o número de células apoptóticas foram analisados utilizando o programa Image J (versão 1.42e, dezembro de 2008). O índice apoptótico foi calculado a partir da divisão do número de células contendo corpos apoptóticos (TUNEL positiva) sobre o número total de células do embrião (KIDSON et al., 2004).

Quantificação dos níveis de peróxidos nos meios de maturação

Após a retirada dos oócitos do meio MIV para posterior processamento, alíquotas do meio de maturação resultante de todos tratamentos foram congeladas a -20°C para posterior quantificação dos níveis de peróxidos (H₂O₂). Foram utilizadas 23 amostras do meio MIV de cada espécie, que foram descongeladas imediatamente antes do teste e avaliadas. A reação foi realizada de acordo com a orientação do QuantiChrom™ Peroxidase Assay Kit (DIOX-250) (Bioassay Systems LLC, Hayward, CA, USA) e a leitura realizada em um leitor de ELISA (Labsystems Varioskan LUX – Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, EUA).

Análise estatística

O teste de Shapiro Wilk foi utilizado para avaliar a normalidade das variáveis contínuas: taxa de expansão do *cumulus*, taxa de clivagem, taxa de blastocistos, taxa de

células positivas no TUNEL, número de células embrionárias e concentração de peróxido de hidrogênio. Para análise das variáveis contínuas em relação aos diferentes tratamentos, as variáveis normais e as que atenderam as premissas de normalidade após a transformação foram analisadas pelo teste ANOVA seguido do Teste Duncan. Na impossibilidade de se obter a normalidade das variáveis, a análise estatística foi realizada pelo teste Kruskal-Wallis. O teste de qui-quadrado ou exato de Fischer foi utilizado para avaliar a associação das variáveis categóricas (maturação nuclear e citoplasmática) em relação aos tratamentos. Todas as análises foram realizadas com a versão 17.0 do programa SPSS (SPSS Inc, Chicago, EUA), e o nível de significância considerado foi de $p < 0,05$.

3. Resultados

Durante a execução do presente estudo, ocorreram problemas de ordem técnica que impediram que alguns testes fossem realizados em ambas as espécies estudadas. Como mencionado anteriormente, diante do prolongando tempo de armazenamento dos embriões bovinos até a realização do teste TUNEL, que possivelmente ocasionou a degradação do DNA dos blastômeros, a marcação das células apoptóticas nestes embriões não foi totalmente eficiente. Assim, somente os dados de TUNEL de bubalinos foram considerados no presente trabalho. Além disso, em razão da considerável redução de abates de bubalinos nos frigoríficos monitorados no ano de 2015 (apenas 1 abate nos 5 primeiros meses do ano), a avaliação da maturação nuclear e citoplasmática foi considerada apenas em oócitos bovinos.

De acordo com a Tabela 01, houve significante redução da configuração cromossômica do estágio de quebra de vesícula germinativa observada nos oócitos bovinos maturados (T1, T2, T3, T4 e T5) frente aos oócitos imaturos ($p < 0,05$). Além disso, as configurações cromossômicas que indicam Metáfase (MI) e Metáfase II (MII) foram maiores nos oócitos maturados comparados aos oócitos imaturos ($p < 0,05$). Ao comparar entre os tratamentos maturados, observou-se que os índices obtidos na maturação nuclear no T1 (constituído de maturação em MB) se assemelharam ao T2 (MB+cisteamina), T4 (MB + 5 μ g/mL OELO); T5 (MB + 10 μ g/mL OELO) ($p > 0,05$), diferindo apenas do T3 (MB + 2,5 μ g/mL OELO) ($p < 0,05$). Entretanto, as taxas encontradas em T3 não diferiram do T2 e T5 ($p > 0,05$). Em relação a maturação citoplasmática, o padrão de distribuição das mitocôndrias dos oócitos imaturos diferiu de todos tratamentos (T2, T3, T4 e T5) ($p < 0,05$), exceto do T1 ($p > 0,05$). Entre os oócitos

submetidos a maturação, não foi notada diferença entre os tratamentos independente do antioxidante e a concentração utilizada ($p>0,05$) (Figura 02).

Como sumarizado na Tabela 02, a porcentagem de oócitos bovinos que alcançaram a maturação nuclear foi inferior nos oócitos imaturos comparados a todos tratamentos em que foram submetidos a maturação *in vitro* ($p<0,05$). Entre os oócitos que foram maturados, quando utilizou-se o meio base sem adição de antioxidante (T1) foi observada uma redução da taxa de maturação nuclear comparado a utilização de MB + 2,5µg/mL de OELO (T3) ($p<0,05$), não diferindo do restante dos tratamentos ($p>0,05$). A porcentagem de oócitos que alcançaram a maturação citoplasmática não diferiu entre os oócitos imaturos e oócitos maturados do T1 ($p>0,05$), entretanto, oócitos imaturos apresentaram taxas de maturação citoplasmática menor do que todos outros tratamentos ($p<0,05$). Entre os oócitos maturados *in vitro*, a taxa de maturação citoplasmática não diferiu entre os tratamentos ($p>0,05$).

Ao comparar a taxa de expansão do *cumulus*, a taxa de clivagem e a taxa de blastocistos de 3304 oócitos bovinos (Tabela 03) e 963 oócitos bubalinos (Tabela 04) maturados *in vitro*, divididos em tratamentos compostos de meios de maturação contendo diferentes concentrações de antioxidantes, constatou-se que não houve diferenças significativas entre estes parâmetros nas duas espécies ($p>0,05$).

Como demonstrado na Tabela 05, o número total de células nos blastocistos bovinos não alterou entre os diferentes tratamentos utilizando antioxidante e o controle sem antioxidante ($p>0,05$). Em bubalinos, notou-se uma significativa elevação do número total de células dos blastocistos quando os meios de maturação foram enriquecidos com 2,5µg/mL (T3) e 5µg/mL (T4) de óleo essencial mínimo de *Lippia origanoides* ($p<0,05$). Em relação a apoptose, não foram observadas diferenças na taxa de células positivas no teste TUNEL para os blastocistos bubalinos produzidos a partir de meios de maturação contendo diferentes concentrações de antioxidante ($p>0,05$) (Figura 03).

Os valores médios ($\pm$ desvio padrão) das concentrações de peróxido de hidrogênio(ng/mL), encontrados nos meios de maturação de oócitos bovinos após a MIV, referentes aos tratamentos T1, T2, T3, T4 e T5 foram de $0,975 \pm 0,019$; $0,975 \pm 0,016$; $0,982 \pm 0,021$; $0,976 \pm 0,010$; $0,972 \pm 0,016$, respectivamente. Em bubalinos, os valores médios ($\pm$ desvio padrão) de H₂O₂ encontrados nos meios MIV pós maturação foram de $0,976 \pm 0,010$; $0,959 \pm 0,004$; $0,968 \pm 0,007$; $0,964 \pm 0,011$ e $0,967 \pm 0,013$, para os tratamentos T1, T2, T3, T4 e T5, respectivamente. Como demonstrado na Figura 04, não

foram encontradas diferenças significativas entre os diferentes tratamentos em ambas as espécies ($p > 0,05$).

4. Discussão

O presente estudo avaliou se o enriquecimento do meio de maturação *in vitro* com um potente antioxidante natural, oriundo da *Lippia origanoides*, poderia favorecer a maturação nuclear e citoplasmática de oócitos bovinos e bubalinos, proporcionando maiores taxas de produção *in vitro* de embriões em ambas as espécies.

Para a aquisição da plena competência, o oócito deverá passar com excelência pelas etapas de maturação citoplasmática e nuclear que permitirão expressar sua máxima capacidade de desenvolvimento após a fecundação. A maturação nuclear é iniciada com a retomada da meiose, que proporciona a quebra da vesícula germinativa (QVG), passando pela fase de Metáfase I, concluindo assim a primeira redução meiótica. Logo em seguida ocorre a emissão do primeiro corpúsculo polar, e finalmente, atinge-se a fase de metáfase II (Tripathi et al. 2010).

No presente estudo, como esperado, observou-se um significativo aumento nas taxas de maturação nuclear dos oócitos maturados frente aos oócitos não maturados. Além disso, maior porcentagem de oócitos maturados em meio contendo 2,5µg/mL de Óleo Essencial de *Lippia origanoides* atingiram a Metáfase II quando comparados aos oócitos maturados em meio sem antioxidante. Esse fato demonstra que a adição do óleo de *Lippia* na concentração supracitada, poderia levar um efeito benéfico, aumentando a progressão dos oócitos até a fase de Metáfase II quando maturados neste meio. Este resultado está de acordo com outros autores que também encontraram efeito favorável sobre a maturação nuclear quando se adiciona antioxidantes no meio MIV (De Matos et al., 2002; Maya-Soriano et al. 2013; Khalil et al. 2013). Acredita-se que o acréscimo do antioxidante possa elevar os níveis de glutathione (GSH) no meio de cultivo (Gemra et al. 2013), protegendo os oócitos dos danos causados pelo estresse oxidativo, proporcionando assim maiores taxas de maturação nuclear e citoplasmática (De Matos et al., 2002). Contudo, estes achados não implicam necessariamente em maiores taxas de embriões, visto que é necessário que ocorra concomitantemente, com sucesso, a maturação citoplasmática (Eppig, 1996).

A importância do papel da mitocôndria oocitária para o desenvolvimento embrionário inicial tem sido reportado em camundongos (Larson et al. 1998). Embora diferentes padrões mitocondriais sejam descritos em oócitos durante a maturação *in vitro*

este é um importante parâmetro para avaliar a competência de desenvolvimento do oócito *in vitro* (Tarazona et al. 2006). Ambrousi et al. (2009) descreveram que o padrão de distribuição homogênea de pequenos grânulos mitocondriais no ooplasma indica imaturidade citoplasmática do oócito, enquanto que, a distribuição heterogênea de grânulos indica ooplasma ativo metabolicamente, e o acúmulo de mitocôndrias na periferia do citoplasma e ou em torno do núcleo definem a maturação citoplasmática completa.

