



Desafios técnicos e biológicos na produção *in vitro* de embriões de búfalo

Desafíos técnicos y biológicos en la producción in vitro de embriones de búfalo

***Diego Fernando Dubeibe Marín**

*Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales - UDCA, Facultad de Ciencias Agropecuarias,
Calle 222, # 55 – 37, Bogotá, Cundinamarca, Colombia

Resumo

O elevado número de búfalos, junto com seus atributos produtivos, tem convertido a Amazônia brasileira em uma das regiões mais importantes na produção de animais desta espécie fora da Ásia. O uso de biotecnologias reprodutivas tem permitido importantes avanços no melhoramento genético, no entanto, a resposta dos búfalos às diferentes técnicas de reprodução assistida é variável. Atualmente, a produção *in vitro* de embriões nesta espécie, embora represente uma técnica com resultados promissores, ainda se depara com desafios relacionados com as particularidades estruturais e metabólicas dos gametas e embriões, assim como com as características morfofisiológicas próprias da reprodução dos búfalos. Conjuntamente, essas características compõem os fatores biológicos e técnicos que majoritariamente reduzem a eficiência dos resultados e que obrigam a adaptação dos sistemas e das metodologias utilizadas ao longo do processo de produção de embriões no laboratório. Nesse sentido, representam os pontos-chaves que merecem ser analisados em profundidade na procura de melhorar os resultados e alcançar a maior eficiência da técnica quando aplicada à espécie bubalina.

Palavras-chave: população folicular, qualidade oocitária, metabolismo, reprodução, búfalos

Resumen

El elevado número de búfalos, junto con sus atributos productivos, han convertido a la Amazonia brasilera en una de las regiones más importantes para la producción de animales de esta especie fuera del continente asiático. La implementación de biotecnologías reproductivas ha permitido importantes avances en el mejoramiento genético, sin embargo, la respuesta de los búfalos a las diferentes técnicas de reproducción asistida es variable. En la actualidad, la producción in vitro de embriones en esta especie, aun cuando representa una técnica con resultados promisorios, enfrenta desafíos relacionados con las particularidades estructurales y metabólicas de los gametos y embriones, así como, con las características morfofisiológicas propias de la reproducción de los búfalos. Conjuntamente, esas características componen los factores de orden técnico y biológico que en mayor medida reducen la eficiencia de los resultados, y que obligan a la adaptación de los sistemas y las metodologías utilizadas a lo largo de la producción de embriones en el laboratorio, por lo tanto, representan los puntos clave que merecen ser analizados a profundidad, en la búsqueda de mejorar los resultados, y de alcanzar la plena eficiencia de la técnica, cuando se implementa en la especie bufalina.

Palabras clave: Población folicular, calidad oocitária, metabolismo, reproducción, búfalos.

Introdução

Atualmente, o Brasil abriga ao redor de 1,4 milhões de búfalos, dos quais 73% estão localizados na região socioeconomicamente delimitada ao norte do país, conhecida como a Amazônia Legal (IBGE, 2020). Essa característica faz da Amazônia brasileira o lugar com a maior densidade populacional de búfalos das Américas, e uma das regiões mais importantes na produção de búfalos fora do continente asiático (da Silva et al., 2021).

A relevância produtiva dos búfalos concentra-se na sua alta capacidade de produção de carne, leite com elevadas concentrações de sólidos totais, e considerável força de tração (Zhang et al., 2020), além das características de adaptabilidade, rusticidade, longevidade, docilidade e capacidade de aproveitamento de forragens com alto teor de fibras (Bastianetto, 2009).

Os animais desta espécie apresentam uma adequada resposta a determinadas biotecnologias que aceleram o ganho genético paterno, tais como a inseminação artificial em tempo fixo (Baruselli et al.,

¹Correspondência: dubeibe12@gmail.com

Recebido: 05 de setembro de 2021

Aceito: 28 de dezembro de 2021



2010), a criopreservação de sêmen (Patil et al., 2020), e a sexagem de espermatozoides (Gaviraghi et al., 2013). No entanto, apesar dos avanços, a aplicabilidade em larga escala de outras técnicas como a produção *in vivo* ou *in vitro* de embriões, com potencial para acelerar o ganho genético paterno e materno, ainda apresentam algumas limitações.

Fatores possivelmente relacionados com a captura e o transporte dos oócitos ao longo do oviduto (Baruselli et al., 2000; Neglia et al., 2010), foram apontados como os responsáveis pela baixa taxa de embriões recuperados (20 - 40%) a partir de búfalas submetidas a protocolos de superovulação (Baruselli et al., 2020). Apesar dos reportes (Drost et al., 1983; Gasparrini e Tyagi, 2007), a baixa eficiência, produto do desconhecimento dos causas que afetam negativamente os resultados, mantém essa técnica longe do plano comercial para sua aplicabilidade massiva.

