



Produção *in vitro* de embrião (PIVE) na espécie bubalina

In vitro embryo production of water buffalo (*Bubalus bubalis*)

Otávio Mitio Ohashi^{1,8}, Nathália Nogueira da Costa Almeida², Marcela da Silva Cordeiro³, Sebastião Tavares Rolim Filho⁵, Haroldo Francisco Lobato Ribeiro⁵, Alessandra Ximenes Santos⁶, Henry Manrique Daniel Ayala⁴, Vanessa Cunha de Brito⁷, Anelise de Sarges Ramos⁷, Thiago Velasco Guimarães Silva⁸, Simone do Socorro Damasceno Santos¹, Moysés dos Santos Miranda¹

¹Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brasil.

²Bolsista da CAPES, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brasil.

³Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará, Belém, PA, Brasil.

⁴BRAVEX.

⁵Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, PA, Brasil.

⁶Pós-Graduando, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brasil.

⁷Bolsista Iniciação Científica, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brasil.

⁸Correspondência: ohashi@ufpa.br

Resumo

Nos últimos anos a biotécnica de produção *in vitro* de embrião (PIVE) em bubalino passou por importantes modificações, possibilitando a sua aplicação ao nível comercial. Entretanto, a taxa de produção de embrião por doadora ainda é muito baixa, refletindo diretamente no custo da prenhez, o qual é cerca de 3-4 vezes mais elevado que aquele observado em bovino zebuino. Essa baixa taxa de embrião ocorre em função de vários fatores, dentre os mais importantes podemos citar os fatores intrínsecos relacionados aos animais, como a baixa quantidade e qualidade dos oócitos obtidos por doadora; mas também a fatores extrínsecos, como a falta de meios de cultivo específicos para o oócito/embrião da espécie, as deficiências nas condições de manejo (nutricional e sanitário). Portanto, para a aplicação comercial mais abrangente, é necessário baixar o custo da prenhez, bem como, disponibilizar animais de comprovada produtividade (teste de progênie) para utilização em programas de PIVE e que do ponto de vista custo / benefício compense a utilização dessa técnica.

Palavra chave: búfalo, embrião, cultivo *in vitro*.

Abstract

In recent years, the biotechnology of in vitro embryo production (IVP) in buffalo has undergone a great improvement, allowing its application at the commercial level. However, the rate of embryo production per donor is still very low, reflecting directly on the cost of pregnancy that is about 3-4 times higher than zebu cattle. This low embryo rate occurs due to several factors. Among the most important are the intrinsic factors related to the animals such as the low quantity and quality of the oocytes obtained by the donor, but also to extrinsic factors such as the lack of specific culture media for the oocyte/embryo, and deficiencies in the management conditions, that could be nutritional or sanitary. Therefore, for the expansion in commercial application, it is necessary to reduce the cost of pregnancy, as well as to provide animals of proven productivity (progeny test) for use in PIVE programs and that from the cost / benefit point of view compensate the use of a high cost technique such as PIVE.

Keywords: buffalo, embryo, in vitro culture

Introdução

A produção *in vitro* de embrião (PIVE) na espécie bubalina só recentemente saiu da fase acadêmica experimental e alcançou o nível comercial (Saliba, 2013; *In vitro*, 2016), apesar das muitas dificuldades, principalmente em função das taxas de embriões produzidos por doadora aspirada ainda serem baixas refletindo diretamente no custo da prenhez, que é cerca de 3 a 4 vezes mais alto que em bovino zebuino.

Tais limitações se devem a fatores intrínsecos relacionados às características reprodutivas da espécie bubalina, mas também a fatores extrínsecos que dizem respeito, por exemplo, as condições de manejo, técnica de aspiração folicular, condições de cultivo *in vitro* dos oócitos e embriões e sincronização das receptoras, uma vez que a maioria das técnicas foram simplesmente adaptadas do bovino, e não desenvolvidas de acordo com as necessidades específicas da espécie bubalina, permitindo que em algumas etapas do processo, como por exemplo, as diferenças nas dosagens hormonais dos protocolos de sincronização de cio das fêmeas receptoras, influencie negativamente os resultados, principalmente, quando comparada com o sucesso da PIVE na espécie bovina zebuina.



Principais limitações da PIVE em bubalinos

Inúmeros são os fatores que influenciam a PIVE em bubalino, entretanto, listaremos a seguir as que consideramos de maior importância para o sucesso de um programa de natureza comercial que são: quantidade e qualidade dos oócitos, seleção das doadoras de oócitos, meios de cultivo de oócitos/embriões, manejo e nutrição animal.

