



## Produção *in vitro* de embriões bubalinos

*In vitro production of buffalo embryos*

**E. Oba<sup>1</sup>, A.S. Camargos**

Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu, SP, Brasil.

<sup>1</sup>Autor para correspondência: [euniceoba@fmvz.unesp.br](mailto:euniceoba@fmvz.unesp.br)

### Resumo

Atualmente, a produção *in vitro* de embriões (PIV) bubalinos apresenta altas taxas de maturação (80%), moderadas taxas de clivagem (50%) e taxas moderadas de formação de blastocistos (20%). A PIV possui grande potencial para incremento da bubalinocultura, assim como ocorre na espécie bovina. Embora bovinos e bubalinos sejam espécies bem diferentes, as técnicas desenvolvidas são as mesmas, podendo-se aproveitar o trabalho já realizado em bovinos para benefício dos bubalinos. No entanto, algumas restrições biológicas e fisiológicas dos bubalinos devem ser observadas no que tange à aplicação das biotecnologias relacionadas à produção de embriões. A produção de embriões *in vitro* é limitada pelo número e qualidade de oócitos, pelas baixas taxas de gestação e pela alta perda de gestação pós-transferência dos embriões, tornando a técnica mais cara que em bovinos. Entretanto, quando se implementam biotecnologias, pode-se agregar valor à produção por acelerar a identificação e seleção de genótipos superiores.

**Palavras-chave:** búfalo, embrião, OPU, PIV.

### Abstract

*Recently, buffalo in vitro embryo production presents high maturation rate (80%), moderate cleavage rate (50%), and moderate blastocyst formation rate (20%). IVP has a great potential to advance bubalinoculture as much as they have done for cattle. Although cattle and buffaloes are different, the technologies being developed are the same and the studies done with cattle can benefit buffaloes. However there are some constrains that have to be observed for biotechnology application on embryo production. In vitro embryo production is limited by number and quality of oocytes, low pregnancy and high pregnancy losses post-embryo transfer, making the technique more expensive than in cattle. However, when biotechnologies are integrated, the production can gain by speed the identification and selection of superior genotypes.*

**Keywords:** buffalo, embryo, IVP, OPU.

### Introdução

As biotecnologias são aplicadas à reprodução bubalina, mas a taxa de fertilidade observada é baixa. A baixa fertilidade ocorre devido à baixa resposta à estimulação hormonal, recuperação de embriões, número de folículos primordiais no ovário e taxa de gestação, quando comparado aos bovinos. Devido à baixa eficiência dos programas de superovulação e transferência de embriões (MOET) nesta espécie, houve um aumento do interesse na produção *in vitro* de embriões (PIV) em larga escala, pela rápida propagação do germoplasma superior (Gasparrini, 2002). Bons progressos foram obtidos na maturação e fertilização *in vitro* de oócitos. No entanto, a cultura *in vitro* ainda necessita de mais estudos, principalmente no que tange ao meio adequado para o embrião bubalino.

A primeira descrição da técnica de fertilização *in vitro* (FIV) em bubalino foi realizada por Majundar et al. (1988) e Singh et al. (1989), que utilizaram oócitos maturados *in vitro*, fecundados com sêmen congelado e cultivados *in vitro* até o estágio de mórula. Pouco tempo depois, Suzuki et al. (1991) relataram a primeira gestação em búfalas com embrião produzido *in vitro*, e Madan et al. (1992) o primeiro nascimento (Ohashi et al., 2006).

A primeira tentativa de utilização de PIV, que associa as técnicas de maturação oocitária (MIV), fecundação *in vitro* (FIV) cultivo embrionário *in vitro* (CIV) e aspiração folicular (OPU), foi realizada por Boni et al. (1994) com resultados promissores (Ohashi et al., 2006).

Desde o primeiro nascimento de bubalino por FIV, foram publicados inúmeros artigos sobre sistemas de produção *in vitro* de embriões, demonstrando os efeitos de diferentes protocolos e meios sobre o desenvolvimento de oócitos e embriões. Mais de 100 trabalhos foram publicados entre 1991 e 2008, apresentando altas taxas de maturação (80%), moderadas taxas de clivagem (50%) e taxas moderadas de formação de blastocistos (20%) na espécie bubalina (Suresh et al., 2009). Os relatos de eficácia de tratamentos são, em alguns casos, contraditórios. Alguns estudos afirmam a existência de efeito, enquanto outros não

Deste modo, este trabalho visa apresentar alguns dos resultados mais promissores relatados até o momento sobre as diversas etapas da produção *in vitro* de embriões bubalinos.

### Aspiração folicular (OPU)

A técnica de aspiração folicular guiada por ultrassom é uma técnica não invasiva, que permite a recuperação de grande número de oócitos em estágio de meiose oriundos de folículos antrais de animais vivos. O primeiro relato de nascimento de bezerro derivado de embrião congelado, produzido por aspiração folicular, maturação *in vitro*, fertilização e cultura embrionária, ocorreu na Itália em 1998 (Galli et al., 1998). Foi demonstrado que a produção de embriões por OPU é superior à MOET porque pode produzir mais embriões transferíveis por doadora mensalmente (2 TE *versus* 0,6 MOET, respectivamente; Gasparrini, 2002). Em bubalinos, podem ser realizadas OPU's repetidas sem efeitos locais (Gupta et al., 2006).

