



A importância dos estudos transcriptômicos de gametas e embriões para o avanço e consolidação da Produção *In Vitro* de Embriões (PIVE) em bubalinos na Amazônia

The importance of the transcriptomic studies of gametes and embryos for the advance and consolidation of In Vitro Production (IVP) in buffaloes in the Amazon

Priscila Di Paula Bessa Santana^{1,‡}, Priscilla do Carmo de Azevedo Ramos², Vanessa Cunha de Brito², Nathália Nogueira da Costa de Almeida², Thiago Velasco Guimarães Silva², Marcela Silva Cordeiro³, Simone do Socorro Damasceno Santos², Otávio Mitio Ohashi², Moysés dos Santos Miranda²

¹Universidade Federal Rural da Amazônia, Capitão-Poço, Belém, PA, Brasil.

²Laboratório de Fertilização *In Vitro*, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brasil.

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

Resumo

A produção de búfalos está se expandindo na Amazônia, sendo assim o uso de biotecnologias reprodutivas em programas de melhoramento genético tornou-se uma estratégia para melhorar a produtividade dos rebanhos sem a necessidade de aumentar as áreas de pastagens. A Produção *In Vitro* de Embriões (PIVE) é uma das biotecnologias disponíveis, a qual é continuamente aperfeiçoada através da pesquisa de novos componentes para os meios de cultivo e da pesquisa de protocolos espécie específicos que resultem em maior número de embriões de boa qualidade. Contudo, a falta de informações sobre os requerimentos metabólicos de gametas e embriões têm dificultado a consolidação de protocolos de PIVE específicos para búfalos. Neste artigo discutimos as abordagens transcriptômicas que estão ajudando a preencher esta falta de informações, as limitações destas abordagens e os tópicos de pesquisa que ainda precisam ser investigados em búfalos.

Palavras-chave: PIVE, búfalos, transcriptomas, RNA-seq.

Abstract

Buffalo production is expanding in the Amazon region therefore the use of reproductive biotechnologies in breeding programs became a strategy to improve the herd productivity without a need for increasing pasture areas. In Vitro Production (IVP) is one of the available biotechnologies, which is continuously being improved through the research of novel components of culture media and the research of specie-specific protocols to obtain an increased number of good quality embryos. However, the lack of information about the metabolic requirements of gametes and embryos have delayed the consolidation of buffalo's IVP specific protocols. Herein, we discussed the transcriptomic approaches that are helping to fill the lack of information, the limitations of these approaches and the research topics that still needs further investigations in buffaloes.

Keywords: IVP, buffaloes, transcriptomes, RNA-seq.

Introdução

É do conhecimento geral que os búfalos são animais rústicos, de fácil adaptação ao terreno e condições climáticas, atualmente habitando em várias partes do planeta. O Brasil é o país com o maior rebanho comercial de búfalos, particularmente concentrado na região da Amazônia legal. Por isso, hoje se busca cada vez mais realizar a seleção e melhoramento genético da espécie (Marcondes, 2011). No contexto dos programas de melhoramento genético, as biotecnologias reprodutivas são muito importantes, pois são ferramentas que auxiliam na multiplicação de animais com características genéticas desejáveis (Baruselli et al., 2013). Logo, desenvolver e aprimorar as biotecnologias para a espécie bubalina tem se tornado uma área de pesquisa muito prolifera.

Das biotecnologias reprodutivas, a produção *in vitro* de embrião (PIVE) tem se mostrado promissora para a multiplicação de rebanhos bubalinos (Galli et al., 2014), porém apresenta limitações relacionadas a qualidade dos gametas e embriões produzidos. Para mudar esse panorama é essencial conhecer o funcionamento dos gametas e embriões dessa espécie. A perspectiva atual é que estes avanços sejam alcançados gradativamente através das análises de transcriptomas, a exemplo dos avanços realizados em espécies domésticas relacionadas como os bovinos (Jiang et al., 2014; Kropp e Khatib, 2015; Gilchrist et al., 2016; Macaulay et al., 2016; Milazzotto et al., 2016). A seguir, revisaremos a bubalinocultura na Amazônia, os avanços alcançados na PIVE de búfalos e, por fim, as perspectivas futuras para o desenvolvimento desta biotecnologia na espécie.