A distribuição das mitocôndrias perinuclear e periféricamente em oócitos maduros está de acordo com papel fisiológico da mesma durante as fases da meiose, como descrito em búfalos (Mondaroni, et al. 2010). Em humanos foi demonstrado que os *clusters* mitocondriais próximos a cromatina e na periferia do ooplasma, podem ser importantes para controlar o pH intracelular local, influenciando na função protéica e do citoesqueleto na organização citoplasmática (Eichenlaub-Ritter et al. 2004). A observação da distribuição mitocondrial perinuclear pode relacionar-se com seu hipotético papel de fornecer energia para a migração cromossômica. As mitocôndrias formam uma esfera de mitocôndrias que se aproximam dos cromossomos bivalentes e leva a formação do fuso na metáfase I e II (Elbert et al. 1998). Assim, seguindo o padrão sugerido Ambrousi et al. (2009), no presente trabalho, definiu-se como imaturos citoplasmaticamente, o oócitos que apresentavam distribuição homogênea das mitocôndrias e maturados os oócitos que apresentavam padrão heterogêneo e periférico das mitocôndrias (Fig 01).

No presente experimento usou-se o MitoTracker Orange, que atua marcando permanentemente as mitocôndrias em funcionamento dentro do ooplasma (Machatkova et al. 2012). Dentre o padrão de distribuição mitocondrial apresentado no presente estudo, observou-se uma predominância significativa de homogeneidade de distribuição das mitocôndrias apenas nos oócitos imaturos, confirmando os achados de Ambrousi et al. (2009). Alguns oócitos não maturados apresentavam também baixa intensidade de fluorescência, que foi descrita como padrão encontrado em oócitos que não apresentaram maturação citoplasmática completa (Tarazona et al. 2006). Nos oócitos maturados neste estudo, constatou-se predominância dos padrões homogêneos e heterogêneos de distribuição das mitocôndrias. Esta situação encontrada pode indicar que uma parcela intermediária dos oócitos alcançou a plena maturação citoplasmática, enquanto outra parcela semelhante não atingiu uma distribuição ideal de mitocôndrias encontrada em oócitos competentes. Contudo, o que se percebe na literatura é que a distribuição das mitocôndrias dentro do ooplasma não obedece uma norma segura e precisa para predizer

a competência do oócito. Enquanto alguns autores descrevem que as mitocôndrias após a maturação migram para região pericitoplasmática e nuclear (Tarazona et al. 2006; Ambrousi et al. 2009), inclusive com comprovação de microscopia eletrônica (Mondaroni et al. 2010), outros autores afirmam que após a MIV as mitocôndrias tendem a migrar para região central (Stojkovic et al. 2001; Machatkova et al. 2012) ou se apresentam difusas dentro do ooplasma (Krister e Bavister, 1998).

Quando se analisou as taxas de expansão do *cumulus*, a taxa de clivagem e a taxa de blastocistos no presente estudo não foi constatada diferença significativa entre os tratamentos constituídos por diferentes concentrações de antioxidante em bovinos. Esses achados discordam de autores que encontram elevação da taxa de embriões bovinos e bubalinos quando usaram meios de maturação enriquecidos com antioxidantes (Ali et al. 2003; Gasparrini et al. 2003; Khalil et al. 2013). Diante de tal constatação, acredita-se que as concentrações de antioxidante utilizadas no presente experimento não foram capazes de proporcionar um efeito satisfatório, que implicasse na elevação da taxa de embriões produzidos *in vitro*.

Como notado neste estudo, a adição do óleo antioxidante promoveu um efeito benéfico na maturação nuclear, entretanto, não alterou os índices de maturação citoplasmática encontrados. Contudo, em bubalinos, apesar de não haver diferença significativa nos parâmetros avaliados, houve uma tendência de aumento nas taxas de produção de blastocistos quando se adicionou ao meio MIV 5µg/mL de óleo essencial de *Lippia origanoides*. Este efeito pode estar relacionado justamente ao efeito antioxidante dos compostos carvacrol e timol, encontrados em alta concentração nesta planta (Teixeira et al. 2014). Estes compostos agem nos meios de cultivos eliminando radicais livres capazes de provocar danos células levando ao aumento da morte celular e prejudicando o desenvolvimento embrionário. Acredita-se que por serem menos resistentes ao estresse oxidativo, em razão de possuírem embriões mais sensíveis (Gasparrini et al. 2006) e com maior teor lipídico (Boni et al. 1992), a utilização deste antioxidante em bubalinos poderia promover um efeito mais favorável sobre a produção de embriões *in vitro* nesta espécie do que em bovinos, assim como demonstrado por Gasparrini et al. (2006) em estudos anteriores utilizando meios enriquecidos com compostos tíois.

O número total de células juntamente com a taxa de células apoptóticas dos blastocistos são critérios utilizados indiretamente para definir a qualidade dos embriões (Anand et al. 2008; Antunes et al. 2010). No presente estudo constatou-se a adição de antioxidante no meio de maturação *in vitro* não foi capaz de promover aumento do

número de células nos embriões bovinos, assim como constatado em suínos (Kobayashi et al. 2006) e bubalinos (Anand et al. 2008) em meios suplementados com cisteamina. Entretanto, nos embriões bubalinos notou-se um aumento significativo do número de células nos embriões maturados em meio contendo 2,5µg/mL e 5µg/mL de óleo essencial de *Lippia origanoides*.

Apesar de não ter notório efeito sobre a produção de embriões, como demonstrado anteriormente, a adição do óleo antioxidante demonstrou um efeito positivo sobre o número total de células, indicando melhoria na qualidade dos embriões bubalinos, corroborando com os dados encontrados por Elamaram et al. (2012), que relataram aumento do número de células dos embriões bubalinos quando os meios MIV e CIV foram suplementados com cisteamina. As taxas de apoptose encontradas no presente trabalho para os embriões bubalinos não apresentaram diferenças em relação ao tratamento realizado. Uma possível explicação para tal fato é que o aumento do número de células apoptóticas nos embriões deverá ocorrer mais tardiamente, após a tradução de genes relacionados a apoptose, como verificado em bubalinos (Elamaram et al. 2012).

A análise das espécies reativas de oxigênio nos meios utilizados na maturação e cultivo embrionário é uma excelente ferramenta para se predizer a capacidade antioxidante das substâncias adicionada a estes meios. No presente estudo foi avaliado nos meios pós MIV, dos diferentes tratamentos, a concentração do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) com o Kit QuantiChrom™ Peroxide Assay Kit (DIOX-250), buscando definir a eficiência dos antioxidantes em eliminar o H₂O₂ presente no meio MIV. Embora não seja muito utilizado para cultivos embrionários, este Kit demonstrou grande sensibilidade para detecção de peróxido em meios de cultivo de bactérias (Yu et al. 2008), vírus (Deshmane et al., 2009) e plantas (Giao et al., 2007).

No presente trabalho não foi encontrada diferenças significativas nos valores de H₂O₂ presentes nos tratamentos sem antioxidante (controle), com cisteamina e contendo diferentes concentrações de óleo essencial de *Lippia origanoides*. Sugere-se que a adição do antioxidante não foi capaz de eliminar o peróxido de hidrogênio em quantidade suficiente para ser detectada pelo Kit. Apesar de terem sido mensurados em escalas diferentes, os valores encontrados no presente trabalho apresentaram-se um pouco abaixo do intervalo 0,08-0,19µM mensurados nos meios de cultivo *in vitro* de embriões bovinos acrescidos de ácido linoléico conjugado utilizados por Rahme (2012). A dificuldade de se encontrar na literatura trabalhos que tenham mensurado por este método as

concentrações de peróxido dificultam a comparação e discussão dos valores encontrados no presente estudo.

Diante dos resultados expostos, confirma-se que embora não tenha acrescido as taxas de maturação citoplasmática e tenha provocado ligeira elevação da maturação nuclear, o óleo essencial de *Lippia origanoides* não alterou a taxa final de produção de embriões *in vitro* em bovinos e bubalinos, porém, melhorou a qualidade dos embriões bubalinos quando administrado nas concentrações de 2,5 e 5µg/mL. Todavia, foi encontrada uma discreta elevação da taxa de blastocistos em bubalinos quando se acresceu 5µg/mL do OELO no meio. Este achado sugere que estudos futuros com maiores concentrações deste óleo podem ser realizados com intuito de encontrar a concentração ideal para aplicação nos meios de maturação e cultivo *in vitro* dos embriões.

5. Conclusão

A adição de 2,5µg/mL do óleo essencial de *Lippia origanoides* elevou a taxa de maturação nuclear em oócitos bovinos. Em bubalinos foi notado uma melhoria da taxa de maturação nuclear dos oócitos quando se utilizou a concentração de 2,5µg/mL do óleo essencial de *Lippia origanoides*. Adicionalmente, observou-se uma melhoria da qualidade dos embriões bubalinos, expressa pela elevação do número de células, quando foram utilizadas as concentrações de 2,5µg/mL e 5µg/mL deste óleo. Embora não tenha sido notada uma elevação da produção *in vitro* de embriões em bovinos e bubalinos, a adição do óleo essencial de *Lippia origanoides* nos meios de maturação *in vitro* não provocou redução das taxas encontradas, demonstrando uma promissora capacidade de ser incorporado nos sistemas de produção de embriões *in vitro* de bovinos e bubalinos, visto que possivelmente não provoca efeito prejudicial sobre os oócitos e embriões.

Agradecimento

Este trabalho foi financiado pelo Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil (096/10).

Referências

Ali AA, Bilodeau JF, Sirard MA. Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during in vitro maturation, fertilization and development. *Theriogenology* 2003; 59: 939–949.

Ambruosi B, Lacalandra GM, Iorga AI, De Santis T, Mugnier S, Matarrese R, Goudet G, Dell'Aquila ME. Cytoplasmatic lipid droplets and mitochondrial distribution in equine oocytes: Implications on oocyte maturation, fertilization and developmental competence after ICSI. *Theriogenology* 2009; 71:1093-1104.

Anand T Kumar D, Chauhan MS, Manik RS, Palta P. Cysteamine supplementation of in vitro maturation medium, in vitro culture medium or both media promotes in vitro development of buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. *Reprod Fertil Dev* 2008; 20: 253–257.

Antunes G, Chaveiro A, Santos P, Marques A, Jin HS, Moreira da Silva F. Influence of apoptosis in bovine embryo's development. *Reprod. Domest. Anim* 2010; 45:26–32.

Andrade ER, Melo-Sterza FA, Seneda MM., Alfieri, AA. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. *Rev. Bras. Reprod. Anim* 2010; 34:79-85.

Boni R., Santella L, Dale B, Roviello S, Di Palo R. Barbieri V. Maturazione *In Vitro* di oociti bufalini: indagine ultrastrutturale. *Acta Med Vet* 1992; 38:153-161.

De Matos DG, Gasparrini B, Pasqualini SR, Thompson JG. Effect of glutathione stimulation during in vitro maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content. *Theriogenology* 2002; 57:1443-1451.