A fonte de oócitos afeta significativamente o desenvolvimento embrionário pós-fertilização. Alguns autores observaram alta taxa de produção de blastocistos utilizando oócitos obtidos por OPU em comparação àqueles obtidos em abatedouro (Neglia et al., 2003; Manjunatha et al., 2008). Uma taxa maior de incubação de blastocistos foi relatada com embriões pós-vitrificação oriundos de oócitos obtidos por OPU em relação a embriões com oócitos de abatedouro (Manjunatha et al., 2008). No entanto, Liang et al. (2008) não confirmam esta diferença.

Em bezerros bubalinos pré-púberes, a utilização de protocolos de estimulação com gonadotrofinas combinados à OPU produziu maior número de folículos de tamanho médio a grande, quando comparados ao grupo-controle. O número de oócitos de boa qualidade recuperados por aspiração folicular foi maior, assim como a taxa de metáfase II alcançada após a maturação *in vivo* e *in vitro* (Presicce et al., 2002). Foi demonstrado que cinco ciclos repetidos de FSH (hormônio folículo estimulante) e OPU não influenciam a resposta folicular à superestimulação nem o número de oócitos recuperados de búfalas pré-púberes (Techakumphu et al., 2004). A OPU pode ser realizada com sucesso em búfalas em diferentes estágios reprodutivos. Ainda, a administração de FSH pode aumentar o número de oócitos aspirados em búfalas pós-parto cíclicos e lactantes (Promdireg et al., 2005).

Pesquisadores italianos afirmam produzir um embrião por sessão de OPU, em coletas realizadas uma ou duas vezes por semana, durante todo o ano, apesar da sazonalidade (Galli et al., 2010). Este achado é similar à espécie equina, em que embriões podem ser produzidos por OPU e ICSI (injeção intracitoplasmática de espermatozoides) fora da estação reprodutiva (Colleoni et al., 2007).

### Seleção de oócitos para maturação *in vitro*

Além da utilização da OPU, os oócitos podem ser obtidos de abatedouros. Neste caso, há uma variação extrema na qualidade e no número de oócitos recuperados, dependendo do tipo de animal, localização geográfica, condição corporal, etc. Segundo Galli et al. (2010), utilizando-se ovários de abatedouro, pode-se recuperar uma média de 4,68 oócitos por ovário, com produção de 0,44 embriões com qualidade de congelamento por ovário processado, sem detecção de efeito sazonal.

Para a produção de embriões, os oócitos são selecionados com base na compactação do *cumulus* e homogeneidade do ooplasma (Chauhan et al., 1998). A seleção dos oócitos somente por critérios morfológicos pode gerar informações errôneas sobre a taxa de maturação. É essencial saber a viabilidade dos oócitos antes de utilizá-los em FIV (Carvalho et al., 2007, 2010; Oba et al., 2010). O *Trypan blue* pode ser utilizado para diferenciar os oócitos vivos dos mortos sem causar efeitos deletérios sobre a maturação, a fertilização e o desenvolvimento embrionário (Nandi et al., 2002). A competência dos oócitos bubalinos é influenciada por fatores biológicos e ambientais, como tamanho do folículo, diâmetro do oócito, presença ou ausência de corpo lúteo no ovário e temperatura ambiente (Leal et al., 2007, 2010; Siqueira et al., 2009).

A competência meiótica dos oócitos bubalinos foi estudada quanto ao tamanho do oócito e folículo (Yousaf e Chohan, 2003). A maioria dos oócitos derivados de folículos menores que 4 mm estavam nos estágios iniciais de desenvolvimento da vesícula germinativa (VG) e tiveram menores taxas de MIV (em torno de 32%). Por outro lado, os oócitos de folículos de 4 a 8 mm estavam nos estágios finais de VG, sendo mais capacitados para maturação (67-79% MII).

### Maturação *in vitro* (MIV)

Podem ser utilizados os mesmos meios e condições de oócitos bovinos (Galli et al., 2003). Tanto a recuperação de oócitos quanto a produção de embriões são consideradas baixas, quando comparadas à média de resultados em bovinos (Galli e Lazzari, 1996).

Gasparini et al. (2008) demonstraram que a maioria dos oócitos bubalinos concluem a maturação nuclear entre 21 e 24 h após o início da maturação *in vitro*. As taxas de blastocisto e clivagem diminuem linearmente com o aumento da duração da maturação *in vitro* (de 18 a 30 h). A incubação espermatozoide-

oócito por 16 horas é requerida para a máxima produção de blastocistos. A espessura da camada de células do *cumulus* mostrou-se um fator significativo para a competência da maturação *in vitro* de oócitos bubalinos. A cocultura de oócitos desnudos com células do *cumulus* aumenta sua competência meiótica (Warriach e Chohan 2004). Ao se avaliar a influência do período e o tipo de estocagem e a temperatura de MIV, (Ravindranatha et al., 2003) observou que a temperatura ótima para MIV foi 38,5° C.