[‡]Correspondência: ppbsantana@gmail.com

Recebido: 19 de setembro de 2018

Aceito: 18 de janeiro de 2019



A importância da bubalinocultura na Amazônia

A Amazônia é considerada um dos grandes patrimônios da humanidade, pois concentra grande biodiversidade de espécies vegetais, animais e formas de vida microscópicas. No entanto, este patrimônio está constantemente ameaçado pela implantação de grandes projetos governamentais e pela expansão da indústria madeireira e agropecuária. Por causa disso, existe grande discussão sobre políticas de desenvolvimento sustentável na Amazônia como uma forma de equilibrar a constante ameaça a biodiversidade e a necessidade de desenvolvimento econômico e social que a indústria e os grandes projetos representam (ICMBio, 2017).

A região da Amazônia legal, por deter 74,3% (704.758) do efetivo nacional de bubalinos (948.103), tem um papel importante na produção de búfalos (CensoAgro, IBGE, 2017). No entanto, o búfalo na Amazônia pode ser visto sob dois pontos de vista. O ponto de vista majoritariamente econômico, do criador com fazendas de médio e grande porte para o qual há o interesse zootécnico de multiplicar os rebanhos e aumentar sua produtividade, e o ponto de vista social, do caboclo ribeirinho dependente, muitas vezes, exclusivamente da agricultura familiar para obtenção de alimento, para quem o búfalo é a fonte de proteína animal, pois é um animal de excelente adaptação às condições de floresta (Pereira et al., 2007; Lourenço Jr e Garcia, 2008).

Em vista da importância econômica e social do búfalo na Amazônia, existe a necessidade de inserir a criação do búfalo dentro de estratégias de desenvolvimento sustentável para a Amazônia. Uma forma de viabilizar a expansão dos rebanhos de forma sustentável é o emprego de biotecnologias da reprodução com capacidade de multiplicar a produtividade dos rebanhos sem, necessariamente, aumentar as áreas de pastagens, diminuindo as áreas de desmatamento e ao mesmo tempo tornando a região mais competitiva junto à pecuária nacional e internacional.

Dentre as biotecnologias aplicadas à reprodução de bubalinos, podemos citar a inseminação artificial (IA), a superovulação com transferência de embriões (MOET) e a produção *in vitro* de embriões (PIVE), sendo que, atualmente, a PIVE é considerada a mais promissora para aumentar a eficiência reprodutiva de búfalos (Galli et al., 2014). Todas essas biotecnologias enfrentam limitações diferentes, mas todas compartilham da necessidade de aprimorar os protocolos para a espécie bubalina, o que requer o conhecimento prévio da fisiologia do animal e do comportamento dos gametas e embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* (Ohashi et al., 2006, Gasparrini et al., 2014).

Avanços e perspectivas na PIVE em bubalinos

A PIVE tem o principal objetivo de promover a multiplicação mais rápida de genótipos zootecnicamente superiores com maior produtividade, pois a cada vez que é realizada pode resultar na produção de 50 a 100 embriões/fêmea/ano e no nascimento de 25 a 50 bezerros/vaca/ano, se considerarmos taxa de prenhez de 50% (Varago et al., 2008), sendo assim encurta o tempo de geração nos rebanhos (Figura 1). No Brasil, é a biotécnica mais empregada para acelerar a reprodução de espécies domésticas com interesse zootécnico (Viana et al., 2010). Em bovinos, é considerada consolidada, enquanto que em búfalos ainda se apresenta como uma alternativa promissora para melhorar a produção dos rebanhos (Varago et al., 2008; Galli et al., 2014).

Sendo duas espécies relacionadas, os protocolos de PIVE em bubalinos são em grande parte baseados nos protocolos desenvolvidos para bovinos (Neglia et al., 2003; Di Francesco et al., 2011, 2012; Ohashi *et al.*, 2017). Estes protocolos proporcionam, em bovinos, taxas de blastocisto de 42 a 58% (Costa et al., 2013; Santana et al., 2014a; Santana et al., 2014b; Santana et al., 2016). Em bubalinos, contudo, as taxas variam de 13 a 38% (Singhal et al., 2009; Suresh et al., 2009; Di Francesco et al., 2011; Elamaran et al., 2012; Kumar et al., 2012; Gasparrini et al., 2014; Ferraz et al., 2015; Ohashi et al., 2017). Para comparação, a Tabela 1 demonstra as taxas de blastocisto como medida de eficiência da PIVE, nas duas espécies.