Deshmane S L, Mukerjee R.; Fan, S. et al. Activation of the Oxidative Stress Pathway by HIV-1 Vpr Leads to Induction of Hypoxia-inducible Factor 1 Expression. *J. Biol.Chem* 2009; 284: 11364–11373.

Di Francesco S, Boccia L, Campanile G, Di Palo R, Vecchio D, Neglia G, Zicarelli L, Gasparrini B. The effect of season on oocyte quality and developmental competence in Italian Mediterranean buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Anim Reprod Sci* 2011; 123: 48-53.

Eichenlaub-Ritter U, Vogt E, Yin H, Gosden R. Spindles, mitochondria and redox potential in ageing oocytes. *Repro Biomed Online* 2004; 1:45-58.

Elamaran G, Singh KP, Singh MK, Chauhan MS, Manik RS, Palta P. Oxygen Concentration and Cysteamine Supplementation During In vitro Production of Buffalo

(*Bubalus bubalis*) Embryos Affect mRNA Expression of BCL-2, BCL-XL, MCL-1, BAX and BID. *Reprod. Dom. Anim* 2012; 47:1027-1036.

Elbert KM, Liem H, Hecht HB. Mitochondrial DNA in the mouse preimplantation embryo. *J Reprod Fertil* 1998; 82:145-149.

Eppig JJ. Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals. *Reprod Fertil Dev* 1996; 8: 485-489.

Ferreira EM, Vireque AA, Adona PR, Meirelles FV, Ferriani, RA, Navarro PAAS. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology* 2009; 71:836-848.

Gasparrini B, Sayoud H, Neglia G, de Matos DG, Donnay I, Zicarelli L. Glutathione synthesis during in vitro maturation of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes: effects of cysteamine on embryo development. *Theriogenology* 2003; 60:943–52.

Gasparrini B, Boccia L, Marchandise J, Di Palo R, George F, Donnay L, Zicarelli L. Enrichment of in vitro maturation medium for buffalo (*Bubalus bubalis*) oocyte with thiol compounds: effect of cysteine on glutathione synthesis and embryo development. *Theriogenology* 2006; 66:275–287.

Gasparrini B, De Rosa A, Attanasio L, Boccia L, Di Palo R, Campanile G, Zicarelli L. Influence of the duration of in vitro maturation and gamete co-incubation on the efficiency of in vitro embryo development in Italian Mediterranean buffalo (*Bubalus bubalis*). *Animal Reproduction Science* 2008; 105:354–364.

Giao NN, Hailstones D, Wilkes M, Sutton B. Water Deficit Induced Pollen Sterility Associated with a Programmed Cell Death and Oxidative Stress in Rice Anthers. *Proceedings the 2nd International Rice for the Future. Bio Asia* 2007; 202:209.

Gottardi FP, Mingoti GZ. Maturação de oócitos bovinos e influência na aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião. *Rev. Bras. Reprod. Anim* 2009; 33:82-84, 2009.

Guemra S, Monzani OS, Santos ES, Zanin R, Ohashi OM, Miranda MS, Adona PR. Maturação in vitro de oócitos bovinos em meios suplementados com quercetina e seu

efeito sobre o desenvolvimento embrionário. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec 2013; 65:1616-1624.

Jeseta M, Ctvrtlikova Knitlova D, Hanzalova K, Hulinska P, Milakovic I, Nemcova L, Kanka J, Machatkova M. Mitochondrial Patterns in Bovine Oocytes with Different Meiotic Competence Related to their in Vitro Maturation. Reproduction Domestic Animals 2014; 49:467-475.

Khalil WA, Marei WFA, Khalid M. Protective effects of antioxidants on linoleic acid-treated bovine oocytes during maturation and subsequent embryo development. Theriogenology 2013; 80: 2161–168.

Katska-Ksiazkiewicz L, Alm H, Torner H, Heleil B, Tuchscherer A, Rynska B. Mitochondrial aggregation patterns and activity in in vitro cultured bovine oocytes recovered from early antral ovarian follicles. Theriogenology 2011; 75:662–670.

Kidson A, Rubio-Pomar FJ, Van Knegsel A, Van Tol HTA, Hazeleger W, Ducro-Steverink, DWB, Colenbrander B, Dieleman SJ, Bevers MM. Quality of porcine blastocysts produced in vitro in the presence or absence of GH. Reproduction 2004; 127: 165-177.

Kobayashi M, Lee E, Fukui Y. Cysteamine or β mercapto ethanol added to a defined maturation medium improves blastocyst formation. Theriogenology 2006; 65:1191–1199.

Krisher RL, Bavister BD. Responses of oocytes and embryos to the culture environment. Theriogenology 1998; 49:103–114.

Machatkova M, Jeseta M, Hulinska P, Knitlova D, Nemcova L, Kanka J. Characteristics of bovine oocytes with different meiotic competence in terms of their mitochondrial status and expression of nuclear-encoded factors. Reprod Dom Anim 2012; 47:806–814.

Maya-Soriano MJ, Taberner, López-Béjar M. Retinol improves in vitro oocyte nuclear maturation under heat stress in heifers. Zygote 2013; 21:377-384.

Mondadori RG, Santin TR, Fidelis AAG, Name KPO, Silva JS, Rumpf R, Bão SN. Ultrastructure of in vitro oocyte maturation in buffalo (*Bubalus bubalis*). Zygote 2010; 18:309–314.

Rahme LSTR. Efeito do ácido linoléico conjugado na sobrevivência pós criopreservação de embrião bovinos produzidos *in vitro*. Dissertação apresentada no programa de Ciência Animal. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, Minas Gerais. 40p. 2012.

Sadeesh EM, Shah F, Balhara AK, Thirumaran SMK, Yadav S, Yadav PS. Effect of growth factor and antioxidant on *in vitro* maturation of oocytes and cleavage rates of *in vitro* produced Indian buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. Veterinarsky Arhiv 2014; 84: 459-474.

Santos SSD, Dantas JK, Miranda MS, Biondi FC, Ohashi OM. Cinética da maturação nuclear *in vitro* de oócitos bubalinos. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci 2002; 39:266-270.

Stojkovic M, Machado SA, Stojkovic P, Zakhartchenko V, Hutzler P, Gonçalves PB, Wolf E. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after *in vitro* maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after *in vitro* fertilization and culture. Biol Reprod 2001; 64:904-9009.

Tarazona AM, Rodriguez JI, Restrepo LF, Olivera-Angel, M. Mitochondrial activity, distribution and segregation in bovine oocytes and in embryos produced *in vitro*. Reprod Domest Anim 2006; 41: 5 –11.

Teixeira ML, Cardoso MG, Figueiredo ACS, Moraes JC, Assis FA, Andrade J, Nelson DL, Gomes MS, Souza JÁ, Albuquerque LRM. Essencial oils from *Lippia origanoides* Kunth. and *Mentha spicata* L: chemical composition, insecticidal and antioxidant activities. Am J Plant Sci 2014; 5:1181-1190.

Teles S, Pereira JA, Oliveira LM, Malheiro R, Lucchese AM, Silva F. *Lippia origanoides* H.B.K. essencial oil production, composition and antioxidante activity under organic and mineral fertilization: effect of harvest moment. Ind Crops Prod 2014; 60:217-225.

Tripathi A, Prem Kumar KV, Chaube SK. Meiotic Cell Cycle arrest in Mammalian Oocytes. J Cell Physiol 2010; 223:592-600.

Viana JHM, Camargo LSA, Ferreira AM, De Sa WF, Fernandes CAC, Junior APM. Short intervals between ultrasonographically guided follicle aspiration improve oocyte quality

but not prevent establishment of dominant follicle in the Gir breed (*Bos indicus*) of cattle. Anim Reprod Sci 2004; 84: 1-12.

Yindee M, Techakumphu M, Lohachit C, Sirivaidyapong S, Na-Chiangmai A, Roelen, BAJ, Colenbrander B. Maturation competence of swamp buffalo oocytes obtained by ovum pick-up and from slaughterhouse ovaries. Reprod Dom Anim 2011; 46: 824–831.

Yu CL, Kale Y, Gopishetty S. A Novel Caffeine Dehydrogenase in *Pseudomonas* sp. Strain CBB1 Oxidizes Caffeine to Trimethyluric Acid. J. Bacteriol 2008; 190: 772–776.

Tabela 1. Padrão de distribuição das mitocôndrias e configuração cromossômica encontrada nos oócitos bovinos maturados em meios de maturação com diferentes concentrações do óleo de *Lippia origanoides*.

Tratamento	Maturação Nuclear			Maturação Citoplasmática			
	QVG	MI	MII	Hom.	Het.	Peri.	FFL.
Imaturo ^{a1}	100%(20/20)	0%(0/20)	0% (0/20)	75,0% (15/20)	10,0%(2/20)	5,0%(1/20)	10,0%(2/20)
T1 ^{b12}	10,5%(2/19)	31,6%(6/19)	57,9% (11/19)	57,9% (11/19)	36,8%(7/19)	0% (0/19)	5,3%(1/19)
T2 ^{bc2}	0%(0/20)	20,0%(4/20)	80% (16/20)	45,0%(9/20)	55,0%(11/20)	0%(0/20)	0% (0/20)
T3 ^{cd2}	0%(0/26)	11,5%(3/26)	88,5% (23/26)	42,3%(11/26)	42,3%(11/26)	15,4%(4,26)	0% (0/26)
T4 ^{b2}	0%(0/22)	36,4%(8/22)	63,6% (14/22)	45,5%(10/22)	36,4%(8/22)	18,2%(4/22)	0% (0/22)
T5 ^{bd2}	5,3%(1/19)	31,6%(6/19)	63,2% (12,19)	47,4%(9/19)	47,4%(9/19)	5,3%(1/19)	0% (0/19)

Dados foram expressos em porcentagem (número oócitos classificados/total analisados).

T1 (Meio de Maturação Base-MB); T2 (MB + 50 µM de cisteamina); T3 (MB + 2,5µg/mL de Óleo Essencial de *Lippia origanoides* (OELO)); T4 (MB + 5µg/mL OELO); T5 (MB + 10µg/mL OELO).

QVG (Quebra de vesícula germinativa); MI (Metáfase I); MII (Metáfase II); Hom. (Distribuição homogênea das mitocôndrias); Het. (Distribuição heterogênea das mitocôndrias); Peri (Distribuição periférica das mitocôndrias); FFL (Frac emissão de fluorescência).

Letras minúsculas sobrescritas diferentes indicam diferenças entre as a maturação nuclear dos oócitos ($p < 0,05$). Números sobrescritos diferentes indicam diferenças entre as os parâmetros de maturação citoplasmática dos oócitos.