O soro fetal bovino e as gonadotrofinas são essenciais para a maturação do oócito bubalino (Chauan et al., 1997; Abdoon et al., 2001). A suplementação da MIV com fluido folicular possui alto nível de maturação quando comparada a meio contendo soro fetal bovino e gonadotrofinas (Chauan et al., 1997; Nandi et al., 2004). No entanto, um efeito positivo no desenvolvimento embrionário subsequente não foi confirmado. Na presença de soro e gonadotrofinas, o nível de maturação oocitária variou de 70 a 80% e resultou em taxa de blastocisto de 10 a 30% (Chauan et al., 1997; Palta e Chauhan, 1998). A cisteamina mostrou agir positivamente na maturação de oócitos (Gasparrini et al., 2000; Anand et al., 2008) por estimular a síntese de glutathiona (Gasparrini et al., 2003) e proteger o DNA de danos durante a cultura MIV (Mukherjee et al., 2010). A cistina, em combinação com a cisteamina, resulta em um significativo aumento das taxas de clivagem e de produção de embriões transferíveis quando comparada ao meio suplementado somente com cisteamina (Gasparrini et al., 2006). Desde que os fatores de crescimento começaram a ser estudados, foi mostrado que o IGF-1 (fator de crescimento do tipo insulina 1) estimula a maturação oocitária de maneira dose-dependente (Pawshe et al., 1998), aumentando o número de células em blastocisto (Narula et al., 1996), enquanto o EGF (fator de crescimento epidídimo) possui efeito benéfico sobre a produção de blastocistos (Nandi et al., 2003).

Segundo Suresh et al. (2009), os melhores resultados de MIV foram obtidos ao se utilizarem oócitos com boas camadas de células do *cumulus* oriundos de folículos grandes em estações frias quando cultivados em meio TCM-199 suplementado com soro, FSH e cisteamina, resultando em máximas taxas de fertilização, clivagem e produção de mórulas/blastocistos.

O teste do cresil azul brilhante (BCB), para avaliação de atividade da glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), mostrou-se eficaz para a seleção de oócitos competentes em desenvolvimento, levando a um aumento da produção de blastocistos (Manjunatha et al., 2007).

### Fertilização *in vitro* (FIV)

A qualidade inconsistente do sêmen bubalino foi uma importante fonte de variabilidade de resultados no passado (Galli et al., 2010). No entanto, nos últimos anos, a preparação de sêmen congelado vem aumentando, levando as taxas de fertilização a alcançar níveis similares àqueles obtidos em bovinos. O perfil do touro bubalino deve ser avaliado, a fim de otimizar a concentração espermática requerida durante a FIV, maximizar as taxas de fertilização e minimizar a taxa de fertilização poliespermática. Este perfil pode ser obtido utilizando-se oócitos bovinos, facilmente avaliados em grande quantidade, evitando o desperdício de oócitos bubalinos viáveis. Como descrito para bovinos, há um efeito do touro no desenvolvimento embrionário (Comizzoli et al., 2003). O sêmen bubalino sexado não apresentou diferença no desenvolvimento de blastocistos e nascimentos após a FIV (Lu et al., 2007; Liang et al., 2008).

### Cultura *in vitro*

Na Itália, a produção *in vitro* que resultou no primeiro nascimento de búfalo incluiu a utilização de oviduto de ovelhas na etapa de cultura embrionária após a FIV, de 2-4 células a blastocisto (Galli et al., 1998). Vários métodos e meios de cultura *in vitro* foram relatados depois. Após uma tendência inicial de utilização de sistemas de co-cultura, com o uso de células de oviduto em meio TCM 199 suplementado com soro, o desenvolvimento até blastocisto atingiu uma taxa alta comparada a sistemas de células livres (Nandi et al., 2003). No entanto, assim como em bovinos, em condições semi-definidas, representadas por meio mSOF suplementado com BSA e aminoácidos, a sobrevivência e qualidade dos blastocistos congelados é significativamente maior que em sistemas de co-cultura (Gasparrini, 2002; Purohit et al., 2005). Os embriões bubalinos cultivados *in vitro* se desenvolvem 12 a 24 horas antes que embriões bovinos, como ocorre *in vivo*, e geralmente são congelados no dia 6 (fertilização no dia 0).

Alguns autores defendem a utilização do cultivo de embriões bubalinos em meio mSOFaa suplementado com BSA em 5% de CO<sub>2</sub> a 38,5° C (Galli et al., 2001). O melhor estágio para criopreservação é o de blastocisto a blastocisto expandido, que é caracterizado por alta atividade metabólica (código 6 ou 7, de acordo com o manual da IETS). Nesses estágios, é possível avaliar a presença, a qualidade e o tamanho da massa celular interna (MCI) do embrião em desenvolvimento, aumentando a acurácia da seleção e classificação dos embriões mais aptos ao congelamento (Galli et al., 2010).