A baixa eficiência na PIVE em bubalinos tem sido relacionada, entre outros fatores, à baixa quantidade e qualidade dos oócitos obtidos e dos embriões produzidos *in vitro* indicando a necessidade de aprimorar tais etapas (Ohashi et al., 2017). Uma das medidas adotadas têm sido a elaboração de meios de cultivo específicos para as demandas de maturação oocitária, capacitação espermática e cultivo *in vitro* dos embriões bubalinos (Ohashi et al., 2006; Suresh et al., 2009). Por isso, em búfalos, continuam as investigações de novos componentes para os meios de cultivo *in vitro* tendo em vista aperfeiçoar cada etapa da PIVE nesta espécie (Figura 2).

Aprimorar os meios de cultivo não tem alcançado tanto sucesso, pois as demandas metabólicas específicas dos gametas e embriões bubalinos são ainda desconhecidas, embora estudos de expressão gênica indiquem sua existência (Kandil et al., 2010; Abdoon et al., 2012; Kumar et al., 2013). Na maturação oocitária de búfalos, meio suplementado com os hormônios eCG, hCG e estradiol por período de incubação de 23 a 25 horas resultou em taxa de maturação nuclear de 90,9% (Santos et al., 2002). Posteriormente, a adição de fatores de crescimento IGF, EGF e antioxidante cisteamina não aumentou a taxa de maturação (90,4%), porém aumentou a taxa de blastocistos obtidos em cerca de 19,8% (33% *versus* 13% do grupo controle; taxas calculadas em relação ao número total de oócitos) (Singhal et al., 2009). Contudo, estudos mais recentes não obtiveram taxas de maturação nuclear semelhantes aos estudos anteriores, ao testar a adição de melatonina 250 μ M (69,7%) e L-carnitina 2,5 mM (72,9%) na MIV de búfalos (Nagina et al., 2016; Xu et al., 2018).

Segundo Kumar et al. (2012; 2013), uma alta concentração de glicose de 5,6 mM durante todas as etapas da PIVE proporcionou taxa de blastocisto de 21,7% em búfalos, o que não foi superior à média mundial de 22%

reportada por Suresh et al. (2009). Já a cisteamina adicionada a MIV e CIV de búfalos rendeu taxa de 25%, aumento de 6% comparado ao grupo controle (Elamaran et al., 2012). Portanto, observa-se que gradativamente novos suplementos são testados nos meios de cultivo e ocasionalmente, resultam em melhores taxas de desenvolvimento embrionário, como parece ser o caso dos fatores de crescimento, hormônios e antioxidantes citados. Contudo, os efeitos das suplementações sobre os aspectos moleculares da qualidade embrionária são desconhecidos pois, no caso de búfalos, não há estudos sobre o perfil de expressão global de gametas e embriões *in vivo*.

Neste contexto, estudos para compreender os aspectos moleculares do metabolismo dos gametas e embriões bubalinos seriam muito úteis para incrementar a eficiência da PIVE na espécie. Por isso, os transcriptomas de gametas, embriões e células da granulosa de bubalinos podem ser uma abordagem promissora, pois têm sido amplamente empregados em outras espécies como os bovinos (Graf et al., 2014; Kropp and Khatib, 2015; Gilchrist et al., 2016; Mazzoni et al., 2017).