Quantidade e qualidade dos oócitos

Sabemos que um dos fatores decisivos para o sucesso da PIVE é o número de folículos antrais disponíveis para a aspiração folicular (AF), número este que está intimamente relacionado às características reprodutivas da espécie e que no caso dos bubalinos apresentam um baixo número de folículos antrais, semelhante à espécie taurina (Gimenes, 2010; Sartori e Barros, 2011; Baldrighi et al., 2014) e cerca de duas vezes menos (Tab. 1) que em animais zebuínos (*Bos indicus*) (Ohashi et al., 2003; Gimenes, 2010). Entretanto, não apenas a quantidade de oócitos obtidos por AF é menor, como também a qualidade dos oócitos viáveis para PIVE é inferior. Essas características têm como consequência uma menor taxa de blastocisto e menor taxa de prenhez por AF/Doadora (Tab. 2) resultando na elevação do custo da gestação na referida espécie. A aplicação do hormônio somatotropina bovina tem sido aplicada em búfalas visando a obtenção de maior número de oócitos de melhor qualidade (competentes) (Sá Filho et al., 2009). Entretanto Ferraz et al. (2015) obtiveram melhora na quantidade e na qualidade dos oócitos, mas paradoxalmente, obtiveram menor taxa de embrião comparado ao grupo controle que não recebeu o hormônio.

No período de 2001 a 2005, desenvolvemos projetos de PIVE em parceria com fazendas de criação de Nelore (*Bos indicus*) e bubalinos, onde foram utilizados para bubalino os mesmos protocolos (meios de cultivo, sincronização das vacas receptoras, etc.) desenvolvidos para bovino (Tab. 2).

Nestes trabalhos observamos que em Nelore foram obtidos 12,3 oócitos/doadora e em búfalas 5,1, com taxa de embrião de 1,14 e 0,18 embrião/doadora para a espécie zebuína e bubalina, respectivamente. Verifica-se que a espécie zebuína produziu cerca de seis vezes mais embriões do que a espécie bubalina, evidenciando o fato de que o menor número e a baixa qualidade dos oócitos acarretaram conseqüentemente a um menor número de embriões por doadora, fato que torna evidente que na espécie bubalina há uma maior dificuldade de se produzir embrião pelo processo de PIVE, influenciando desta forma no custo da prenhez.

Entretanto, o que chamou a atenção foi à taxa de prenhez, onde não se obteve nenhuma prenhez em bubalinos, enquanto que no bovino a taxa foi de 42,6%. Este resultado deveu-se, muito provavelmente, dentre outros fatores, ao uso do protocolo bovino para a sincronização das receptoras bubalinas, que hoje sabemos ser diferente da do bovino, especialmente em relação à dosagem hormonal. Na ocasião foi usado um protocolo com dispositivo contendo 1,9 g de progesterona que agora já sabemos apresenta uma concentração muito alta para a espécie bubalina. Por este motivo atualmente usa-se dispositivo de segundo e até terceiro uso, ou dispositivo intravaginal novo, mas com concentração de progesterona com 1g ou menos.

Em uma meta análise, Suresh et al. (2009) analisando mais de 100 artigos publicados entre 1991 e 2008, observaram valores médios de taxa de blastocisto ao redor de 20%, valores considerados baixo pelos autores, resultado dentro dos parâmetros relatado no Brasil por Ferraz et al. (2015) onde as taxas variaram de 9,6 a 19,5%. No extremo oposto, Saliba et al. (2013), também em bubalinos no Brasil, relataram alta taxa de blastocisto (44,9%). Em nosso projeto, até o momento, observamos taxa de blastocisto de $36,58 \pm 18,1\%$, com grande variação de resultado como pode ser observado pelo desvio padrão, sendo observada uma grande variação individual nas doadoras e também entre touros utilizados como doadores de sêmen, demonstrando a necessidade da seleção prévia da doadora e do touro para um bom resultado no processo de PIVE.

Em um estudo comparativo, Gimenes (2010) observou taxa de blastocisto em novilhas nelores, taurinas e bubalinas de 28,3%, 14,1% e 10,2%, respectivamente, sendo relevante o fato de que as novilhas taurinas e bubalinas apresentaram taxas semelhantes ($P > 0,05$), ou seja, bem abaixo do observado em zebuínos ($P < 0,05\%$). Essa maior taxa de blastocisto observada nos animais da espécie zebuína está correlacionada diretamente com a população de folículos antrais e conseqüentemente maior número de oócitos obtidos e utilizados para PIVE, a qual na referida espécie é cerca de duas vezes mais alta do que nos taurinos e bubalinos. Este fato explica o sucesso dos programas de PIVE no Brasil, onde em sua maioria utilizam animais *Bos indicus*, especialmente da raça Nelore (Sartori e Barros, 2011).