Qui-Quadrado ou Teste Exato de Fisher.

Tabela 2. Estágio de maturação nuclear e citoplasmática de oócitos bovinos após adição de diferentes concentrações do óleo essencial de *Lippia origanoides* no meio de maturação *in vitro*.

Tratamento	Maturação Nuclear		Maturação Citoplasmática	
	Maturado	Não Maturado	Maturado	Não Maturado
Imaturo	0%(0/20) ^a	100%(20/20)	10,0% (2/20) ^A	90,0% (18/20)
T1	57,9%(11/19) ^b	42,1%(8/19)	36,8% (7/19) ^{AB}	63,2% (12/19)
T2	80,0%(16/20) ^{bc}	20,0%(4/20)	55,0%(11/20) ^B	45,0%(9/20)
T3	88,5%(23/26) ^{cd}	11,5%(3/26)	53,8%(14/26) ^B	46,2%(12/26)
T4	63,6%(14/22) ^{bd}	36,4%(8/22)	54,5%(12/22) ^B	45,5%(10/22)
T5	63,2%(12/19) ^{bd}	36,8%(7/19)	52,6%(10/19) ^B	47,4%(9/19)

Dados foram expressos em porcentagem (número oócitos classificados/total analisados).

T1 (Meio de Maturação Base-MB); T2 (MB + 50 µM de cisteamina); T3 (MB + 2,5µg/mL de Óleo Essencial de *Lippia origanoides* (OELO)); T4 (MB + 5µg/mL OELO); T5 (MB + 10µg/mL OELO).

Letras minúsculas e maiúsculas sobrescritas diferentes indicam diferenças entre as taxas de maturação nuclear e citoplasmática dos oócitos, respectivamente ($p < 0,05$).

Tabela 3. Taxa de expansão do *cumulus*, taxa de clivagem e taxa de blastocistos bovinos após adição de diferentes concentrações do óleo essencial de *Lippia origanoides* no meio de maturação *in vitro*.

Tratamentos	Nº COCs maturados	*Taxa de expansão do <i>cumulus</i>	#Taxa de clivagem	#Taxa de Blastocistos
T1	656	93,03 ± 2,64	65,72 ± 3,44	27,04 ± 2,51
T2	662	92,73 ± 2,14	63,24 ± 3,30	26,95 ± 3,46
T3	661	93,10 ± 3,46	62,52 ± 3,20	27,17 ± 3,14
T4	663	92,71 ± 2,42	55,43 ± 3,43	24,46 ± 2,73
T5	662	95,03 ± 0,97	67,45 ± 3,99	25,66 ± 2,25

Dados foram expressos em porcentagem (número oócitos classificados/total analisados).

T1 (Meio de Maturação Base-MB); T2 (MB + 50 µM de cisteamina); T3 (MB + 2,5µg/mL de Óleo Essencial de *Lippia origanoides* - OELO); T4 (MB + 5µg/mL OELO); T5 (MB + 10µg/mL OELO).

Não houve diferença dos parâmetros as diferentes concentrações do OELO ($p>0,05$).

#Anova

*Teste de Kruskal-Wallis

Tabela 4. Efeito da adição de diferentes concentrações do óleo essencial de *Lippia origanoides* no meio de maturação sobre os parâmetros relacionados a produção *in vitro* de embriões bubalinos.

Tratamentos	Nº COCs maturados	#Taxa de expansão do <i>cumulus</i> (%) <i>n</i>	#Taxa de clivagem (%) <i>n</i>	#Taxa de Blastocisto (%) <i>n</i>
T1	157	76,38 ± 8,30	39,87 ± 5,54	27,45 ± 5,71
T2	153	77,20 ± 4,90	35,69 ± 6,28	27,92 ± 5,30
T3	221	78,86 ± 5,55	44,16 ± 5,68	26,51 ± 5,98
T4	184	78,16 ± 6,65	45,94 ± 6,35	35,05 ± 5,49
T5	248	73,26 ± 3,68	43,81 ± 7,58	29,62 ± 6,16

Dados foram expressos em porcentagem (número oócitos classificados/total analisados).

T1 (Meio de Maturação Base-MB); T2 (MB + 50 µM de cisteamina); T3 (MB + 2,5µg/mL de Óleo Essencial de *Lippia origanoides* - OELO); T4 (MB + 5µg/mL OELO); T5 (MB + 10µg/mL OELO).

Não houve diferença dos parâmetros as diferentes concentrações do OELO ($p>0,05$).

#Anova

Tabela 5. Efeito da adição de diferentes concentrações do óleo essencial de *Lippia origanoides* no meio de maturação sobre a qualidade dos blastocistos bubalinos analisada pelo número total de células e taxas de células apoptóticas.

Tratamentos	Nº total de embriões avaliados	Número de células (média ± desvio padrão)		Taxa de células positivas no TUNEL (%)
		Bovino	Búfalo	Búfalo
T1	31	101,22 ± 31,72	113,5 ± 40,92 ^{ab}	8,31 ± 6,51
T2	23	101,44 ± 27,44	90,88 ± 22,50 ^a	13,20 ± 3,63
T3	20	119,25 ± 17,05	126,57 ± 32,73 ^b	11,54 ± 1,21
T4	22	108,50 ± 33,23	130,94 ± 38,21 ^b	12,0 ± 5,44
T5	25	92,71 ± 10,88	96,75 ± 31,29 ^a	9,94 ± 0,07

Dados foram expressos em porcentagem (número óocitos classificados/total analisados).

Taxa de apoptose: Número de células marcadas por TUNEL/Número total de células do embrião T1 (Meio de Maturação Base-MB); T2 (MB + 50 µM de cisteamina); T3 (MB + 2,5µg/mL de Óleo Essencial de *Lippia origanoides* - OELO); T4 (MB + 5µg/mL OELO); T5 (MB + 10µg/mL OELO).

Letras minúsculas sobrescritas diferentes indicam diferenças entre número de células dos embriões de diferentes tratamentos ($p < 0,05$).

[#]Anova/Duncan

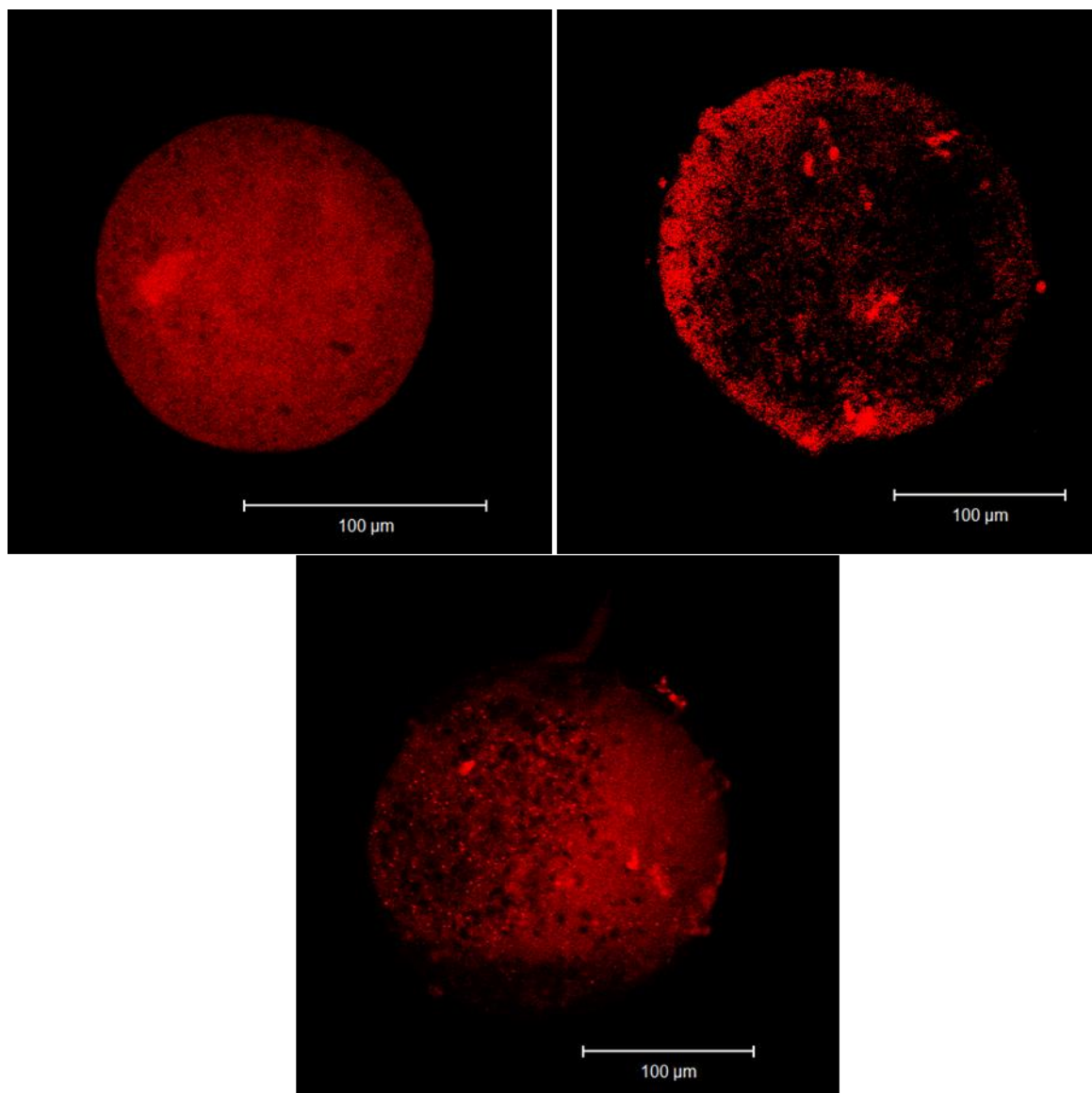


Figura 1. Imagens de microscopia confocal do plano equatorial dos oócitos bovinos mostrando o padrão de distribuição citoplasmática das mitocôndrias marcadas com o MitoTracker Orange CMTM Ros. (a) Padrão homogêneo em oócitos imaturos, (b) Distribuição periférica em oócitos maturados, (c) Padrão heterogêneo em oócitos maturados. (Aumento de 400x).