### Sexagem de embriões

Os *primers*-satélite e os *primers*-específicos do cromossomo Y bovinos foram usados com sucesso em

ensaios de reação em cadeia pela polimerase (PCR) em embriões bubalinos (Rao et al., 1993; Manna et al., 2003). Os PCRs primário (BRY.1), aninhado (BuRYN.1) e multicomplexo (BuRYN.1, ZFX/ ZFY), foram desenvolvidos para o ensaio de determinação do sexo com sucesso, conferindo alta sensibilidade e confiabilidade ao processo (Appa Rao e Totey, 1999). Dois pares de *primers* aninhados, alvos para a amplificação da região SRY conservada de búfalo de pântano, foram designados para a identificação do sexo (Fu et al., 2007). Hirayama e Kageyama (2006) estabeleceram um método de sexagem rápida de embriões de búfalos de água, utilizando a amplificação isotérmica mediada por *loop* de 4 a 5 blastômeros ou 2 fibroblastos.

### Criopreservação de embriões

Tanto o congelamento convencional quanto a vitrificação foram utilizados para a criopreservação de embriões bubalinos, resultando em gestação e nascimento (Galli et al., 1998, 2001; Gasparrini, 2002; Hufana-Duran et al., 2004; Neglia et al., 2004;). Nandi et al. (2003) demonstraram o efeito do meio de cultura utilizado sobre a sobrevivência e qualidade de blastocistos congelados, onde o meio mSOF foi superior ao sistema de cocultura (TM199 suplementado com 10% de soro e monocamada de células do oviduto). Liang et al. (2008), ao estudarem o uso de sêmen sexado na produção de embriões, relataram uma taxa de gestação variando de 11 a 15% com a congelação de embriões convencional, resultado próximo à metade do obtido com os mesmos embriões transferidos a fresco. Em outro estudo, utilizando-se cultura com oviduto de ovelha, foi obtida uma taxa de gestação de 33% (Galli et al., 1998). Mais recentemente, a taxa de sobrevivência após a descongelação e cultura de vários lotes de embriões congelados em protocolo de congelamento lento em 1,5M de etileno glicol foi alta (81 e 88% em 24 e 48 horas, respectivamente).

A vitrificação de embriões foi proposta como a melhor opção para os embriões que não apresentam boa *performance* no protocolo de refrigeração lenta, especialmente para os embriões com alto conteúdo lipídico, como os bubalinos. No entanto, tanto a sobrevivência *in vitro* pós-descongelação quanto a taxa de gestação após a transferência não diferem do congelamento convencional. Os dados publicados incluem a sobrevivência de aproximadamente 89% (Laowtammathron et al., 2005), 40-52% de taxa de incubação pós-descongelação (Manjunatha et al., 2008; 2009a), 16% de taxa de gestação e 11% de taxa de nascimento (Hufana-Duran et al., 2004). O tratamento com citocalasina B e estabilização do citoesqueleto de embriões bubalinos antes e durante a vitrificação aumentou sua competência de desenvolvimento *in vitro* pós-descongelação (Manjunatha et al., 2009b).

### Transferência de embriões e gestação

A taxa de gestação varia conforme a literatura. Há relato de taxa de nascimento de 15-34% após a transferência de dois embriões de rio ou embriões de rio e pântano em receptoras sincronizadas (Liang e Zhang, 2007), enquanto uma taxa de 15% foi obtida com embriões congelados e descongelados (Liang et al., 2008).

Hoje, o protocolo mais usado para sincronização de receptoras é o Ov-synch, que dispensa a detecção de cio. No entanto, resultados melhores com o Ov-synch foram obtidos quando havia atividade ovariana. A combinação deste protocolo com CIDR pode contornar esta limitação (De Rensis et al., 2005). Na Índia, a eficácia da OPU combinada com PIV foi maior durante o auge da estação reprodutiva (Manjunatha et al., 2009c).

### Transferência de núcleo de células somáticas (SCNT)

A SCNT possibilita a multiplicação rápida de indivíduos de genética superior, a fim de acelerar a disseminação de genótipos selecionados, preservar recursos genéticos pela formação de um banco de células somáticas e preservar espécies ameaçadas (Loi et al., 2007). Há um grande empenho na pesquisa desta técnica em bubalinos. Os primeiros experimentos datam de 1999 (Parnpai et al., 1999). Diferentes fontes de células somáticas já foram utilizadas, dentre elas os blastocistos de fibroblastos fetais (Kitiyant et al., 2001; Saikhun et al., 2004; Meena e Das, 2006; Simon et al., 2006), fibroblastos adultos (Lu et al., 2005; Shah et al., 2008), fibroblastos fetal, neonatal e adulto, e células do *cumulus* (Shah et al., 2009). Foi relatada uma taxa de desenvolvimento de blastocisto de 21-39% para embriões TN derivados de fibroblastos fetais bubalinos (Kitiyant et al., 2001; Saikhun et al., 2004). Os fibroblastos fetais e neonatais derivados de blastocistos TN são aptos a implantar e estabelecer gestações (Shah et al., 2009). O sistema de micromanipulação é requerido tanto na clonagem convencional quanto na feita à mão (Shah et al., 2008).