Tabela1 - Média de folículos e oócitos em ovário bovino e bubalino (Fonte: Ohashi et al. 2003).

Animal	Folículos Aspirados	Oócitos Recuperados	Cumulus Compacto	2-3 Camadas	Parcialmente Desnudo	Desnudo
Búfalo (n=53)	$4,5 \pm 1,9^a$	$2,2 \pm 1,1^a$	$0,9 \pm 0,8^a$	$0,6 \pm 0,5$	$0,2 \pm 0,3$	$0,3 \pm 0,4$
Bovino (n=70)	$8,7 \pm 5,9^b$	$4,1 \pm 2,6^b$	$2,9 \pm 2,3^b$	$0,6 \pm 0,6$	$0,3 \pm 0,3$	$0,3 \pm 0,5$

Sobrescritos diferentes na mesma coluna, indicam diferença estatística ($P < 0,05$).

Tabela 2 - Dados comparativos de programas de produção *in vitro* de embrião bubalino e bovino (Nelore) em duas fazendas no Estado do Pará no ano de 2005.

Animal	Sessões de asp.	Vacas aspiradas	Oócitos recuperados	Oócito/ animal	Embrião/ animal	Gestação
Búfala	20	103 (5 / aspiração)	533	5,1	19 (0,18 / búfala)	nenhuma
Nelore	13	142 (11/ aspiração)	1.746	12,3	162 (1,14 / vaca)	69 (42,6%)

Outro fator que deve ser considerado em um programa de PIVE é a grande sensibilidade do oócito bubalino, pois em caso de transporte para o laboratório em garrafas térmicas, após seis horas ocorre perda significativa na taxa de fecundação e formação de blastocisto, enquanto que oócitos bovino, transportados nas mesmas condições, suportam entre 9 a 12 horas (Cordeiro, 2011). Entretanto, atualmente com o uso de incubadoras portáteis esse problema pode ser superado.

Seleção de doadoras com alta população folicular

Apesar da média da população folicular disponível para (AF) ser menor na espécie bubalina, em comparação com a espécie zebuína (Gimenez, 2010, Baldrighi et al. 2014) sabe-se que sempre há animais que apresentam população de folículos antrais acima da média. Portanto, baseado nos resultados de Burns et al. (2005) que observaram que em bovinos a população de folículos antrais é uma característica de alta repetibilidade, podemos utilizar essa característica como método de seleção de animais com alta população folicular, como sugerido em búfalas por Gasparrini et al. (2014). Adicionalmente Cushman et al. (2009), observaram alta correlação entre o tamanho ovariano e a contagem de folículos antrais.

Baseado nesses fatos, acreditamos que seja possível realizar um processo de seleção e melhoramento para búfalas com grande população folicular visando aumentar a produção de embrião por AF/doadora, o que pode contribuir para a diminuição do custo da prenhez e estabelecimento de uma linhagem de animais bubalinos com alta taxa de folículos ovarianos, disponibilizando deste modo, animais para programas de PIVE.

Nesse sentido, em 2016, iniciamos um projeto de PIVE onde foram selecionadas como doadoras de oócitos apenas búfalas que apresentaram tamanho ovariano acima de 2,5 cm x 1,5 cm (comprimento x largura) e que mostravam ao exame com ultrassom, um número de folículos antrais acima de dez por ovário, o que até o momento, de 190 vacas examinadas, somente 28 foram selecionadas como doadoras (14,7%).

Os resultados preliminares desses animais em relação a folículos aspirados, oócitos recuperados, taxa de blastocisto e de prenhez estão descritos na Tab. 3 e apresentam-se bem acima dos dados da Tab. 2, demonstrando que o processo de seleção de doadoras de oócitos em bubalinos pode contribuir para aumentar o número de oócitos viáveis e com isso melhorar as taxas de PIVE, e conseqüentemente, diminuir o custo da prenhez. A taxa de 24% de prenhez ainda é baixa, mas para o início de programa consideramos aceitável, em função dos imprevistos e ajustes que se fazem necessários em projetos dessa natureza, principalmente quando da saída da condição experimental acadêmica para a aplicação a campo.