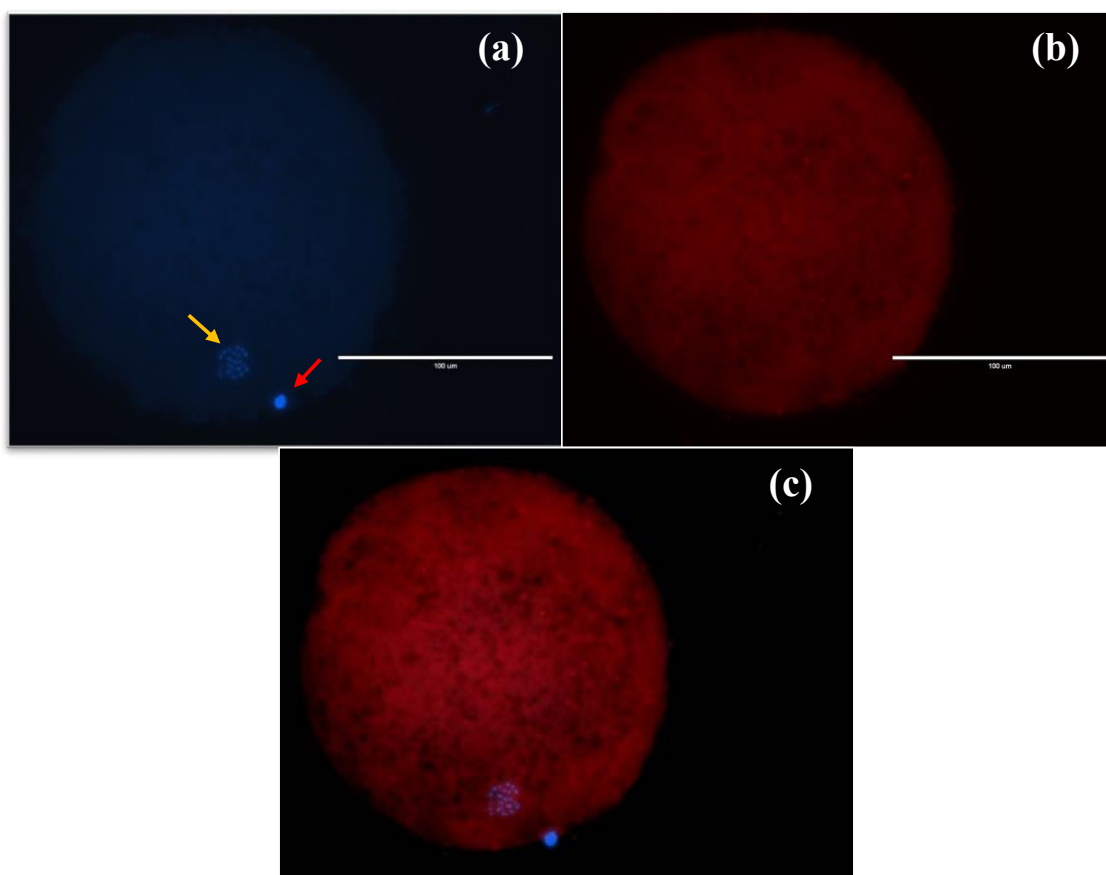


Figura 2. Imagens representativas da microscopia de fluorescência demonstrando oócitos na fase de Metáfase II. (a) Marcação da cromatina com DAPI, diferenciando os cromossomos condensados (seta amarela) e a extrusão do corpúsculo polar (seta vermelha), (b) Padrão de distribuição das mitocôndrias no interior do ooplasma, (c) Overlay das imagens. (Aumento de 400x)

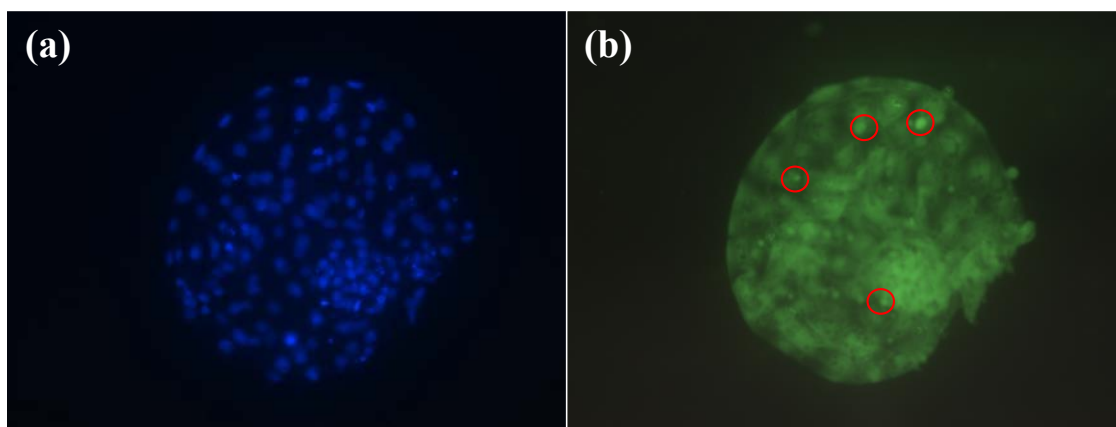


Figura 3. Visualização em microscópio de fluorescência de blastocistos bubalinos produzidos *in vitro* corados com DAPI e TUNEL. (a) Contagem dos núcleos celulares marcados com DAPI; (b) Marcação das células apoptóticas (círculos vermelhos) com o TUNEL. (Aumento de 400x).

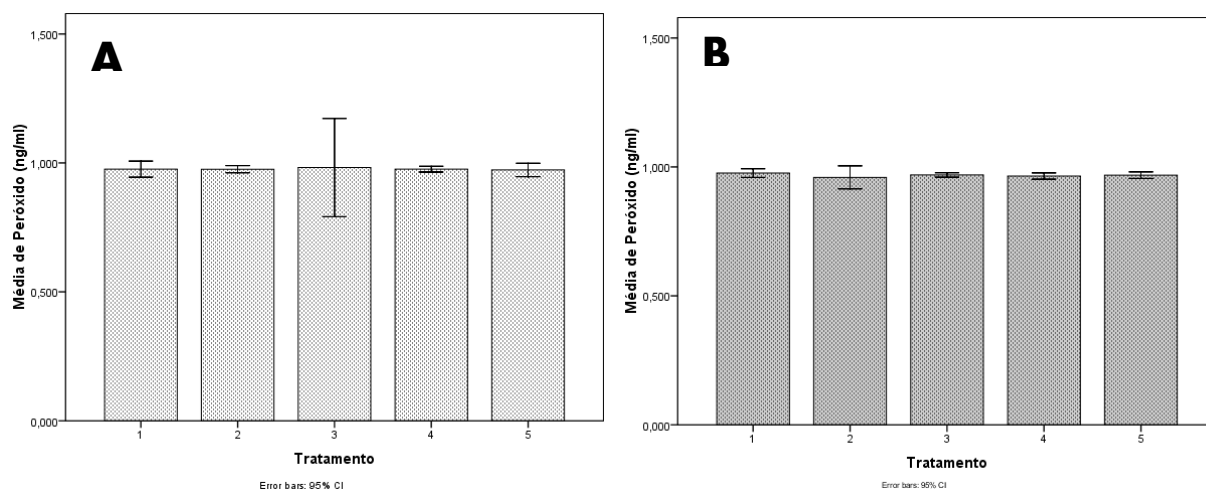


Figura 4. Concentração de peróxido de hidrogênio (ng/mL) mensurada no meio de maturação com diferentes concentrações de óleo essencial de *Lippia origanoides* em bovinos (A) e em bubalinos (B). T1 (Meio de Maturação Base-MB); T2 (MB + 50 μ M de cisteamina); T3 (MB + 2,5 μ g/mL de Óleo Essencial de *Lippia origanoides* - OELO); T4 (MB + 5 μ g/mL OELO); T5 (MB + 10 μ g/mL OELO).

Não houve diferença nas concentrações de H₂O₂ nos tratamentos avaliados ($p > 0,05$). (Anova)

CONCLUSÕES GERAIS

- Protocolos hormonais e não hormonais de sincronização de doadoras de oócitos bubalinas para aspiração folicular guiada por ultrassom não alteraram a população folicular, a taxa de recuperação, o número de oócitos recuperados por sessão de aspiração e a qualidade dos COCs.
- Protocolo de sincronização dos animais com aspiração prévia, visando reiniciar a onda de crescimento folicular, reduz a população folicular e número de oócitos recuperados por sessão de aspiração em bubalinos.
- Quando obtidos de animais abatidos de frigorífico, o número de folículos/ovário, o número de oócitos recuperados e número de oócitos grau A, B e expandidos mostraram-se maior do que quando obtidos a partir da aspiração folicular guiada por ultrassom.
- No estado de Minas Gerais, a redução do fotoperíodo ocorrida entre Março a Junho melhora a qualidade dos oócitos bubalinos recuperados a partir da aspiração folicular de animais *in vivo*.
- No estado de Minas Gerais a produção *in vitro* de embriões bubalinos é aumentada durante o período do ano quando ocorre redução da duração dos dias (Março-Junho), assemelhando aos índices obtidos em bovinos.
- Adição de 2,5µg/mL do óleo essencial de *Lippia origanoides* no meio de maturação *in vitro* melhora a eficiência da maturação nuclear tanto em oócitos bovinos.
- O enriquecimento do meio de maturação *in vitro* com 2,5µg/mL e 5µg/mL do óleo essencial de *Lippia origanoides* eleva o número total de células dos blastocistos bubalinos produzidos *in vitro*.

Apostila de Protocolos e Meios

“Projeto FIV em Bubalinos e Bovinos”

Aluno: Emílio César Martins Pereira

Orientadora: Profa. Eunice Oba

Co-orientador: Prof. Alan Borges

Técnica Laboratório: Eliane Beatriz Magalhães

Protocolo para diluição do óleo Lippia organóides

Solução Hiperconcentrada:

Componente	Quantidade para 200µL	Concentração do óleo 0,01mg/µL ou 10000µg/mL
Óleo Essencial	0,002g	
DMSO	200 µL	

Retirar 10 µL da solução hiperconcentrada e fazer a solução mãe.