Por sua vez, os resultados obtidos a partir da produção *in vitro* de embriões (PIVE), têm demonstrado alto potencial de aplicabilidade dessa técnica em búfalos (Ohashi et al., 2017; Dubeibe Marin et al., 2019). As adequadas taxas de maturação oocitária ($\geq 80\%$), junto com as taxas aceitáveis de clivagem ($\sim 50\%$), produção de blastocisto (20-25%) e gestação pós-transferência nas receptoras ($\sim 25\%$) (Suresh et al., 2009), tornaram a PIVE em búfalos atraente nos últimos anos. No entanto, baseado no número absoluto de embriões e gestações obtidas por cada doadora submetida à aspiração folicular transvaginal (OPU) ($\sim 1,5$ e $0,5$, respectivamente) (Baruselli et al., 2018; Dubeibe Marin et al., 2019), a plena eficiência da técnica ainda não foi alcançada e certas particularidades devem ser analisadas antes de considerar sua aplicabilidade nesta espécie.

O objetivo desta revisão é fornecer uma análise dos fatores biológicos e técnicos que atualmente dificultam o desenvolvimento completo da técnica de PIVE na espécie bubalina, buscando enfatizar os aspectos que podem ser melhorados para que o desempenho da técnica possa se tornar, quando menos, comparável ao obtido na espécie bovina.

Fatores biológicos que afetam a PIVE em búfalos

Algumas características morfofisiológicas da reprodução dos búfalos poderiam ser consideradas limitantes para a PIVE, uma vez que reduzem a eficiência dos resultados e, conseqüentemente, comprometem sua rentabilidade. Tais fatores poderiam ser responsáveis, ao menos parcialmente, pelo maior valor nos custos de produção dos embriões de búfalo (~ 3 a 4 vezes) em comparação aos bovinos (Ohashi et al., 2017).

População folicular

O potencial de obtenção de oócitos utilizados como matéria-prima na produção de embriões depende, em grande parte, da população de folículos antrais disponíveis no momento da aspiração folicular (Zangirolamo et al., 2018). Por sua vez, a população de folículos antrais é uma característica individual que pode ser determinada por fatores genéticos (Merton et al., 2009) e nutricionais (Diskin et al., 2003).

Os búfalos normalmente apresentam ovários de tamanho pequeno em relação à sua estrutura corporal e a reserva ovariana de folículos primordiais tem sido estimada aproximadamente entre 10000 – 19000 (Danell, 1987), isto é, 20 a 30% menor em comparação aos bovinos (Gasparrini e Tyagi, 2007; Santos et al., 2013).

Foi verificado que, semelhante aos bovinos, a dinâmica de crescimento/atresia dos folículos antrais em búfalos segue um padrão de ondas, ocorrendo na maioria dos animais 2 ondas de crescimento folicular (Ali et al., 2003). Além disso, o número de folículos recrutados para iniciar cada onda folicular é geralmente baixo (cerca de 5 a 8) (Baruselli et al., 1997), podendo ser semelhante ao observado para bovinos *Bos Taurus*, porém, menor em comparação às fêmeas *Bos Indicus* (Gimenes et al., 2009; Baldrighi et al., 2014). No entanto, a taxa na qual os folículos antrais sofrem atresia tem sido considerada particularmente alta em búfalos (Kumar et al., 1997; Feranil et al., 2005), sendo calculado por diferentes autores em torno de 63 - 95% do total dos folículos presentes nos dois ovários (Danell, 1987; Van Ty et al., 1989).

O número de complexos *cumulus*-oócitos (CCOs) recuperados em cada sessão de OPU pode ser altamente variável entre animais, e alguns fatores tais como a fazenda, a condição reprodutiva (gestante ou não), e a categoria das doadoras (nulíparas, primíparas ou múltíparas), podem também influenciar esta característica (Baruselli et al., 2018). Em programas de PIVE em búfalos realizados no estado do Pará (Brasil), observamos que o número de folículos aspirados em cada animal mostrou uma variação de 5 a 39, sendo que a maior proporção das búfalas apresentou uma população folicular intermediária (entre 10 e 19), em comparação aos animais com número baixo (≤ 9) ou alto de folículos antrais (≥ 20) (Figura 1). No entanto, após a OPU foram recuperados em média $10,4 \pm 6,5$ CCOs /animal, dos quais, a partir da maioria das búfalas (88,4%) foram

obtidos uma quantidade menor a 19 CCOs em cada sessão de aspiração (Figura 1).