Tabela 3 - Resultados preliminares da aspiração folicular (AF) de búfalas selecionadas por tamanho ovariano acima de 2,5 cm x 1,5 cm (comprimento x largura) no Estado do Pará, Brasil.

Variável	Nº Amostral	Média / Doadora	%
Doadoras	28	-	-
Sessões de AF	61	-	-
Folículos aspirados	903	13,55 ± 5,3	-
Oócitos recuperados	549	7,75 ± 5,1	57,65
Oócitos selecionados para FIV	365	5,11 ± 3,4	65,93
Embriões produzidos	39 / 61	-	10,68
Embriões transferidos	25	0,63 ± 0,1	-
Prenhezes	6 / 25	-	24,0

Meios de cultivo

O embrião bubalino apresenta algumas diferenças em relação ao embrião bovino, como por exemplo, maior depósito de lipídios citoplasmáticos (Boni et al, 1992; Mondadori et al., 2010) e uma cinética de desenvolvimento mais acelerada, permitindo que o embrião bubalino alcance o estágio de blastocisto aos 5,5 a 6 dias, portanto, mais precoce que o embrião bovino, o qual chega ao mesmo estágio no sétimo/oitavo dia.

Isso demonstra que o embrião bubalino metabolicamente é diferente do embrião bovino, havendo, portanto a necessidade do desenvolvimento de meios de cultivo específicos para atender as características



metabólicas do referido embrião (Takahashi et al. (1992) e nesse sentido, várias substâncias foram testadas no meio de cultivo de oócito e embrião bubalino.

Por exemplo, sabemos que o consumo de glicose em bovino e camundongo torna-se necessária após a fase de transição da ativação do genoma materno para embrião (Thompson et al., 1992), entretanto em bubalino, segundo Kumar et al. (2012, 2013) a alta concentração de glicose (5,6 mM) é necessária durante todo o processo de PIVE, obtendo-se melhor resultado quando o cultivo é realizado sob baixa concentração de O₂ (5%) (Kumar et al., 2015). Contudo, a taxa de blastocisto obtida pelos referidos autores com a alta concentração de glicose foi de 20%, a qual não difere da taxa média mundial citada por Suresh et al. (2009). Portanto, essa concentração de glicose deve ser melhor avaliada na PIVE bubalino.

Outro passo determinante para melhorar a quantidade e qualidade do embrião bubalino produzido *in vitro* foi a adição de substâncias com propriedades anti-oxidantes, principalmente a cisteamina, que quando adicionada somente no meio de maturação (Gasparrini et al., 2000; Gasparrini et al., 2003), ou adicionada ao meio de maturação e de cultivo embrionário melhoraram não só a taxa de maturação oocitária como a qualidade dos embriões produzidos (Anand et al., 2008). Outras substâncias como a taurina e a melatonina, que atuam também como antioxidante foram utilizadas nos meios de maturação e cultivo embrionário melhorando as taxas de maturação e de embriões transferíveis em bubalino (Manjunatha et al., 2009). A adição de fatores de crescimento, tais como o IGF e EGF, também demonstrou sua importância na melhora do processo de PIVE em bubalino, principalmente, quando combinado com antioxidante. Singhal (et al. 2009) relataram taxa de 52,2% de blastocisto quando a maturação oocitária foi realizada com IGF e cisteamina contra 7,7% quando foi realizada com EGF e beta-mercaptoetanol.

Atualmente, está sendo testado em cultivo de embrião bubalino, meio condicionado com células tronco, com resultado promissores (Bhardwaj et al. 2016) que segundo os autores, deve-se ao fato de que essas células produzem fatores de crescimento que atuam no metabolismo embrionário.

Condições de manejo

Tendo em vista que encontramos bubalinos sendo criados nos mais diversos ambientes, como no clima tropical amazônico, e em regiões de clima frio como o Canadá, Alemanha, Holanda, etc, deve-se levar em consideração as características climáticas e ambientais regionais, especialmente as características extremas, como a alta temperatura, umidade e radiação solar do clima amazônico bem como o extremo frio dos países como Canadá, onde além do frio, deve ser levado em conta o fato do búfalo apresentar, em regiões com estações climáticas bem definidas, a reprodução em estações de dias curtos (outono e inverno).