O nascimento do primeiro búfalo clonado foi relatado na China em 2007 (Shi et al., 2007), dos três partos relatados, somente um bezerro sobreviveu ao período perinatal e se desenvolveu até a maioridade. Nenhum caso de síndrome do bezerro gigante (LOS) foi observado nas gestações após SCNT. Já as perdas de gestação e mortalidade perinatal foram tão altas quanto em outras espécies de ruminantes.

Um meio possível de superar o número limitado de oócitos viáveis para SCNT é a utilização de oócitos bovinos enucleados, que são disponíveis em maior quantidade. O núcleo de células somáticas oriundas de

fibroblastos fetais bubalinos foi reprogramado com sucesso após a transferência para oócitos bovinos enucleados, resultando na produção de blastocistos clonados de búfalos (Saikhun et al., 2002). No entanto, o número de células de blastocistos TN interespécies é menor (Kitiyant et al., 2001). Em outro estudo, embriões reconstruídos com TN interespécie de fibroblastos adultos bubalinos em oócitos de búfalas e vacas demonstraram que os citoplastos bovinos podem direcionar o desenvolvimento embrionário mais efetivamente que os citoplastos bubalinos (Lu et al., 2005). Em outro estudo, Galli et al. (2010) observaram que o desenvolvimento de núcleos de células somáticas bubalinas em citoplastos bovinos foi pior, indicando que há somente uma reprogramação parcial do núcleo.

### Considerações finais

As biotecnologias da reprodução em bubalinos estão sendo desenvolvidas simultaneamente àquelas em bovinos. No entanto, a eficiência de várias delas ainda é baixa e de mais difícil implementação, devido às diferenças biológicas, produtivas e do ambiente técnico. Muitas dificuldades provêm de origem genética, devido à baixa pressão por características como fertilidade, sazonalidade, tolerância a manipulação dos gametas e criopreservação.

A utilização relativamente baixa da inseminação artificial está mantendo o nível de endogamia baixo, entretanto, limita a velocidade do progresso genético que poderia ser obtido com touros de progênie testada. Ainda não está claro se as baixas taxas de gestação relatadas na literatura após a transferência de embriões a fresco ou congelados são devido à qualidade dos embriões ou às receptoras, que falham em estabelecer ou manter a gestação. A sobrevivência de embriões *in vitro*, mesmo após o descongelamento, normalmente é bem alta, assim como as perdas de gestação após a transferência de embriões. O advento do genoma, para integrar ou substituir os testes de progênie em programas reprodutivos, vai requerer um uso mais intenso das biotecnologias de embriões a fim de gerar mais embriões (genótipos), possibilitando a oportunidade de escolher e também explorar os poucos genótipos de alto mérito selecionados.

### Referências bibliográficas

- Abdoon AS, Kandil OM, Otoi T, Suzuki T.** Influence of oocyte quality, culture media and gonadotropins on cleavage rate and development of in vitro fertilized buffalo embryos. *Anim Reprod Sci*, v.65, p.215-23, 2001.
- 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 embryos. *Reprod Fertil Dev*, v.20, p.253-257, 2008.
- Appa Rao KB, Totey SM.** Cloning and sequencing of buffalo male-specific repetitive DNA: sexing of in vitro developed buffalo embryos using multiplex and nested polymerase chain reaction. *Theriogenology*, v.51, p.785-797, 1999.
- Boni R, Di Palo R, Barbieri V, Zicarelli L.** Ovum pick-up in deep anestrus buffaloes. In: World Buffalo Congress, 4, 1994, São Paulo. *Proceedings...* São Paulo: WBC, 1994. v.3, p.480-482.
- Carvalho FA, Oba E, Camargos AS, Ferreira JCP, Magalhães LC.** Structural and ultrastructural in situ analysis of preantral follicles in female buffaloes. *Rev Vet*, v.21, p.965-8, 2010.
- Carvalho FA, Oba E, Leal LS.** Morphological and quantitative evaluation of preantral follicles in buffalo in different reproductive phases. *Ital J Anim Sci*, v.6, p.691-693, 2007.
- Chauhan MS, Palta P, Das SK, Katiyar PK, Madan ML.** Replacement of serum and hormone additives with follicular fluid in the IVM medium: effects on maturation, fertilization and subsequent development of buffalo oocytes in vitro. *Theriogenology*, v.48, p.461-469, 1997.
- Chauhan MS, Singla SK, Palta P, Manik RS, Madan ML.** In vitro maturation and fertilization, and subsequent development of buffalo embryos: effects of oocyte quality and type of serum. *Reprod Fertil Dev*, v.10, p.173-177, 1998.
- Colleoni S, Barbacini S, Necchi D, Duchi R, Lazzari G, Galli C.** application of ovum pick-up, intracytoplasmic sperm injection and embryo culture in equine practice. *Proc Am Assoc Equine Pract*, v.53, p.554-559, 2007.
- Comizzoli P, Urner F, Sakkas D, Renard JP.** Up-regulation of glucose metabolism during male pronucleus formation determines the early onset of the s phase in bovine zygotes. *Biol Reprod*, v.68, p.1934-1940, 2003.
- De Rensis F, Ronci G, Guarneri P, Nguyen BX, Presicce GA, Huszenicza G, Scaramuzzi RJ.** Conception rate after fixed time insemination following ovsynch protocol with and without progesterone supplementation in cyclic and non-cyclic Mediterranean Italian buffaloes. *Theriogenology*, v.63, p.1824-1831, 2005.
- Fu Q, Zhang M, Qin WS, Lu YQ, Zheng HY, Meng B, Lu SS, Lu KH.** Cloning the swamp buffalo SRY gene for embryo sexing with multiplex-nested PCR. *Theriogenology*, v.68, p.1211-1218, 2007.
- Galli C, Crotti G, Notari C, Turini P, Duchi R, Lazzari G.** Embryo production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology*, v.55, p.1341-1357, 2001.
- Galli C, Duchi R, Crotti G, Lazzari G.** Embryo production by ovum pick up in water buffalo. *Theriogenology*,