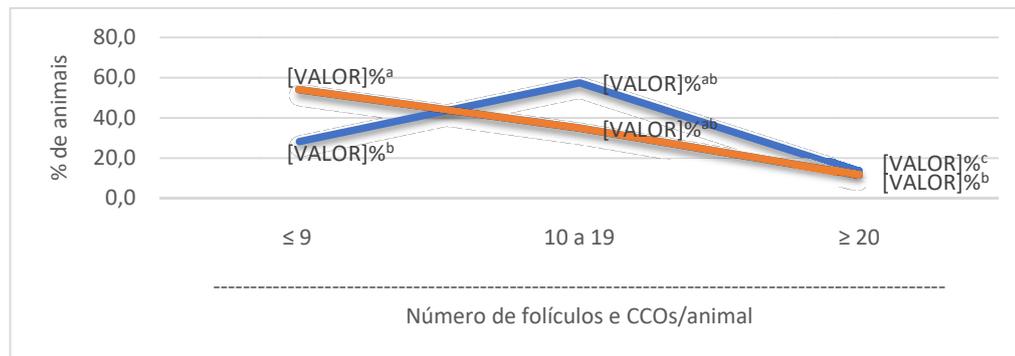


Figura 1. Distribuição da proporção (%) de búfalas com número total de folículos antrais disponíveis para aspiração folicular (linha azul), e quantidade de CCOs recuperados (linha vermelha) menor a 9, entre 10 e 19, e maior a 20. Dados coletados de 185 sessões de OPU no estado do Pará, Brasil. Letras diferentes entre valores das linhas de cada cor, indicam diferenças significativas ($p \leq 0,05$).

Embora existam grandes variações entre os indivíduos, a população folicular é uma característica altamente repetível no mesmo animal ao longo de várias sessões de aspiração folicular. Nesse sentido, é aconselhável que, juntamente com os atributos produtivos, essa característica seja incluída como critério de seleção para búfalas doadoras de oócitos (Ohashi et al., 2017; Baruselli et al., 2018; Dubeibe Marin et al., 2019). Além disso, devido à sua possível natureza hereditária (Walsh et al., 2014), a inclusão deste parâmetro de seleção, junto com um manejo nutricional adequado de receptoras e doadoras (Mossa et al., 2013), teriam o potencial de corrigir e perpetuar esse atributo ao longo do tempo nas futuras gerações de búfalas destinadas à reprodução, podendo dessa forma aumentar a eficiência nos futuros programas de PIVE nesta espécie.

Qualidade oocitária

A qualidade intrínseca dos oócitos é o um dos principais fatores que determina a taxa final de produção de blastocistos no laboratório (Rizos et al., 2002). Nesse sentido, a correta seleção dos oócitos mais competentes é um fator essencial no intuito de garantir o sucesso nos resultados.

A principal ferramenta utilizada nos programas de PIVE, na procura de prognosticar a competência dos oócitos imaturos, é a avaliação visual das características morfológicas dos CCOs (Leibfried e First, 1979). Os critérios de avaliação para CCOs de búfalos são os mesmos utilizados para bovinos, e obedecem principalmente à aparência do citoplasma dos oócitos, e à quantidade e compactação das células do *cumulus* entorno deles (Di Francesco et al., 2011).

No entanto, devido a algumas características particulares dos CCOs de búfalos, tais como: (i) elevado conteúdo de lipídios intracitoplasmáticos nos oócitos (Dubeibe Marin et al., 2019), (ii) frágil aderência entre as células do *cumulus*, e entre estas e oócito (Gasparini, 2002), (iii) elevada taxa de atresia folicular (Ocampo et al., 1994), e (iiii) maior fragilidade da zona pelúcida (Mondadori et al., 2010); os CCOs de búfalos tradicionalmente apresentam oócitos com citoplasma heterogêneo (presença de manchas negras), e uma camada de células de *cumulus* reduzida, chegando inclusive a estar ausente em muitas ocasiões. Como consequência, a proporção de CCOs de búfalos, recuperados a partir de OPU e classificados como viáveis, é tradicionalmente baixa (Neglia et al., 2003).

A avaliação das características qualitativas e quantitativas dos CCOs recuperados em programas de PIVE, revelou que a proporção de CCOs viáveis pode ser alterada de acordo com a localização da propriedade onde foram obtidos (Tabela 1). Esses dados sugerem que fatores externos, provavelmente de caráter nutricional, sanitário ou ambiental têm o potencial de influenciar a qualidade morfológica dos CCOs, e consequentemente, a competência dos oócitos (Rolim filho et al., 2021, dados não publicados).

Considerando o dito anteriormente, o desenho de uma forma diferente de classificação que se ajuste às características morfológicas próprias dos CCOs de búfalo seria aconselhável com o objetivo de reavaliar os atributos qualitativos que verdadeiramente impactam na competência dos oócitos desta espécie. De outra maneira, o uso da classificação desenvolvida para CCOs bovinos, deverá seguir sendo realizada considerando uma elevada flexibilização nos critérios para evitar o descarte de um número excessivo de CCOs em cada sessão de OPU.