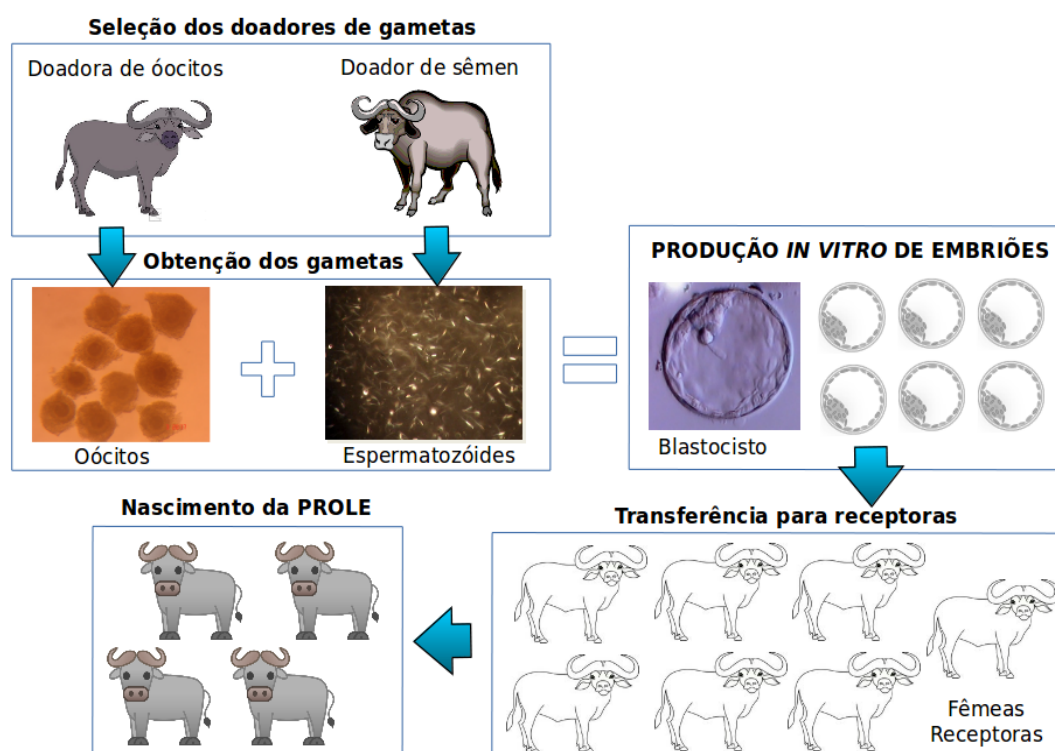


Figura 1. Uso da PIVE para a multiplicação mais rápida de genótipos zootecnicamente superiores. A seleção dos progenitores é realizada com base em suas características genéticas, como por exemplo, maior produtividade de carne ou leite. Os gametas são obtidos e utilizados para a produção *in vitro* de embriões, gerando blastocistos que podem ser transferidos para fêmeas receptoras. Como resultado ocorre o nascimento de prole com características genéticas selecionadas.

Tabela 1. Comparação das taxas de blastocisto em bovinos e bubalinos.

| Referências | Espécie | Taxa de Blastocisto* | Desvio Padrão |
|---------------------------|-----------|----------------------|---------------|
| Costa et al., 2013 | Bovinos | 42.4 | 9.9 |
| Santana et al., 2014b | | 50.8 | 4.1 |
| Santana et al., 2014a | | 49.4 | 4.8 |
| Santana et al., 2016 | | 58.8 | 2.5 |
| Singhal et al., 2009 | Bubalinos | 13.5 | - |
| Suresh et al., 2009 | | 22.1 | 2.1 |
| Di Francesco et al., 2011 | | 22.6 | 5.4 |
| Elamaran et al., 2012 | | 18.7 | - |
| Kumar et al., 2012 | | 15.4 | 2.2 |
| Gasparrini et al., 2014 | | 16.7 | 8.6 |
| Ferraz et al., 2015 | | 18.9 | 10.9 |
| Ohashi et al., 2017 | | 38.6 | 18.1 |

*Taxas de blastocisto dos grupos controle. Calculadas com base no número total de óocitos.