v.49, p.400, 1998. Abstract.

**Galli C, Duchi R, Crotti G, Turini P, Ponderato N, Colleoni S, Lagutina I, Lazzari G.** Bovine embryo technologies. *Theriogenology*, v.59, p.599-616, 2003.

**Galli C, Lagutina I, Duchi R, Lazzari G.** Reproductive biotechnologies in buffaloes. In: International Buffalo Conference, 2010, New Delhi. *Proceedings...* New Delhi: ICAR, 2010. p.7-14.

**Galli C, Lazzari G.** Practical aspects of IVM/IVF in cattle. *Anim Reprod Sci*, v.42, p.371-379, 1996.

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

**Gasparrini B, Boccia L, Marchandise J, Di Palo R, George F, Donnay I, Zicarelli L.** Enrichment of in vitro maturation medium for buffalo oocytes with thiol compounds: effects of cystine on glutathione synthesis and embryo development. *Theriogenology*, v.65, p.275-287, 2006.

**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 coincubation on the efficiency of in vitro embryo development in Italian Mediterranean buffalo. *Anim Reprod Sci*, v.105, p.354-364, 2008.

**Gasparrini B, Neglia G, Palo RD, Campanile G, Zicarelli L.** Effect of cysteamine during in vitro maturation on buffalo embryo development. *Theriogenology*, v.54, p.1537-1542, 2000.

**Gasparrini B, Sayond H, Neglia G, Matos DG, Donnay I, Zicarelli L.** Glutathione synthesis during in vitro maturation of buffalo oocytes of cysteamine on embryo development. *Theriogenology*, v.60, p.943-952, 2003.

**Gupta V, Manik RS, Chauhan MS, Singla SK, Akshay YS, Palta P.** Repeated ultrasound guided transvaginal oocyte retrieval from cyclic Murrah buffaloes. *Anim Reprod Sci*, v.91, p.89-96, 2006.

**Hirayama H, Kageyama S.** Rapid sexing of water buffalo embryos using loop-mediated isothermal amplification. *Theriogenology*, v.66, p.1249-1256, 2006.

**Hufana-Duran D, Pedro PB, Venturina HV, Hufana RD, Salazar AL, Duran PG, Cruz LC.** Post warming hatching and birth of live calves following transfer of in vitro derived vitrified water buffalo embryos. *Theriogenology*, v.61, p.1429-1439, 2004.

**Kitiyanant Y, Saikhun J, Chaisalce B, White KL, Pavasuthipaisit K.** Somatic cell cloning in Buffalo: effects of interspecies cytoplasmic recipients and activation procedures. *Cloning Stem Cells*, v.3, p.97-104, 2001.

**Laowtammathron C, Lorthongpanich C, Ketudat-Cairns M, Hochi S, Parnpai R.** Factors affecting cryosurvival of nuclear-transferred bovine bovine and swamp buffalo blastocysts: effects of hatching stage, linoleic acid-albumin in IVC medium and Ficoll supplementation to vitrification solution. *Theriogenology*, v.64, p.1185-1196, 2005.

**Leal LS, Moya CF, Fernandes CB, Martins LR, Landim-Alvarenga FC, Oba E.** Evaluation of recovery, quality and in vitro nuclear maturation of oocytes obtained from buffalo and bovine ovaries. *Rev Vet*, v.21, p.886-887, 2010.

**Leal LS, Oba E, Fernandes CB, Moya CF, Martins LR, Alvarenga FC.** Ovarian morphometric characterization and in vitro maturation of oocytes obtained from buffalo ovaries: partial results. *Ital J Anim Sci*, v.6, p.804-806, 2007.

**Liang X, Zhang X.** Pregnancy and calving rates following transfer of in-vitro-produced river and F1 buffalo embryos in recipients on natural oestrus or synchronized for ovulation. *Reprod Fertil Dev*, v.19, p.670-676, 2007.

**Liang XW, Lu YQ, Chen MT, Zhang XF, Lu SS, Zhang M, Pang CY, Huang FX, Lu KH.** In vitro embryo production in buffalo using sexed sperm and oocytes from ovum pick up. *Theriogenology*, v.69, p.822-826, 2008.