A pequena população de folículos antrais disponíveis por ciclo, é uma característica da espécie, já demonstrada por Gimenes (2010), entretanto segundo Evans et al. (2012) e Mossa et al. (2013), a condição nutricional da mãe no período gestacional interfere na foliculogênese ovariana fetal, com conseqüente diminuição da população folicular ovariana que por sua vez refletirá em uma menor população de folículos antrais na fase adulta do animal. Este fato chama a atenção, tendo em vista que em nossa experiência de campo observamos que nas fazendas que trabalham com criação de bubalinos visando a produção de leite, quase sempre não é feito o manejo nutricional adequado dos animais, especialmente das búfalas em produção leiteira, bem como dos bezerros(as) o que pode contribuir ainda mais para a menor população folicular das búfalas oriundas desse manejo inadequado. Portanto é necessário mais estudos para verificar o quanto dessa menor população folicular está relacionado à característica da espécie e quanto o ambiente nutricional na gestação está influenciando nessa característica, baseado na equação de que fenótipo = genótipo + ambiente.

Considerações finais

O grande avanço e aperfeiçoamento no processo de PIVE em bubalino observado atualmente, deve-se dentre os vários fatores, especialmente aos avanços em relação aos meios e condições de cultivo como o uso de fatores de crescimento, antioxidante, etc., que talvez ainda não sejam o ideal, mas que ajudaram em muito a melhorar a quantidade e a qualidade embrionária. Outro fator imprescindível para melhorar quantitativamente o processo de PIVE é a seleção prévia dos animais doadores baseado no tamanho ovariano e na população folicular, bem como, o desenvolvimento e definição de protocolos de sincronização de cio das receptoras específicos para bubalinos. Em conjunto, esses fatores poderão diminuir o custo da prenhez na espécie bubalina viabilizando o seu uso em uma escala comercial mais abrangente.

Agradecimentos

À empresa Bubras pelo apoio financeiro e parceria. A CAPES e CNPQ pelas bolsas de estudo (pós-doc e PIBIC, respectivamente).