Tabela 1. Quantidade e equivalente em proporção do número de folículos e estruturas recuperadas mediante OPU, em búfalos localizados em duas regiões diferentes do estado do Pará, Brasil.

Região	Folículos Aspirados	Estruturas recuperadas	CCOs levados para MIV	CCOs viáveis
Bujarú	13,5±5,6	10,4±6,5 (76%) ^a	5,2±3,9 (51%)	3,1±2,6 (23,4%) ^a
Marajó	10,4±3,5	6,7±3,3 (64%) ^b	3,7±2,0 (55%)	0,5±0,8 (7%) ^b

Os valores representam médias ± DP. Letras diferentes entre colunas indicam diferenças significativas ($p \leq 0,05$). A proporção (%) de CCOs levados para MIV e de CCOs viáveis foi calculado a partir do total de estruturas recuperadas. CCOs: complexos cumulus-oócito; MIV: maturação *in vitro*; OPU: aspiração folicular guiada por ultrassonografia (Adaptado de Dubeibe Marin et al., 2019).

Sazonalidade

Os búfalos são considerados poliesticos estacionais de dias curtos, sendo favoráveis à reprodução no inverno e outono (Das e Khan, 2010).

Fora da estação reprodutiva, a qualidade dos oócitos diminui consideravelmente devido à maior taxa de atresia folicular (Sasan et al., 2016), aos efeitos deletérios diretos do estresse calórico em épocas de elevada temperatura e humidade (Hamam et al., 2001), e a fatores autocrinos intrínsecos liberados no ovário (Di Francesco et al., 2011). A diminuição na competência dos oócitos reflete em baixas taxas de embriões obtidos *in vitro*, e com baixa qualidade (Shahzad et al., 2020).

No entanto, a partir da observação que a sazonalidade não apresenta efeitos deletérios na receptividade uterina, foi sugerido que o excedente de embriões produzidos na época reprodutiva favorável pode ser criopreservado e transferido para receptoras em época não favorável à reprodução, sem afetar as taxas de prenhez, e dessa forma garantindo a viabilidade dos programas de PIVE ao longo do ano (da Silva et al., 2021).

Nas regiões perto da linha do equador não existe uma grande variação na duração do dia ao longo do ano, o que significa que nessa localização os efeitos do fotoperíodo e da sazonalidade no desempenho reprodutivo dos búfalos são praticamente nulos. No entanto, como foi mencionado anteriormente, o desequilíbrio na condição de outros fatores de caráter climático, nutricional, ou sanitários, claramente pode influenciar na competência dos oócitos e dessa forma afetar a eficiência nos resultados da PIVE.

Fatores técnicos que afetam a PIVE em búfalos

As particularidades estruturais e metabólicas dos gametas e embriões bubalinos têm obrigado à adaptação dos sistemas e das metodologias utilizadas ao longo do processo de produção de embriões no laboratório. Algumas dessas adaptações são rotineiramente consideradas, enquanto outras, requerem maior refinamento na procura de melhorar os resultados.

Condições de cultivo para gametas e embriões

Em comparação com os bovinos, os oócitos de búfalo atingem a metáfase II mais cedo desde a sua retirada do folículo (~22 e 18 h, para oócitos bovinos e bubalinos, respectivamente), por esse motivo, o tempo de maturação no laboratório para oócitos de búfalo não deveria superar as 18 h. Tem sido reportado que tempos maiores de maturação podem diminuir a taxa de produção de embriões, devido ao envelhecimento celular e alterações na configuração da cromatina (Kumar e Anand, 2012).

Da mesma forma, os embriões de búfalo apresentam um desenvolvimento mais acelerado, atingindo o estágio de blastocisto de 0,5 a 1 dia antes que os embriões bovinos. Em consequência, o cultivo dos embriões *in vitro* deve ser ajustado para 6 dias após a fecundação, e o planejamento da transferência dos embriões para as receptoras também deve prever esta particularidade (Galli et al., 2001).

Do ponto de vista biológico, estas diferenças na cinética da maturação nuclear e desenvolvimento embrionário, indicam características metabólicas próprias da espécie. A avaliação do metabolismo lipídico, por exemplo, revelou que, além das grandes diferenças metabólicas entre CCOs maturados *in vivo* e *in vitro*, os CCOs de búfalo têm a capacidade de utilizar a reserva lipídica como fonte de energia de uma maneira eficiente. No entanto, o aumento da β -oxidação dos ácidos graxos, mediante a suplementação do meio de maturação com L-carnitina, na presença de soro fetal bovino pode afetar



negativamente a produção de blastocistos (Dubeibe et al., 2020; Tabela 2), sugerindo uma alta sensibilidade dos oócitos desta espécie aos efeitos deletérios dos radicais livres derivados do metabolismo endógeno, provavelmente a causa da grande reserva intracelular de lipídios.