Solução Mãe:

Componente	Quantidade para 2000µL	Concentração do óleo 0,00005mg/µL ou 50 µg/mL
Solução Hiperconcentrada (Óleo +DMSO)	10 µL	
TCM 199 Hepes	1990 µL	

Soluções de uso:

10 µg.mL⁻¹ (T5)

Componente	Quantidade para gota de 80µL	Concentração do óleo 10 µg/mL
Solução Mãe (Óleo + DMSO + TCM)	16 µL	
Meio MIV (Gota)	54 µL	
Meio adicionados junto com oócitos	10 µL	

5 µg.mL⁻¹ (T4)

Componente	Quantidade para gota de 80µL	Concentração do óleo 5 µg/mL
Solução Mãe (Óleo + DMSO + TCM)	8 µL	
Meio MIV (Gota)	62 µL	
Meio adicionados junto com oócitos	10 µL	

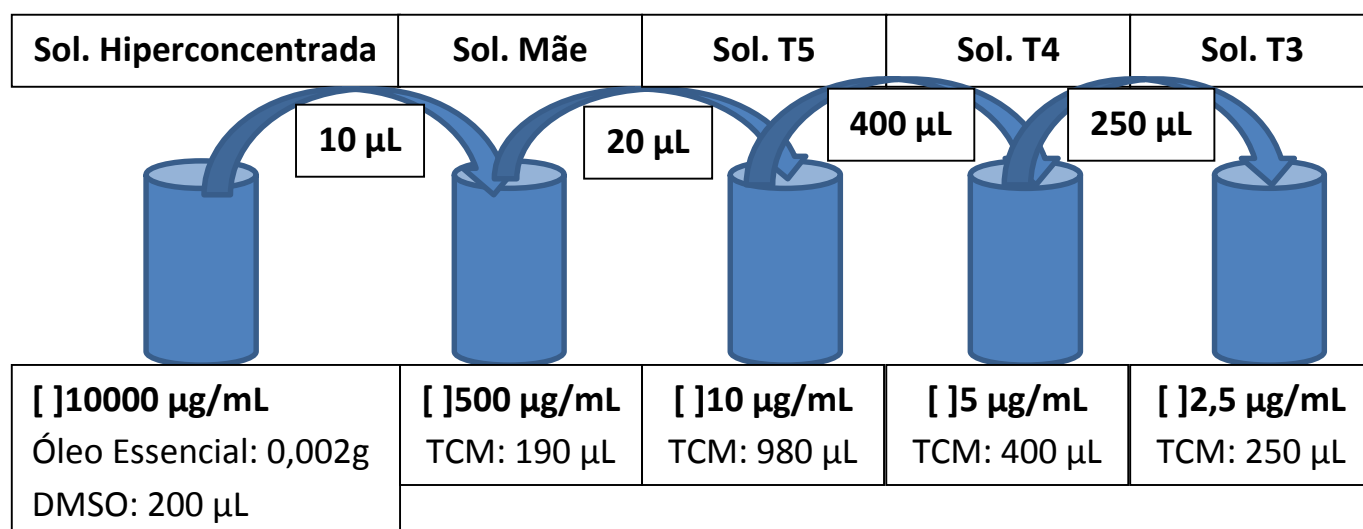
2,5 µg.mL⁻¹ (T3)

Componente	Quantidade para gota de 80µL	Concentração do óleo 2,5 µg/mL
Solução Mãe (Óleo + DMSO + TCM)	4 µL	

Meio MIV (Gota)	66 μ L	
Meio adicionados junto com oócitos	10 μ L	

Protocolo para diluição do óleo Lippia organóides

Outro Método para diluição do óleo:



Preparação (T2) – Cisteamina

Componente	Quantidade q.s.p. 3 mL meio	Concentração de cistemanina 50 μ M
Meio MIV	3 mL	
Cisteamina Estoque	30 μ L	

Componente	Quantidade q.s.p. 5 mL meio	Concentração de cistemanina 50 μ M
Meio MIV	5 mL	
Cisteamina Estoque	50 μ L	

PROTOCOLO PARA CONFEÇÃO DOS MEIOS

Soluções Estoque

Solução Salina 0,9%

Componente	Quantidade
NaCl	9,0g
Água Ultrapura autoclavada	1L

Homogenizar e Armazenar na geladeira

Penicilina G Potássica – P7794 10 UI – Sigma[®]

Concentração no frasco: $\pm$ 1560 UI/mg

Concentração de uso: 400000 UI/L (256mg/L)

Para uso em 1 L
Pesar direto 0,256g e colocar 1L na solução salina 0,9% para transporte

Sulfato de estreptomicina - S6501 – Sigma[®]

Concentração frasco: 720 UI/mg

Concentração de uso: 100mg/L

Para uso em 1 L
Pesar direto 0,1g e colocar em 1L na solução salina 0,9% para transporte

Piruvato de Sódio - P5280 - Sigma[®]

Concentração estoque: 100 mM (11mg/ml)

Concentração de uso: 0,2mM (22 μ g/mL)

Adicionar 0,110g de Piruvato em 10ml de solução salina estéril, fazer alíquotas de 40 μ L e estocar em freezer -20°C.

LH (Hormônio Luteinizante) – Chorulon (5000UI)[®]

Concentração estoque: 500 UI/mL

Concentração de uso: 5UI/mL (5 μ g/mL)

Diluir o frasco de 5000 U q.s.p. 10mL de TCM Bicarbonato (Gibco-11150059). Fazer alíquotas de 70 μ L e estocar no freezer -20°C.
--

FSH (Hormônio Folículo Estimulante) – Folltropin (Vetrepharm)[®]

Concentração estoque: 0,5 mg/mL

Concentração de uso: 0,5µg/mL

Diluir 0,001g de Folltropin em q.s.p. 2mL de TCM Bicarbonato (Gibco-11150059). Fazer alíquotas de 10µL e estocar no freezer -20°C.

Estradiol – E 2758 – Sigma[®]

Concentração estoque: 1 mg/mL etanol absoluto

Concentração de uso: 1µg/mL

Diluir 0,002g de Estradiol em 2mL de Etanol absoluto. Filtrar, fazer alíquotas de 10µL e estocar no freezer -20°C.

Cisteamina – M9768 - Sigma[®] (PM = 77,15g/mol)

Concentração estoque: 5000 µM

Concentração de uso: 50 µM

Diluir 0,001928g de Cisteamina em 5mL de TCM Bicarbonato. Filtrar, fazer alíquotas de 70µL e estocar no freezer -80°C.

Sulfato de Amicacina – Nova Farma[®] (500mg/2ml)

Concentração estoque: 16,66 µg/mL

Concentração de uso: 83µg/mg

Diluir 10µL de sulfato de amicacina em 140µL de água ultra autoclavada. Fazer alíquotas de 150µL e estocar na geladeira 4°C.

Glicose – G5146 - Sigma[®]

Concentração estoque: solução 1M

Concentração de uso: 5µL/mL ou 5 mM

Diluir 0,1806g de Glicose em 1mL de água ultra autoclavada. Fazer alíquotas de 10µL e estocar na geladeira 4°C.

PROTOCOLO PARA CONFEÇÃO DOS MEIOS

SIGLAS UTILIZADAS: E (Estante), G (Geladeira), F (Freezer)

α Solução Antibiótica

- Utilizada para adição na solução fisiológica 0,9% (Meio de Transporte) e no DMPBS (Meio de Lavagem na OPU).
- Adicionar 1mL de solução antibiótica em cada 1L de Meio de transporte ou DMPBS

➤ Solução Antibiótica:

Componentes	q.s.p. para 100 mL	Código do Produto	Local
Água ultrapura autoclavada	100 mL		
Penicilina G sódica potássica	0,005g	Sigma P 7794	G
Sulfato de estreptomicina	0,005g	Sigma S 6501	G
Sulfato de Gentamicina	0,010 g	Sigma G 1264	G

Fazer q.s.p. de água ultrapura autoclavada para 100mL

Descrição Procedimento: Fazer a diluição dos antibióticos em água ultrapura autoclavada e alicotar em eppendorf a quantidade de 1,5mL. Esta solução será utilizada na proporção 1mL para cada litro de Solução de Transporte ou Meio DMPBS utilizado na OPU.

α Meio de Coleta (Transporte) – (Bovino e Búfalo)

- Temperatura de transporte 32 -37 °C
- Tempo de duração de transporte: Máx. 4 horas
- Solução Transporte:

Componentes	q.s.p. 1 litro de água Miliq	Código do Produto	Local
Cloreto de Sódio	9,0 g	Sigma S 5886	E
Solução Antibiótica	1 mL	FEITO NO LAB.	F

Descrição Procedimento: Adicionar 1mL da solução antibiótica e 9g de NaCL na água Miliq e diluir bem. Antes da ida ao frigorífico, aquecer a solução acondicionada em um saquinho plástico dentro de garrafa térmica até a temperatura de aproximadamente 40°C. No momento da coleta a solução deverá estar entre 32-37°C e deverá ser transportada em um período máximo de 4 horas até o laboratório. Ao chegar no laboratório os ovários serão lavados e acondicionados em um béquer pré-aquecido contendo esta mesma solução para então ser submetidos à aspiração dos folículos.

PROTOCOLO PARA CONFEÇÃO DOS MEIOS

α Meio de Lavagem (Manipulação) - (Bovino e Búfalo)

➤ Fazer com um dia de antecedência e filtrar em filtro 0, 22µm

Componentes	10 ml de meio com 10% SFB	Código do Produto	Local
TCM 199 HEPES	9 mL	Gibco - 1234 0030	G
SFB	1 mL	Gibco - 12657029	F
Gentamicina	50 µL	Sigma – G1264	G
Piruvato	20 µL	Sigma – P5280	G

Fazer q.s.p. de TCM 10mL

Descrição Procedimento: Folículos de 2 a 8 mm de diâmetros deverão ser aspirados utilizando um seringa de 10 mL e agulha 30 x 8 em um período máximo de 1 hora. Durante este procedimento deverão ser anotados alguns dados fundamentais para os ovários bubalinos: Número de ovários recolhidos, números de folículos aspirados; para o posterior cálculo da taxa de recuperação oocitária. O líquido folicular recolhido deverá ser transferido para tubos Falcon 15mL que estarão sendo submetidos ao aquecimento por Banho-Maria a 36°C. Após a aspiração de todos ovários, este tubo ainda deverá permanecer por 3 minutos, tempo suficiente para promover a decantação dos oócitos. Em seguida o conteúdo deverá ser despejado em uma placa de Petri 60x15 para o rastreamento dos oócitos. A solução de lavagem (descrita acima) servirá tanto para lavar o tubo quanto para diluir o líquido folicular em placa facilitando a visualização dos oócitos. Os oócitos serão classificados em grau A, B, C, D, desnudo ou expandido de acordo com o padrão do citoplasma e o número de camada de células do cumulus, segundo padrão estabelecido por Gasparini et al. (2014) e Manjunatha et al. (2007).