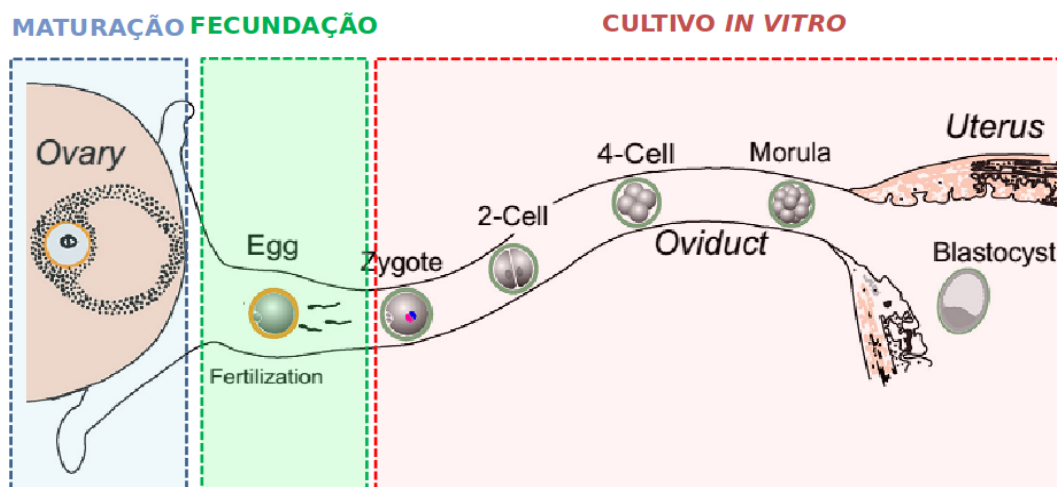


Figura 2. Etapas da PIVE. Cada etapa mimetiza as condições do ambiente *in vivo* correspondente. A maturação *in vitro* (MIV), fecundação *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV) tentam reproduzir as condições do folículo ovariano, da tuba uterina e endométrio, respectivamente.

O estudo dos transcriptomas em gametas e embriões de búfalos

O conjunto de transcritos, ou transcriptoma, pode gerar informações sobre o metabolismo e funcionamento celular e podem ser gerados pelo uso de tecnologias de hibridização (microarranjos) e de Sequenciamento de Próxima Geração de RNA, RNA-seq (Wang et al., 2009). Recentemente, o genoma do búfalo (*Bubalus bubalis*) foi sequenciado (Williams et al., 2017), entretanto não há, até o momento, um microarranjo específico para os embriões. Desta forma, microarranjos construídos para bovinos são usados para analisar o perfil de expressão gênica de oócitos e embriões de búfalo (Kandil et al., 2010; Strazzullo et al., 2014). Esta técnica é chamada de hibridização heteróloga, pois as sondas que compõe o chip são desenhadas com base no genoma de uma espécie estreitamente relacionada. Embora seja uma alternativa válida, a hibridização heteróloga tem limitações importantes pois deixa de detectar transcritos raros e novas variantes gênicas (Pariset et al., 2009).

Comparado à tecnologia de microarranjo, o RNA-seq apresenta vantagens como a detecção de genes pouco expressos e detecção de novas variantes genéticas (Huang e Khatib, 2010; Dyck et al., 2014). Portanto, o RNA-seq pode ser empregado para catalogar mRNAs e RNAs não codificantes, inferir eventos de splicing alternativo, identificar novos genes, analisar a expressão diferencial e para estudos de redes de co-expressão (Han et al., 2015). Particularmente na área da reprodução em animais domésticos, o principal uso de RNA-seq tem sido analisar a expressão diferencial em oócitos e embriões, a fim de investigar aspectos moleculares dos eventos de maturação oocitária (Kropp et al., 2014; Reyes et al., 2015; Gilchrist et al., 2016; Macaulay et al., 2016) e desenvolvimento embrionário pré-implantacional (Driver et al., 2012; Chitwood et al., 2013; Xue et al., 2013; Graf et al., 2014; Kropp e Khatib, 2015; Milazzotto et al., 2016).

Contudo, até o momento, não há publicações sobre o RNA-seq de gametas e embriões de búfalo para investigar os aspectos moleculares e requerimentos metabólicos durante a maturação oocitária e desenvolvimento embrionário nesta espécie. Além disso, há poucos estudos sobre o transcriptoma de gametas e embriões pré-implantacionais, sendo que todos utilizaram a técnica de microarranjo heterólogo (Kandil et al., 2010; Abdoon et al., 2012; Strazzullo et al., 2014). Kandil et al. (2010) compararam a expressão diferencial de oócitos imaturos *versus* maturados *in vitro* de búfalo e detectou 104 transcritos expressos diferencialmente. Em bovinos, o RNA-seq identificou 2.455 genes diferencialmente expressos em oócitos imaturos comparados com os maturados *in vitro* (Reyes et al., 2015). Esta enorme diferença entre os estudos é possivelmente relacionada as técnicas utilizadas, visto que bovinos e bubalinos apresentaram números similares de genes codificadores de proteínas em seus genomas (19.994 e 21.711, respectivamente).