Tabela 2. Efeito da suplementação com L-Carnitina (3,03 mM) durante a maturação *in vitro* de CCOs na presença de albumina sérica bovina livre de ácidos graxos (BSA) ou soro fetal bovino (FBS), na produção *in vitro* de embriões de búfalo.

Tratamento	Clivagem (%)	Blastocistos-D6 (%)	Blastocistos-D7 (%)
SFB	63.6±11.1 ^a	30.7±5.3 ^a	34.4±6.4 ^a
SFB + L-Carnitina	52.8±13.7 ^a	16.4±4.3 ^b	23.8±7.9 ^b
BSA	58.8±12.2 ^a	20.2±9.7 ^{ab}	25.6±9.3 ^{ab}
BSA + L-Carnitina	44.9±20.1 ^a	26.2±10.1 ^{ab}	28.8±8.5 ^{ab}

Os valores representam médias ± DP. Letras diferentes entre valores na mesma coluna indicam diferenças entre grupos ($p \leq 0,05$). CCOs: complexos cumulus-ovocitos. (Adaptado de Dubeibe et al., 2020)

Futuras pesquisas são necessárias para se caracterizar o metabolismo dos carboidratos e proteínas em CCOs e embriões, e dessa forma definir as formulações e condições de cultivo mais adequados às particularidades metabólicas dos gametas e embriões de búfalo.

Pressão de fluxo na aspiração folicular

A frágil aderência entre as células do *cumulus*, e entre estas e o oócito, permite que uma relativa elevada pressão de vácuo no momento da aspiração folicular em animais vivos cause a dispersão e até mesmo o desprendimento de uma grande quantidade de células do *cumulus*, contando como um dos fatores que afetam a viabilidade morfológica dos CCOs de búfalos (Boni, 1994).

Ainda que este fator não tenha sido suficientemente estudado na espécie bufalina, há evidências em outras espécies que indicam que a pressão de vácuo pode afetar a taxa de maturação oocitária e a produção final de blastocistos (Bols et al., 1996). Os procedimentos para a aspiração folicular transvaginal utilizados no búfalo rotineiramente são os mesmos usados na espécie bovina, sendo implementado em torno de 80 mmHg na pressão de aspiração. No entanto, tem sido indicado que uma pressão menor (em torno de 40 mmHg) é mais conveniente para procedimentos de OPU nesta espécie (Rolim Filho, comunicação pessoal). A avaliação dos efeitos de diferentes fluxos de pressão na competência dos oócitos é necessária para o desenho de protocolos de aspiração folicular favoráveis às estruturas dos búfalos, sem que estes comprometam a taxa de recuperação de CCOs.

Protocolos de sincronização das receptoras

A ausência de sinais evidentes de cio na maioria das búfalas impede o estabelecimento de programas práticos de transferência de embriões (TE) baseados na detecção do estro natural (Roy e Prakash, 2009). Dessa forma, a única alternativa prática e eficiente nos programas de TE em búfalos, corresponde à transferência de embriões em tempo fixo (TETF), a qual implica o uso de protocolos hormonais de sincronização.

Em geral, a resposta das búfalas aos protocolos hormonais é boa. No entanto, fatores como a assincronia das receptoras em relação ao estágio de desenvolvimento embrionário, a qualidade dos embriões transferidos, e/ou a luteólise prematura, podem afetar a taxa de prenhez após a TE (Misra et al., 1999).

Por sua vez, em comparação aos bovinos, o menor tamanho tanto do folículo ovulatório como do corpo lúteo, são responsáveis pelas baixas concentrações fisiológicas de estrógeno e progesterona em búfalas durante o ciclo estral (Mondal e Prakash, 2004). Dessa forma, tem sido sugerido que as concentrações hormonais utilizadas nos protocolos, especificamente as de progesterona (i.e. dispositivos intravaginais) devem ser ajustadas às necessidades da espécie (Ohashi et al., 2017).

A relação entre o uso de dispositivos com elevadas concentrações de progesterona (> 1g) e a luteólise prematura em búfalas receptoras, é uma hipótese que ainda deve ser testada experimentalmente.

Conclusão

A evolução nos resultados tem possibilitado a inclusão da PIVE como ferramenta em programas



comerciais de melhoramento genético em búfalos. No entanto, diversos fatores de carácter biológico e técnico ainda devem ser respeitados, melhorados ou estudados mais a profundidade, com o objetivo de aumentar a eficiência nos resultados, e dessa maneira diminuir os custos da sua implementação na espécie bufalina.