**Loi P, Galli C, Ptak G.** cloning of endangered mammalian species: any progress? *Trends Biotechnol*, v.25, p.195-200, 2007.

**Lu F, Shi D, Wei J, Yang S, Wei Y.** Development of embryos reconstructed by interspecies nuclear transfer of adult fibroblasts between buffalo and cattle. *Theriogenology*, v.64, p.1309-1319, 2005.

**Lu YQ, Liang XW, Zhang M, Wang WL, Kitiyanant Y, Lu SS, Meng B, Lu KH.** Birth of twins after in vitro fertilization with flow-cytometric sorted buffalo sperm. *Anim Reprod Sci*, v.100, p.192-196, 2007.

**Madan ML, Singla SK, Jain GC.** Ovulatory response to different superovulatory treatment amongst buffaloes (*Bubalus bubalis*). In: International Congress on Animal Reproduction and AI, 11, 1992, Dublin. *Proceedings...* Dublin: ICAR, 1992. v.1, p.172. Abstract.

**Majund AR, Katiy PK, Singh, Taneja VK, Bhat PN.** In: World Buffalo Congress, 2, 1988, New Delhi. *Proceedings...* New Delhi: WBC, 1988. v.1, p.54. Abstract.

**Manjunatha BM, Gupta PS, Devaraj M, Ravindra JP, Nandi S.** Selection of developmentally competent buffalo oocytes by brilliant cresyl blue staining before IVM. *Theriogenology*, v.68, p.1299-1304, 2007.

**Manjunatha BM, Gupta PS, Ravindra JP, Devaraj M, Nandi S.** Effect of vitrification medium composition and exposure time on post-thaw development of buffalo embryos produced in vitro. *Vet J*, v.179, p.287-291, 2009a.

**Manjunatha BM, Gupta PS, Ravindra JP, 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. *Anim Reprod Sci*, v.104, p.419-426, 2008.
- Manjunatha BM, Ravindra JP, Gupta PS, Devaraj M, Honnappa TG, Krishnaswamy A.** Post-thaw development of *in vitro* produced buffalo embryos cryopreserved by cytoskeletal stabilization and vitrification. *J Vet Sci*, v.10, p.153-156, 2009b.
- Manjunatha BM, Ravindra JP, Gupta PS, Devaraj M, Nandi S.** Effect of breeding season on *in vivo* oocyte recovery and embryo production in non-descriptive Indian river buffaloes. *Anim Reprod Sci*, v.111, p.376-383, 2009c.
- Manna L, Neglia G, Marino M, Gasparrini B, Di Palo R, Zicarelli L.** Sex determination of buffalo embryos by polymerase chain reaction. *Zygote*, v.11, p.17-22, 2003.
- Meena CR, Das SK.** Development of water buffalo embryos from *in vitro* matured oocytes reconstructed with fetal skin fibroblast cells as donor nuclei. *Anim Reprod Sci*, v.93, p.258-267, 2006.
- Mukherjee A, Kumar D, Singh K, Chauhan M, Singla S, Palta P, Manik R.** Assessment of DNA damage during *in vitro* development of buffalo embryos: effect of cysteamine. *Reprod Domest Anim*, v.45, p.1118-1121, 2010.
- Nandi S, Raghu HM, Ravindranatha BM, Chauhan MS.** Production of buffalo embryos *in vitro*: premises and promises. *Reprod Domest Anim*, v.37, p.65-74, 2002.
- Nandi S, Raghu HM, Ravindranatha BM, Gupta PS, Sarma PV.** *In vitro* development of buffalo oocytes in media-containing fluids from different size class follicles. *Reprod Domest Anim*, v.39, p.33-38, 2004.
- Nandi S, Ravindranatha BM, Gupta PS, Raghu HM, Sarma PV.** Developmental competence and post-thaw survivability of buffalo embryos produced *in vitro*: effect of growth factors in oocyte maturation medium and of embryo culture system. *Theriogenology*, v.60, p.1621-1631, 2003.
- Narula A, Taneja M, Totey SM.** Morphological development, cell number, and allocation of cells to trophoderm and inner cell mass of *in vitro* fertilized and parthenogenetically developed buffalo embryos: the effect of IGF-1. *Mol Reprod Dev*, v.44, p.343-351, 1996.
- Neglia G, Gasparrini B, Caracciolo di Brenza V, Di Palo R, Campanile G, Presicce GA, Zicarelli L.** Bovine and buffalo *in vitro* embryo production using oocytes derived from abattoir ovaries or collected by transvaginal follicle aspiration. *Theriogenology*, v.59, p.1123-1130, 2003.
- Neglia G, Gasparrini B, Caracciolo di Brenza V, Di Palo R, Campanile G, Zicarelli L.** First pregnancies to term after transfer of buffalo vitrified embryos entirely produced *in vitro*. *Vet Res Commun*, v.28, p.233-236, 2004.
- Oba E, Carvalho FA, Camargos AS, Ramos AA, Magalhães LC.** Morphological and quantitative evaluation of buffalo preantral follicles in different reproductive phases. *Rev Vet*, v. 1, p.919-922, 2010.
- Ohashi OM, Cordeiro MS, Miranda MS.** Biotecnologia da reprodução aplicada a bubalinos. *Rev Cienc Agrar*, v.45, p.58-63, 2006.
- Palta P, Chauhan MS.** Laboratory production of buffalo embryos. *Reprod Fertil Dev*, v.10, p.379-391, 1998.
- Parnpai R, Tasripoo K, Kamonpatana M.** Development of cloned swamp buffalo embryos derived from fetal fibroblast: comparison of *in vitro* cultured with or without buffalo and cattle oviductal epithelial cells. *Buffalo J*, v.15, p.371-384, 1999.
- Pawshe CH, Rao KB, Totey SM.** Effect of insulin-like growth factor 1 and its interaction with gonadotropins on *in vitro* maturation and embryonic development, cell proliferation, and biosynthetic activity of cumulus-oocyte complexes and granulosa cells in buffalo. *Mol Reprod Dev*, v.49, p.277-285, 1998.
- Presicce GA, Senatore EM, De Santis G, Stecco R, Terzano GM, Borghese A, De Mauro GJ.** Hormonal stimulation and oocyte maturational competence in prepuberal Mediterranean Italian buffaloes. *Theriogenology*, v.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. *Reprod Domest Anim*, v.40, p.145-149, 2005.
- Purohit GN, Brady MS, Sharma SS.** 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*, v.87, p.229-239, 2005.
- Rao KB, Pawshe CH, Totey SM.** Sex determination of *in vitro* developed buffalo embryos by DNA amplification. *Mol Reprod Dev*, v.36, p.291-296, 1993.
- Ravindranatha BM, Nandi S, Raghu HM, Reddy SM.** *In vitro* maturation and fertilization of buffalo oocytes: effects of storage of ovaries, IVM temperatures, storage of processed sperm and fertilization media. *Reprod Domest Anim*, v.38, p.21-26, 2003.
- Saikhun J, Kitiyanant N, Songtaveesin C, Pavasuthipaisit K, Kitiyanant Y.** Development of swamp buffalo embryos after parthenogenetic activation and nuclear transfer using serum fed or starved fetal fibroblasts. *Reprod Nutr Dev*, v.44, p.65-78, 2004.
- Saikhun J, Pavasuthipaisit K, Jaruansuwan M, Kitiyanant Y.** Xenonuclear transplantation of buffalo fetal and adult somatic cell nuclei into bovine oocyte cytoplasm and their subsequent development. *Theriogenology*, v.57, p.1829-1837, 2002.
- Shah RA, George A, Singh MK, Kumar D, Anand T, Chauhan MS, Manik RS, Palta P, Singla SK.**