PROTOCOLO PARA CONFEÇÃO DOS MEIOS

α Meio de Maturação base (MIV) - (Bovino e Búfalo)

- Fazer com um dia de antecedência e colocar em estufa para estabilizar

Componentes	q.s.p. 5 ml de meio com 10% SFB	Código do Produto	Local
TCM 199 Bicarbonato	4,5 mL	Gibco - 1234 0030	G
SFB	500 µL	Gibco - 12657029	F
Gentamicina	25 µL	Sigma – G1264	G
Piruvato	10 µL	Sigma – P5280	G
LH	50 µL	Chorulon 5000 UI	F
FSH	5 µL	Folltropin (FSH-P)	F
Filtrar em membrana celulose (0,22µm)			
Estradiol	5 µL	Sigma - E8875	G

Fazer q.s.p. de TCM 5mL

Descrição Procedimento: Somente oócitos grau 1, 2 e 3 serão submetidos ao cultivo celular. Nesta etapa os oócitos serão separados em 5 tratamentos, definidos de acordo com meio de maturação em:

- ♦ T1 (controle) – Meio de maturação (MM) base
- ♦ T2 (cisteamina) – MM + cisteamina 50µM
- ♦ T5 (óleo [] máxima) - MM + [] de 10µg/ml
- ♦ T4 (oleo [] média) - MM + óleo [] de 5µg/ml
- ♦ T3(oleo [] mínima) – MM + óleo [] de 2,5µg/ml

A constituição do MM segue acima. Grupos de aproximadamente 10 a 15 oócitos serão colocados em gotas de 70µL (35 µL antes do óleo + 35 µL depois do óleo) cobertas posteriormente em por óleo mineral em placas de Petri de 40 x 10 mm. Os oócitos serão cultivados a uma temperatura de 38,5°C, em atmosfera úmida com 5% de CO₂ em ar. Após o período de 22-24 horas os oócitos serão avaliados inicialmente quanto à expansão ou não do cumulus oócito e posteriormente fixados para avaliação da maturação nuclear ou fertilizados em procedimentos subsequentes.

PROTOCOLO PARA CONFEÇÃO DOS MEIOS

Fecundação *in vitro* (FIV)

α Percoll[®] - (Bovino e Búfalo)

- Fazer com um dia de antecedência e colocar em estufa para estabilizar juntamente com MEIO FIV e MEIO TALP SEMEN

Percoll 90 %

Componentes	Solução 3 ml de Percoll [®]	Código do Produto	Local
Percoll [®] (Cloreto de cetil piridínico) 100 % (Puro)	2,7 mL	Sigma - P 1644	G
Solução Talp Semen 10 x	0,3 mL	FEITO NO LAB.	G

Percoll 45 %

Componentes	Solução 2 ml de Percoll [®]	Código do Produto	Local
Percoll [®] (Cloreto de cetil piridínico) 90%	1 mL	Sigma - P 1644	G
TALP Sêmen	1 mL	FEITO NO LAB.	G

Colocar lentamente 350 µL da solução Percoll[®] 90% no fundo do eppendorf após colocar 350 µL da solução Percoll[®] 45%.

α Talp Semen 10 X - (Bovino e Búfalo)

Componentes	Solução q.s.p. 10 mL	Código do Produto	Local
NaCl	0,5820 g	Sigma – S 5886	E
KCl	0,0230 g	Sigma – P 5405	E
NaH ₂ PO ₄	0,0035 g	Sigma – S 5011	E
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,0080 g	Sigma – M 2393	E
NaHCO ₃	0,2100 g	Sigma – S 5761	E
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,0300 g	Sigma – C 7902	E
Lactato de Sódio	310,4 µL	Sigma – L 4263	G
Vermelho Fenol	0,0010 g	Sigma – P5530	E
Hepes	0,2380 g	Sigma – H3375	E

Água ultrapura autoclavada	Completar volume para 10 ml	
----------------------------	-----------------------------	--

α Talp Semen - (Bovino e Búfalo)

Componentes	Solução q.s.p. 100 mL	Código do Produto	Local
NaCl	0,5820 g	Sigma – S 5886	E
KCl	0,0230 g	Sigma – P 5405	E
NaH ₂ PO ₄	0,0035 g	Sigma – S 5011	E
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,0080 g	Sigma – M 2393	E
NaHCO ₃	0,2100 g	Sigma – S 5761	E
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,0300 g	Sigma – C 7902	E
Lactato de Sódio	310,4 µL	Sigma – L 4263	G
Vermelho Fenol	0,0010 g	Sigma – P5530	E
Hepes	0,2380 g	Sigma – H3375	E
Água ultrapura autoclavada	Completar volume para 100 ml		

Cuidados: Dissolver aproximadamente 90 mL de solução; homogeneizar e acertar o pH para 7,4 - 7,6; completar o volume para 100 mL, filtrar e armazenar à 4°C por 2 meses.

α Meio FIV pronto para uso - (Bovino e Búfalo)

- 5 mL de FIV estoque
- 55 µl de Heparina
- 220 µl de PHE
- 25 µl de gentamicina
- 10 µl de Piruvato
- 0,03g de BSA livre de ácido graxo (Sigma – A 3803)

Estoques

α Heparina Estoque

Componentes	Solução q.s.p. 10 mL	Código do Produto	Local
-------------	----------------------	-------------------	-------

Heparina	0,0100 g	Sigma – H 4149	E
Meio FIV estoque	Completar para 10 mL	FEITO NO LAB.	G

- Homogenizar e estocar a -80°C em alíquotas de 70 µl

α Solução PHE

Componentes	Quantidade	Código do Produto	Local
Penicilamina Estoque	10 mL	FEITO NO LAB.	
Hipotaurina Estoque	10 mL	FEITO NO LAB.	
Epinefrina Estoque	8 mL	FEITO NO LAB.	
Solução salina filtrada 0,9%	16 mL	FEITO NO LAB.	G

- Homogeneizar e estocar a -80°C em alíquotas de 250 µL.

α Penicilamina Estoque

Componentes	Solução q.s.p. 10 mL	Código do Produto	Local
Penicilamina	0,0030 g	Sigma – P 4875	G
Solução salina filtrada 0,9%	Completar para 10 mL	FEITO NO LAB.	G

α Hipotaurina Estoque

Componentes	Solução q.s.p. 10 mL	Código do Produto	Local
Hipotaurina	0,0011 g	Sigma – H 1384	E
Solução salina filtrada 0,9%	Completar para 10 mL	FEITO NO LAB.	G

α Epinefrina Estoque

Sol I:

Componentes	Solução q.s.p. 10 mL	Código do Produto	Local
-------------	----------------------	-------------------	-------

Lactato de Sódio	0,1650 g	Sigma – L 7022	G
Na ₂ S ₂ O ₅ (bissulfito de sódio)	0,0500 g	Sigma – S 9000	E
Água ultrapura autoclavada	Completar para 10 mL		

- Homogenizar a solução e ajustar o pH para 4

Sol II:

Componentes	Solução q.s.p. 20 mL	Código do Produto	Local
Epinefrina	0,0009 g	Sigma – E 4250	G
Solução I	Completar para 20 mL		

α Meio FIV Estoque - (Bovino e Búfalo)

Componentes	Solução q.s.p. 100 mL	Código do Produto	Local
NaCl	0,6660 g	Sigma – S 5886	E
KCl	0,0238 g	Sigma – P 5405	E
NaH ₂ PO ₄	0,0048 g	Sigma – S 5011	E
MgCl ₂ . 6H ₂ O	0,0101 g	Sigma – M 2393	E
NaHCO ₃	0,2100 g	Sigma – S 5761	E
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0,0294 g	Sigma – C 7902	E
Vermelho Fenol (C ₁₉ H ₁₄ O ₅₅)	0,0010 g	Sigma – P 5530	E
Lactato de Sódio	85,6 µL	Sigma – L 4263	G
Água Miliq Autoclavada	Completar para 100mL		

- Dissolver em aproximadamente 90 mL de água ultrapura;
- Homogeneizar e acertar o pH para 7,4-7,6;
- Completar o volume para 100 mL, filtrar e armazenar a 4°C por 1 mês
- Checar osmolaridade (290 a 300 mOsm). Não utilizar se ficar muito fora da amplitude.

PROTOCOLO PARA CONFEÇÃO DOS MEIOS

Cultivo *in vitro* (CIV)

α Meio CIV pronto pra uso - (*Bovinos/Bufalas*)

- 4,85mL SOF uso
- 125μL SFB (2,5%)
- 0,025g BSA Fração V testado para cultivo celular (Sigma – A 9418)
- 5μL gentamicina
- 10μL Piruvato Estoque

Estoques do Meio SOF - (*Bovinos/Bufalas*)

α Solução A (Estoque de Sais)

Componentes	Solução q.s.p. 10 mL	Código do Produto	Local
NaCl	0,629 g	Sigma - S 5886	E
KCl	0,0534 g	Sigma - P 5405	E
KH ₂ PO ₄	0,0162 g	Sigma – P 5655	E
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,0089 g	Sigma - M 1880	E
Lactato de Sódio	60 μL	Sigma - L 4263	G
Água Miliq Autoclavada	9,84 mL		

α Solução B (Estoque de Bicarbonato)

Componentes	Solução q.s.p. 10 mL	Código do Produto	Local
NaHCO ₃	0,210 g	Sigma – S 5761	E
Vermelho Fenol (C ₁₉ H ₁₄ O ₅₅)	0,001 g	Sigma - P 5530	E
Água Miliq Autoclavada	Completar para 10mL		

α Solução C (Estoque de Piruvato)

Componentes	Solução q.s.p. 500 μL	Código do Produto	Local
Piruvato de Sódio	0,0055g	Sigma – P 5280	G
Água Miliq Autoclavada	Completar para 500 μL		

α Solução D (Estoque de Cálcio)

Componentes	Solução q.s.p. 1 mL	Código do Produto	Local
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0,0262g	Sigma - C 7902	E
Água Miliq Autoclavada	1 mL		

α Solução F (Estoque de Aminoácidos)

Componentes	Solução q.s.p. 3 mL	Código do Produto	Local
L-Glutamina	0,0135g	Sigma – G8540	E
Glicina	0,1125g	Sigma – G8790	E
Alanina	0,0225g	Sigma – A9920	E
Água Miliq Autoclavada	3 mL		

* Os estoques devem ser armazenados em geladeira a 4°C. Os estoques A, B, D e F devem ser preparados semanalmente; já o estoque C, diariamente.