Referências

- Ali A, Abdel-Razek A, Abdel-Ghaffar S, Glatzel P. Ovarian Follicular Dynamics in Buffalo Cows (*Bubalus bubalis*). *Reprod Domest Anim.* 2003;38(3):214–218. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2003.00428.x>. PMID: 12753556.
- Baldrighi J, Sá Filho M, Batista E, Lopes R, Visintin J, Baruselli P, Assumpção M. Anti-Mullerian Hormone Concentration and Antral Ovarian Follicle Population in Murrah Heifers Compared to Holstein and Gyr Kept Under the Same Management. *Reprod Domest Anim.* 2014;49(6):1015–1020. <https://doi.org/10.1111/rda.12430>. PMID: 25291989.
- Baruselli P, Madureira E, Visintin J, Porto Filho R, Carvalho N, Campanile G, Zicarelli L. Failure oocyte entry into oviduct in superovulated buffalo. *Theriogenology.* 2000;53: 491.
- Baruselli PS, Carvalho NAT, Gimenes LU, Crepaldi GA. Fixed-time artificial insemination in buffalo. *Ital J Anim Sci.* 2010;6(2s):107-118 <https://doi.org/10.4081/ijas.2007.s2.107>
- Baruselli P, Soares JG, Bayeux BM, Silva JCB, Mingoti RD, Carvalho NAT. Assisted reproductive technologies (ART) in water buffaloes. *Anim Reprod.* 2018;15(1):971–983. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-0043>
- Baruselli PS, Mucciolo RG, Visintin JA, Viana WG, Arruda RP, Madureira EH, Oliveira CA, Molero-Filho JR. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology.* 1997;47(8):1531–1547. [http://doi.org/10.1016/s0093-691x\(97\)00159-3](http://doi.org/10.1016/s0093-691x(97)00159-3). PMID: 16728096.
- Baruselli PS, Carvalho JGS, Elliff FM, Silva JCB, Chello D, Carvalho NAT. Embryo transfer in buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology.* 2020;150:221–228. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.01.037>. PMID: 31996292.
- Bastianetto, E. Criação de búfalos no Brasil: situação e perspectiva. *Rev Bras Reprod Anim.* 2009;(6):98–103.
- Bols PEJ, Van Soom A, Ysebaert MT, Vandenhede JMM, de Kruif A. Effects of aspiration vacuum and needle diameter on cumulus oocyte complex morphology and developmental capacity of bovine oocytes. *Theriogenology.* 1996;45(5):1001–1014. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(96\)00028-3](https://doi.org/10.1016/0093-691X(96)00028-3). PMID: 16727859.
- Boni R. In vitro embryo producción in bovine and buffalo species. *Buffalo Bulletin,* 1994;2:147–157.
- da Silva JAR, Garcia AR, de Almeida AM, Bezerra AS, de Brito Lourenço Junior J. Water buffalo production in the Brazilian Amazon Basin: a review. *Trop Anim Health Prod.* 2021;53(3):343. <https://doi.org/10.1007/s11250-021-02744-w>. PMID: 34089415
- da Silva JCB, Alves MBR, Bridi A, Bohrer RC, Escobar GSL, de Carvalho JABA, Binotti WAB, Pugliesi G, Lemes KM, Chello D, Perecin F. Reproductive seasonality influences oocyte retrieval and embryonic competence but not uterine receptivity in buffaloes. *Theriogenology.* 2021;170:77–84. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.04.019>
- Danell, B. (1987). Oestrus behaviour, ovarian morphology and cyclical variation in follicular system and endocrine pattern in water buffalo heifers. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Suécia.
- Das G, Khan F. Summer Anoestrus in Buffalo - A Review. *Reprod Domest Anim.* 2010;45(6):e483–e494. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01598.x>. PMID: 20345589.
- 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(1–2):48–53. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.11.009>. PMID: 21168984.
- Diskin MG, Mackey DR, Roche JF, Sreenan JM. Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. *Anim Reprod Sci.* 2003;78(3–4):345–370. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(03\)00099-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(03)00099-X). PMID: 12818653
- Drost M, Wright JM, Cripe WS, Richter AR. Embryo transfer in water buffalo (*bubalus bubalis*). *Theriogenology.* 1983;20(5):579–584. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(83\)90082-1](https://doi.org/10.1016/0093-691X(83)90082-1). PMID: 16725875.
- Dubeibe DF, Nogueira da Costa N, di Paula Bessa Santana P, Baia de Souza E, Rolim filho ST, da Silva Cordeiro M, Ohashi OM. Influence of l-carnitine on lipid metabolism of buffalo cumulus-oocyte



complexes matured in either fetal bovine serum or fatty acid-free bovine serum albumin. *Theriogenology*. 2020;158:382–390. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.09.030>. PMID: 33038824.