Os demais estudos em búfalos, usando microarranjo heterólogo, foram realizados por Abdoon et al. (2012) comparando embriões produzidos *in vitro* e embriões partenogenéticos, enquanto que Strazzullo et al. (2014) compararam embriões com 25 dias de desenvolvimento de crescimento lento e rápido. Portanto, a literatura carece de estudos mais precisos sobre os perfis transcriptômicos de gametas e embriões bubalinos produzidos *in vivo* e *in vitro* de búfalos que possam embasar o conhecimento sobre os aspectos metabólicos particulares desta espécie.

Usando RNA-seq, os transcriptomas de várias espécies de procariotos e eucariotos têm sido sequenciados, pois esta abordagem gera grande quantidade de informação e permite a quantificação de transcritos de alta qualidade (Scholz et al., 2012). Por outro lado, o fato do RNA-seq gerar uma grande quantidade de dados pode ser visto

também como uma desvantagem pois aumenta o tempo e esforço na análise de dados, fazendo com que o microarranjo continue sendo uma alternativa muito útil para estudos de quantificação da expressão gênica global.

Por meio dos processos ilustrados na figura 3 é possível analisar milhões de sequências (*reads*) geradas pelo RNA-seq e que podem ser feitos com o uso de diversas ferramentas de bioinformática disponíveis (Steijger et al., 2013). As principais etapas de processamento do RNA-seq, tendo como objetivo a análise de expressão diferencial são: 1) filtrar as *reads* com boa qualidade, 2) alinhar com o genoma de referência (abordagem de montagem com referência), 3) a contagem de *reads* alinhadas com transcritos, 4) conversão para valores relativos de expressão, 5) quantificação da expressão diferencial e 6) etapa de ontologia gênica (Conesa et al., 2016).

Em outras palavras, usando RNA-seq a expressão gênica pode ser mensurada através da quantidade de *reads* que mapeiam em uma dada região gênica. Em seguida, são usados métodos estatísticos para normalizar os níveis de expressão relativa considerando o tamanho do gene (medido em kilobases), o tamanho da biblioteca sequenciada (medido em milhões) (Mortazavi et al., 2008), ou o tamanho e composição da biblioteca (Anders e Huber, 2010; Love et al., 2014). A última etapa do processamento atribui funções biológicas aos transcritos e é chamada de ontologia gênica. Todas estas etapas de processamento tornam a análise dos dados de RNA-seq mais trabalhosa comparada ao microarranjo, por outro lado com maior precisão para quantificar transcritos.