Referências

- 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*, v.20, p.253-257, 2008.
- Baldrighi JM, Sá Filho MF, Batista EOS, Lopes RNVR, Visintin JA, Baruselli PS, Assumpção MEOA.** Anti-Mullerian hormone concentration and antral ovarian follicle population in murrh heifers compared to Holstein and Gyr kept under the same management. *Reprod Domest Anim*, v.49, p.1015-1020, 2014.
- Bhardwaj R, Ansari MM, Parmar MS, Chandra V, Sharma GT.** Stem cell conditioned media contains important growth factors and improves *in vitro* buffalo embryo production. *Anim Biotechnol*, v. 27, p.118-125, 2016.
- Boni R, Santella L, Dale B, Roviello S, Di Palo R, Barbieri V.** Maturazione *in vitro* di oociti buffalini: indagineultrastrutturale. *Acta Med Vet*, v.38, p. 153-161, 1992.
- Burns DS, Jimenez-Krassel F, Ireland JLH, Knight PG, Ireland JJ.** Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: evidence for high variation among animals, very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum follicle-stimulating hormone concentrations. *Biol Reprod*, v.73. p.54-62, 2005.
- Cordeiro MS.** Avaliação de uma solução de água de coco (*Cocos nucifera*) suplementada na produção *in vitro* de embriões bovinos. 2011. 127f. Tese de Doutorado, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal - Universidade Federal do Pará, Belém, 2011.
- Cushman RA, Allan MF, Kuehn LA, Snelling WM, Cupp AS, Freetly HC.** Evaluation of antral follicle count and ovarian morphology in crossbred beef cows: Investigation of influence of stage of the estrous cycle, age, and birth weight. *J Anim Sci*, v.87, p.1971-1980, 2009.
- Evans ACO, Mossa F, Walsh SW, Scheetz D, Jimenez-Krassel F, Ireland JLH, Smith GW, Ireland JJ.** Effects of maternal environment during gestation on ovarian folliculogenesis and consequences for fertility in bovine offspring. *Reprod Domest Anim*, v.47, p.31-37, 2012.
- Ferraz ML, Sá Filho MF, Batista EOS, Watanabe YF, Watanabe MR, Dayan A, Joaquim DC, Accorsi MR, Gimenes LU, Vieira LM, Baruselli PS.** Paradoxical effects of bovine somatotropin treatment on the ovarian follicular population and *in vitro* embryo production of lactating buffalo donors submitted to ovum pick-up. *Anim Reprod Sci*, v.154, p.1-7, 2015.
- Gasparrini B, Neglia G, Di Palo R, Campanile G, Zicarelli L.** Effect of cysteamine during *in vitro* maturation on buffalo embryo development. *Theriogenology*, v.54, p.1537-1542, 2000.
- Gasparrini B, Sayoud, H, Neglia G, Matos, DG, Donnay I, Zicarelli L.** Glutathione synthesis during *in vitro* maturation of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes: effects of cysteamine on embryo development. *Theriogenology*, v.60, p. 943-952, 2003.
- Gasparrini B, Neglia G, Di Palo R, Vecchio D, Albergo G, Esposito L, Campanile G, Zicarelli L.** Influence of oocyte donor on *in vitro* embryo production in buffalo. *Anim Reprod Sci*, v.144, p.95-101, 2014
- Gimenes LU.** Taxa de recuperação *in vivo* e competência *in vitro* de óocitos bubalinos, zebuínos e taurinos aspirados em diferentes fases da onda do crescimento folicular. 2010. 122f. Tese de Doutorado - Universidade de São Paulo, Departamento de Reprodução Animal, 2010.
- In vitro Brasil.** Disponível em: <http://invitrobrasil.com.br/fiv-bubalinos.php>
- 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 embryoculture on efficiency of *In Vitro* embryo production in Buffalo. *Reprod Domest Anim*, v.47, p.269-273, 2012.
- Kumar P, Rajput S, Verma A, De S, Datta TK.** Expression pattern of glucose metabolism genes in relation to development rate of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes and *in vitro*-produced embryos. *Theriogenology*, v.80, p.914-922, 2013.
- Kumar P, Verma A, Kumar M, De S, Kumar R, Datta TK.** Expression pattern of glucose metabolism genes correlate with development rate of buffalo oocytes and embryos *in vitro* under low oxygen condition. *J Assist Reprod Genet*, v.32, p.471-478, 2015.
- Manjunatha, B.M., Devaraj, M., Gupta, P.S.P., Ravindra, J.P., Nandi, S. Effect of Taurine and melatonin in the culture medium on buffalo *In vitro* Embryo development. *Reprod. Dom. Anim.*, 44: 12-16, 2009.
- Mondadori RG, Santin TR, Fidelis AAG, Name KPO, Silva JS, Rumpf R, Bao SN.** Ultrastructure of *in vitro* oocyte maturation in buffalo (*Bubalus bubalis*). *Zygote*, v.18, p.309-314, 2010.
- 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*, v.88, p.1-9, 2013.
- Ohashi OM, Miranda MS, Sousa JS, Sousa AJO, Cordeiro MS, Biondi FC.** Produção *in vitro* de embrião bubalino. *Rev Bras Reprod Anim*, v.27, p.103-109, 2003.
- Sá Filho MF, Carvalho NAT, Gimenes LU, Torres-Júnior JR, Nasser LFT, Tonhati H, Garcia JM, Gasparrini B, Zicarelli L, Baruselli PS.** Effect of recombinant bovine somatotropin (bST) on follicular population and on *in vitro* buffalo embryo production. *Anim Reprod Sci*, v.113, p.51-59, 2009.



- Saliba W, Gimenes L, Drumond R, Bayão H, Alvim M, Baruselli P, Bastianetto E, Leite R, Gasparrini B.** Efficiency of OPU-IVEP-ET of fresh and vitrified embryos in buffaloes. *Buffalo Bulletin*, v.32, p385-388, 2013.
- Sartori R, Barros CM.** Reproductive cycles in *Bos indicus* cattle. *Anim Reprod Sci*, v.124, 244-250, 2011.
- Singhal S, Prasad S, Singh B, Prasad JK, Gupta HP.** Effect of including growth factors and antioxidants in maturation medium used for *in vitro* culture of buffalo oocytes recovered *in vivo*. *Anim Reprod Sci*, v.113, p.44-50, 2009.
- Suresh KP, Nandi S, Mondal S.** Factors affecting laboratory production of buffalo embryos: A meta-analysis. *Theriogenology*, v.72, p.978-985, 2009.
- Takahashi Y, Nihayah M, Jainudeen MR, Hishinuma M, Kanai Y, Mori Y, Kanagawa H.** *In vitro* fertilization of follicular oocytes from the swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) and Kedah-Kelantan cattle (*Bos indicus*) in Malaysia. *J Vet Med Sci*, v.54, p.799-801, 1992.
- Thompson JG, Simpson AC, Pugh PA, Tervit HR.** Requirement for glucose during *in vitro* culture of sheep preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev*, v.31, p.253-257, 1992.
-