Dubeibe Marin DF, de Souza EB, de Brito VC, Nascimento CV, Ramos AS, Rolim ST, da Costa NN, Cordeiro MS, Santos SSD, Ohashi OM. In vitro embryo production in buffaloes: from the laboratory to the farm. *Anim Reprod*. 2019;16(2):260–266. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-0135>. PMID: 33224285.

Dubeibe Marin, DF, da Costa NN, di Paula Bessa Santana P, de Souza EB, Ohashi OM. Importance of lipid metabolism on oocyte maturation and early embryo development: Can we apply what we know to buffalo? *Anim Reprod Sci*. 2019;211:106220. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.106220>. PMID: 31785645.

Feranil J, Isobe N, Nakao T. Apoptosis in the antral follicles of swamp buffalo and cattle ovary: TUNEL and caspase-3 histochemistry. *Reprod Domest Anim*. 2005;40(2):111–116. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2005.00563.x>. PMID: 15819958.

Galli C, Crotti G, Notari C, Turini P, Duchi R, Lazzari G. Embryo production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology*. 2001;55(6):1341–1357. [http://doi.org/10.1016/s0093-691x\(01\)00486-1](http://doi.org/10.1016/s0093-691x(01)00486-1). PMID: 11327688.

Gasparrini B. In vitro embryo production in buffalo species: state of the art. *Theriogenology*. 2002;57(1):237–256. [http://doi.org/10.1016/s0093-691x\(01\)00669-0](http://doi.org/10.1016/s0093-691x(01)00669-0). PMID:11775973.

Gasparrini B, Tyagi S. In vivo embryo production in buffalo: current situation and future perspectives. *Ital J Anim Sci*. 2007;6(sup2):74–91. <https://doi.org/10.4081/ijas.2007.s2.74>.

Gaviraghi A, Puglisi R, Balduzzi D, Severgnini A, Bornaghi V, Bongioni G, Frana A, Gandini LM, Lukaj A, Bonacina C, Galli A. Minimum number of spermatozoa per dose in Mediterranean Italian buffalo (*Bubalus bubalis*) using sexed frozen semen and conventional artificial insemination. *Theriogenology*. 2013;79(8):1171–1176. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.02.014>. PMID: 23523175.

Gimenes L, Fantinato Neto P, Arango JS, Ayres H, Baruselli PS. Follicular dynamics of *Bos indicus*, *Bos taurus* and *Bubalus bubalis* heifers treated with norgestomet ear implant associated or not to injectable progesterone. *Anim Reprod*. 2009;6:256.

Hamam AM, Karima GH, Mahmoud MF, Nawito AAM, Selda SM, Nawar. Effect of the seasonal changes on recovery, quality and maturation of buffalo oocytes in vitro. *Egypt J Vet Sci*. 2001;35:123–133.

IBGE. Produção da Pecuária Municipal 2019. Available from: https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2019_v47_br_informativo.pdf. 2020.

Kumar A, Solanki VS, Jindal SK, Tripathi VN, Jain GC. Oocyte retrieval and histological studies of follicular population in buffalo ovaries. *Anim Reprod Sci*. 1997;47(3):189–195. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(96\)01588-6](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(96)01588-6). PMID: 9329860.

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

Leibfried L, First NL. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. *J Anim Sci* 1979;48(1):76–86. <https://doi.org/10.2527/jas1979.48176x>. PMID: 573253.

Merton JS, Ask B, Onkundi DC, Mullaart E, Colenbrander B, Nielen M. Genetic parameters for oocyte number and embryo production within a bovine ovum pick-up–in vitro production embryo-production program. *Theriogenology*. 2009;72(7):885–893. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.06.003>. PMID: 19716168.

Misra AK, Mutha Rao M, Kasiraj R, Ranga Reddy NS, Pant HC. Factors affecting pregnancy rate following nonsurgical embryo transfer in buffalo (*Bubalus bubalis*): A retrospective study. *Theriogenology*. 1999;52(1):1–10. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00105-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00105-3). PMID: 10734401.

Mondadori RG, Santin TR, Fidelis AAG, Name KPO, da Silva JS, Rumpf R, Bão SN. Ultrastructure of in vitro oocyte maturation in buffalo (*Bubalus bubalis*). *Zygote*. 2010;18(4):309–314. <https://doi.org/10.1017/S0967199409990335>. PMID: 20576206.

Mondal M, Prakash BS. Effects of long-term GH-releasing factor administration on patterns of GH and LH secretion in growing female buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Reproduction*. 2004;127(1):45–55. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00023>. PMID: 15056769.