- Pregnancies established from handmade cloned blastocysts reconstructed using skin fibroblasts in buffalo. *Theriogenology*, v.71, p.1215-1219, 2009.
- Shah RA, George A, Singh MK, Kumar D, Chauhan MS, Manik R, Palta P, Singla SK.** Hand-made cloned buffalo embryos: comparison of different media and culture systems. *Cloning Stem Cells*, v.10, p.435-442, 2008.
- Shi D, Lu F, Wei Y, Cui K, Yang S, Wei J, Liu Q.** Buffalos cloned by nuclear transfer of somatic cells. *Biol Reprod*, v.77, p.285-291, 2007.
- Simon L, Veerapandian C, Balasubramanian S, Subramanian A.** Somatic cell nuclear transfer in buffalos: effect of the fusion and activation protocols and embryo culture system on preimplantation embryo development. *Reprod Fertil Dev*, v.18, p.439-445, 2006.
- Singh G, Totey SM, Talwar GP.** In vitro fertilization of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes matured in vitro. *Theriogenology*, v.31, p.255, 1989. Abstract.
- Siqueira JB, Leal LS, Oba E.** Dinâmica folicular ovariana na espécie bubalina. *Rev Bras Reprod Anim*, v.33, p.138-148, 2009.
- Suresh KP, Nandi S, Mondal S.** Factors affecting laboratory production of buffalo embryos: a meta-analysis. *Theriogenology*, v. 72, p. 978-85, 2009.
- Suzuki T, Singla SK, Sujata J, Madan ML.** Cleavage capability of water buffalo follicular oocytes classified by cumulus cells and fertilized *in vitro*. *J Vet Med Sci*, v.53, p.475-478, 1991.
- Techakumphu M, Promdireg A, Na-Chiengmai A, Phutikanit N.** Repeated oocyte pick up in prepubertal swamp buffalo calves after FSH superstimulation. *Theriogenology*, v.61, p.1705-1711, 2004.
- Warriach HM, Chohan KR.** Thickness of cumulus cell layer is a significant factor in meiotic competence of buffalo oocytes. *J Vet Sci*, v.5, p.247-251, 2004.
- Yousaf MR, Chohan KR.** Nuclear morphology, diameter and meiotic competence of buffalo oocytes relative to follicle size. *Reprod Fertil Dev*, v.15, p.223-229, 2003.
-