α Meio SOF para uso - (Bovinos/Bufalas)

Componentes	Solução q.s.p. 5 mL	Solução q.s.p. 10 mL	Código do Produto	Local
Estoque A	500 mL	1000 mL	FEITO NO LAB.	G
Estoque B	500 µL	1000 µL	FEITO NO LAB.	G
Estoque C	500 µL	1000 µL	FEITO NO LAB.	G
Estoque D	50 µL	100 µL	FEITO NO LAB.	G
Estoque F	100 µL	200 µL	FEITO NO LAB.	G
BME Essenciais	100 µL	200 µL	Sigma – B 6766	G
MEM Não essenciais	50 µL	100 µL	Sigma – M7145	G
Myo-Inositol	0,0025g	0,005g	Sigma – I 7508	E
Tri-Citrato de sódio dihidratado	0,0005g	0,001g	Sigma – 71402	E
Água Miliq Autoclavada	3,75 mL	7,5 mL		

Armazenar em geladeira a 4°C utilizar no período máximo de uma semana. Uso semanal.

Apostila com Fichas de Rotinas **e Resultados Obtidos**

“Projeto FIV em Bubalinos e Bovinos”

Aluno: Emílio César Martins Pereira

Orientadora: Profa. Eunice Oba

Co-orientador: Prof. Alan Borges

Técnica Laboratório: Eliane Beatriz Magalhães

COLETA DE OÓCITOS

DATA: __/__/__

Tipo de Coleta: () *in vivo* () *in vitro*

Horário do início da coleta, final da coleta e chegada ao laboratório: ____/____/____

Horário início da maturação: __: __

Nº de Ovários aspirados: ____

Nº Folículos Aspirados: ____

Classificação

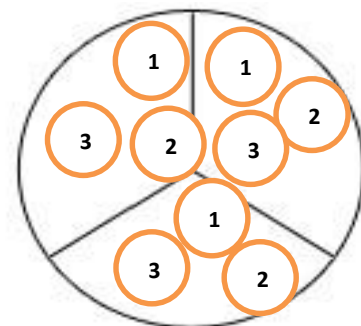
Grau A	Grau B	Grau C	Grau D	Expandido	Desnudo

Nº total de oócitos recuperados: ____

MATURAÇÃO *IN VITRO* (MIV) –

Nº total de oócitos maturados: ____

Classificação de acordo com tratamento



Tratamento	Classificação	Gota 1 ○↑	Gota 2 ○→	Gota 3 ○←	Total	Oócitos cumulus exp. (após 22hs)
_____	Grau A					
	Grau B					
	Grau C					
	Total oócitos/gota					
_____	Grau A					
	Grau B					
	Grau C					
	Total oócitos/gota					
_____	Grau A					
	Grau B					
	Grau C					
	Total oócitos/gota					
_____	Grau A					
	Grau B					
	Grau C					
	Total oócitos/gota					
T1: controle	T2: Cisteamina	T3: Óleo [2,5]		T4: Óleo [5]		T5: Óleo [10]

FECUNDAÇÃO *IN VITRO* (FIV)

DATA: __/__/__

HORÁRIO: __: __

INTERVALO MIV/FIV: _____

TOURO:

PARTIDA:

MEIO DE CAPACITAÇÃO:

DOSE INSEMINANTE:

CULTIVO *IN VITRO* (CIV)

DATA: __/__/__

HORÁRIO: __: __

INTERVALO FIV/CIV: _____

Dias Cultivo	Tratamento	Clivagem (2 cels.)	4 cél.	8 cél.	MO	BI	BL	BX	BE	TOTAL
D2	T__	Gota1								
		Gota2								
		Gota3								
	T__	Gota1								
		Gota2								
		Gota3								
	T__	Gota1								
		Gota2								
		Gota3								
	T__	Gota1								
		Gota2								
		Gota3								
D7	T__	Gota1								
		Gota2								
		Gota3								
	T__	Gota1								
		Gota2								
		Gota3								
	T__	Gota1								
		Gota2								
		Gota3								
	T__	Gota1								
		Gota2								
		Gota3								
D8	T__	Gota1								
		Gota2								

		Gota3									
	T__	Gota1									
		Gota2									
		Gota3									
	T__	Gota1									
		Gota2									
		Gota3									
	T__	Gota1									
		Gota2									
		Gota3									
	T1: controle		T2: Cisteamina		T3: Óleo [2,5]		T4: Óleo [5]		T5: Óleo [10]		

OBSERVAÇÕES:

Classificação dos oócitos da OPU de acordo com a morfologia visual

Segundo Gupta et al. 2002 (in Manjunatha et al. 2007) e Gasparini et al. 2014 (in Di Francesco et al. 2011)

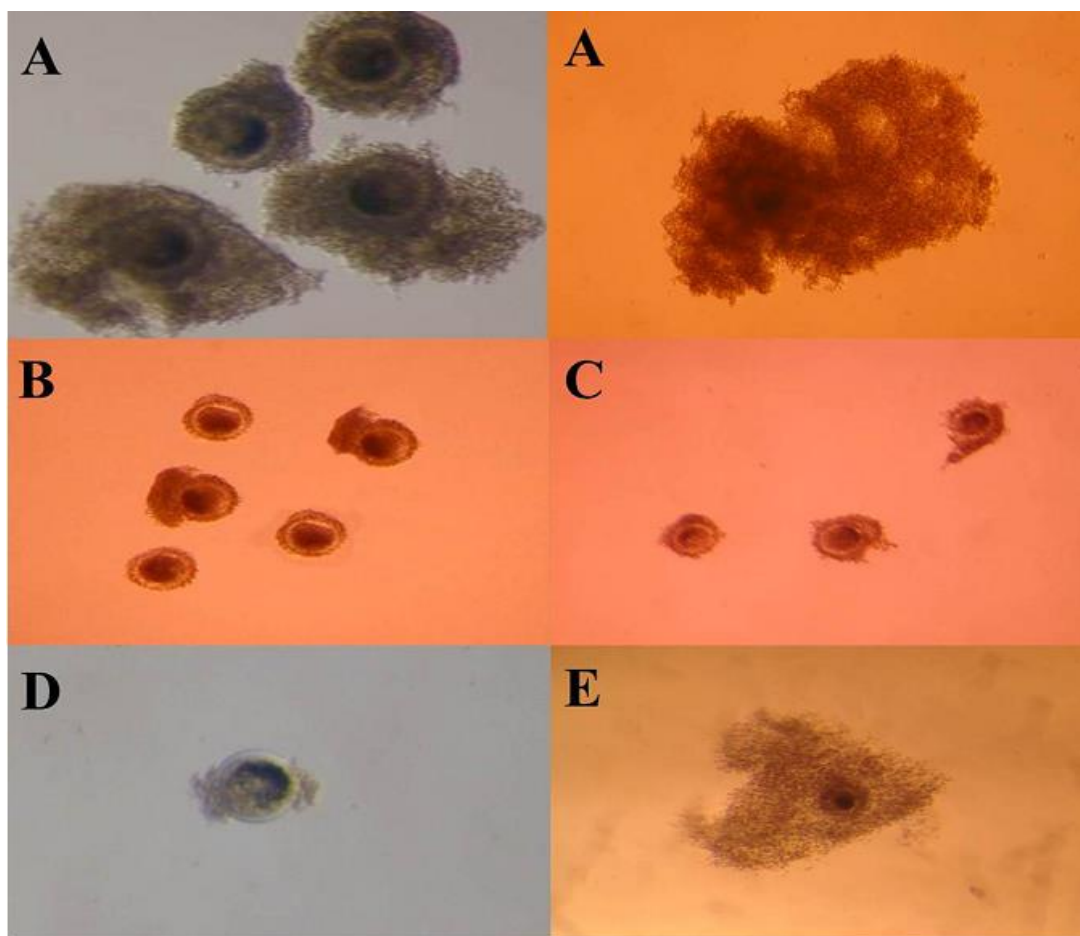


Figura: Diferentes graus de COCs: Grau A (A); Grau B (B); Grau C (C); Grau D (D); EX(E)

Grau A (GA): Oócitos com citoplasma homogêneo e uniforme, de coloração cinza granular. Superfície inteira rodeado por camadas múltiplas de células do cumulus (4-5 camadas);

Grau B (GB): Oócitos sem muita compactação, com maior parte da ZP superfície rodeada por duas a três camadas de células do cumulus e que apresente ooplasma granular;

Grau C (GC): Oócitos com uma ou duas camadas de células do cumulus ou parcialmente desnudo, com ooplasma escuro e irregular;

Grau D (GD): Oócitos com sinais óbvios de degeneração citoplasmática, sem células do cumulus ou células altamente expandidas ou dispersas, com ooplasma escuro e irregular;

Desnudo (DN): Oócitos completamente livres de células do cumulus porem com citoplasma normal e aparentemente integro;

Expandido (EX): Oócitos rodeados por células do cumulus expandidas e clusters intracitoplasmáticos, com ooplasma granular e normal.

MEIOS UTILIZADOS NA OPU

❖ MEIO DE LAVAGEM E RECUPERAÇÃO DE OÓCITOS

Componentes	p/1 litro	Código do Produto	Local
DMBS	1000 mL	Nutricell	G
Heparina Sódica	5000 UI	Hemofol®	G
SFB	10 mL	Gibco - 12657029	F

Obs: Este meio será utilizado para lavagem do circuito, recuperação dos oócitos e lavagem do filtro de coleta.

❖ MEIO DE RASTREAMENTO E TRANSPORTE

Componentes	10 ml de meio com 10% SFB	Código do Produto	Local
TCM 199 HEPES	9 mL	Gibco - 1234 0030	G
SFB	1 mL	Gibco - 12657029	F
Gentamicina	50 µL	Sigma – G1264	G
Piruvato	20 µL	Sigma – P5280	G

Obs: Oócitos serão rastreados e transportados em criotubos contendo o meio descrito acima. Este transporte será realizado em garrafa térmica à $\pm 36^{\circ}\text{C}$ no período máximo de 2h após início da OPU.

FICHA DE ASPIRAÇÃO FOLICULAR

DATA: ____/____/____

IDENTIFICAÇÃO DO ANIMAL

NOME: _____ NÚMERO: _____

PROTOCOLO UTILIZADO: _____

CONDIÇÃO OVARIANA

NÚMERO DE FOLÍCULOS VISUALIZADOS: _____

NÚMERO DE FOLÍCULOS ASPIRADOS: _____

CLASSIFICAÇÃO DE OÓCITOS RECUPERADOS

Grau A	Grau B	Grau C	Grau D	Expandido	Desnudo

NÚMEROS DE OÓCITOS RECUPERADOS: _____

OBS: _____

FICHA CLASSIFICAÇÃO OÓCITOS OPU

OPU Nº: _____

DATA: _____

HORA DE INÍCIO: _____

Animal / Nº	Grau A	Grau B	Grau C	Grau D / Deg.	Expandido	Desnudo