Mossa F, Carter F, Walsh SW, Kenny DA, Smith GW, Ireland JLH, Hildebrandt TB, Lonergan P, Ireland JJ, Evans ACO. Maternal undernutrition in cows impairs ovarian and cardiovascular systems in their offspring. *Biol Reprod*. 2013;88(4). <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.107235>. PMID: 23426432.



- Neglia G, Gasparrini B, Caracciolo di Brienza V, Di Palo R, Campanile G, Antonio Presicce G, Zicarelli L.** Bovine and buffalo *in vitro* embryo production using oocytes derived from abattoir ovaries or collected by transvaginal follicle aspiration. *Theriogenology*. 2003;59(5-6):1123-1130. [http://doi.org/10.1016/s0093-691x\(02\)01170-6](http://doi.org/10.1016/s0093-691x(02)01170-6). PMID: 12527061.
- Neglia G, Gasparrini B, Vecchio D, Rubessa M, Di Palo R, Zicarelli L, Campanile G.** Progesterone supplementation during multiple ovulation treatment in buffalo species (*Bubalus bubalis*). *Trop Anim Health Prod*. 2010;42(6):1243-1247. <https://doi.org/10.1007/s11250-010-9556-8>. PMID: 20411328.
- Ocampo M, De Asis A, Ocampo L, Kanagawa H.** Histological observation of follicular atresia in swamp buffalo. *Buffalo Bulletin*. 1994;13:51-55.
- Ohashi OM, Nogueira N, Cordeiro S, Filho TR, Francisco H, Ribeiro L, Santos AX, Manrique H, Ayala D, Brito VC, Ramos ADS, Guimarães TV.** Produção *in vitro* de embrião (PIVE) na espécie bubalina. *Rev. Bras. Reprod. Anim*. 2017;14(1):195-200.
- Patil S, Kumar P, Singh G, Bala R, Jerome A, Patil CS, Kumar D, Singh S, Sharma RK.** ‘Semen dilution effect’ on sperm variables and conception rate in buffalo. *Anim Reprod Sci*. 2020;214:106304. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106304>. PMID: 32087917.
- Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP, Lonergan P.** Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol Reprod Dev*. 2002;61(2):234-248. <https://doi.org/10.1002/mrd.1153>. PMID: 11803560.
- Roy KS, Prakash BS.** Plasma progesterone, oestradiol-17 β and total oestrogen profiles in relation to oestrous behaviour during induced ovulation in Murrah buffalo heifers. *J Anim Physiol Anim Nutr*. 2009;93(4):486-495. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2008.00830.x>. PMID: 18507697.
- Santos SSD, Ferreira MAP, Sampaio RV, Costa NN, Santos DCN, Santana PPB, Sá ALA.** Evaluation of apoptosis as a mechanism of follicular cell atresia in the ovaries of cattle (*Bos indicus*) and buffalo (*Bubalus bubalis*) fetuses. *Anim. Reprod*. 2013;10(1):55-61.
- Sasan JS, Uppal V, Bansal N, Anuradha.** Histological exploration of graafian and atretic follicles of buffalo ovary: a seasonal study. *Buffalo Bulletin*. 2016;35(1):135-146.
- Shahzad Q, Waqas M, Pu L, Wadood AA, Xie L, Husna AU, Yang K, Wang J, Xu H, Lu K, Lu Y.** Seasonality and photoperiod influence *in vitro* production of buffalo embryos. *Reprod Domest Anim*. 2020;55(9):1115-1123. <https://doi.org/10.1111/rda.13749>. PMID: 32564396.
- Suresh KP, Nandi S, Mondal S.** Factors affecting laboratory production of buffalo embryos: a meta-analysis. *Theriogenology*. 2009;72(7):978-985. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.06.017>. PMID: 19695691.
- Van Ty L, Chupin D, Driancourt M.** Ovarian follicular populations in buffaloes and cows. *Anim Reprod Sci*. 1989;19(3):171-178.
- Walsh SW, Mossa F, Butler ST, Berry DP, Scheetz D, Jimenez-Krassel F, Tempelman RJ, Carter F, Lonergan P, Evans ACO, Ireland JJ.** Heritability and impact of environmental effects during pregnancy on antral follicle count in cattle. *J Dairy Sci*. 2014;97(7):4503-4511. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7758>. PMID: 24835969
- Zangirolamo AF, Morotti F, Silva NC, Sanches TK, Seneda MM.** Ovarian antral follicle populations and embryo production in cattle. *Anim Reprod*. 2018;15(3):310-315. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-0072>. PMID: 34178154.
- Zhang Y, Colli L, Barker JSF.** Asian water buffalo: domestication, history and genetics. *Anim Genet*. 2020;51(2):177-191. <https://doi.org/10.1111/age.12911>. PMID: 31967365.
-