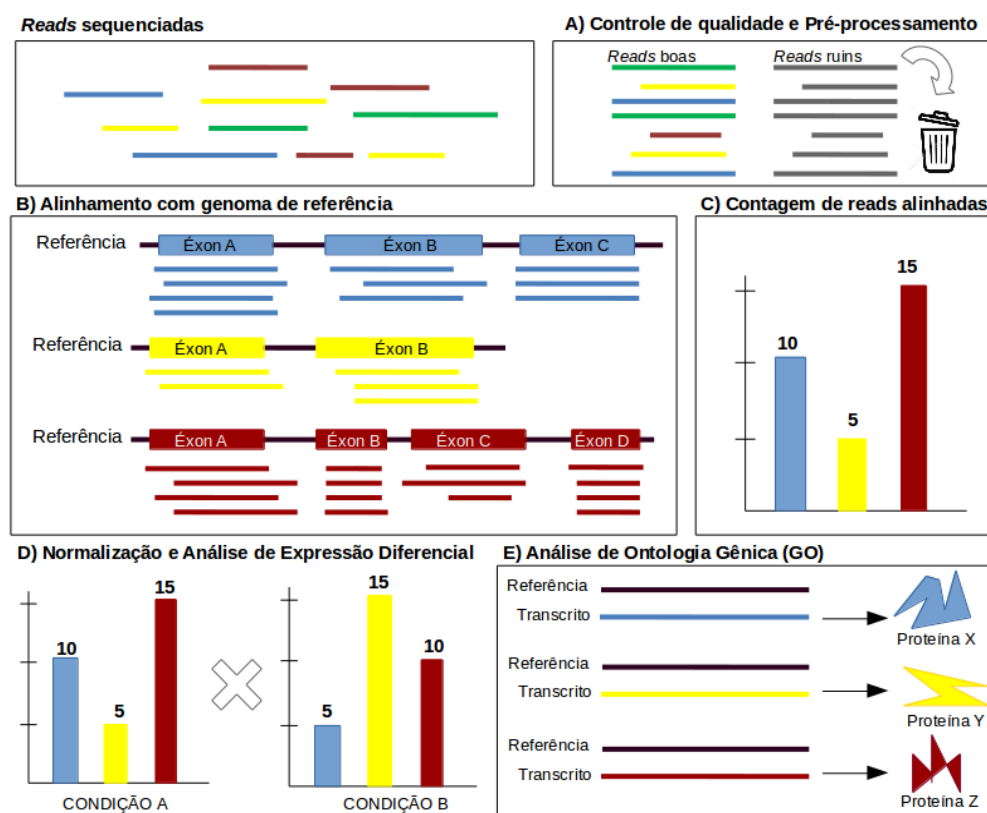


Figura 3. As principais etapas de processamento de RNA-seq para análise da expressão diferencial. A primeira etapa é filtrar as *reads* com boa qualidade (A), em seguida, é realizado o alinhamento com o genoma de referência (B), a contagem de *reads* alinhadas com transcritos na referência (C), a normalização dos dados de expressão gênica e quantificação da expressão diferencial (D) e, por fim, a última etapa que consiste na análise de ontologia gênica (E).

Considerações finais

Dada a importância dos búfalos para o Brasil e Amazônia, ainda há muito para avançar no sentido de melhorar a eficiência das biotecnologias da reprodução para esta espécie. Por isso, ainda há um grande campo de atuação para os pesquisadores motivados em trabalhar com búfalos, sobretudo, no que trata sobre os aspectos moleculares dos gametas e embriões pré-implantacionais, que favoreceria sobremaneira a aquisição de conhecimento para o aprimoramento de biotecnologias da reprodução e, particularmente, da PIVE. A exemplo dos avanços que foram feitos em outras espécies domésticas como os bovinos, vários estudos ainda necessitam ser conduzidos em búfalos como a geração do RNA-seq de gametas e embriões bubalinos produzidos *in vivo* e *in vitro*, o transcriptoma de células da granulosa e da tuba uterina de búfalos, estudos funcionais para investigar marcadores de qualidade oocitária e embrionária e estudos de RNAs não codificantes.



Referências

- Abdoon AS, Ghanem N, Kandil OM, Gad A, Schellander K, Tesfaye D.** cDNA microarray analysis of gene expression in parthenotes and in vitro produced buffalo embryos. *Theriogenology*, v.77, p.1240-1251, 2012.
- Anders S, Huber W.** Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biology*, v.11, p.R106, 2010.
- Baruselli PS, Soares JG, Gimenes LU, Monteiro BM, Olazarri MJ, Carvalho NAT.** Control of Buffalo Follicular Dynamics for Artificial Insemination, Superovulation and In Vitro Embryo Production. *Buffalo Bulletin*. Bangkok: Int Buffalo Information Ctr, v. 32, p. 160-176, 2013. Disponível em <http://hdl.handle.net/11449/113083>. Acesso em 26 de setembro, 2018.
- Censo Agropecuário.** Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, IBGE 2017. Disponível em https://censoagro2017.ibge.gov.br/templates/censo_agro/resultadosagro/pecuaria.html?localidade=0&tema=75659. Acesso em 16 set. 2018.
- Chitwood JL, Rincon G, Kaiser GG, Medrano JF, Ross PJ.** RNA-seq analysis of single bovine blastocysts. *BMC Genomics*, v.14, p.350, 2013.
- Conesa A, Madrigal P, Tarazona S, Gomez-Cabrero D, Cervera A, McPherson A, Szcześniak MW, Gaffney DJ, Elo LL, Zhang X, Mortazavi A.** A survey of best practices for RNA-seq data analysis. *Genome Biology*, v.17, p.13, 2016.
- Costa NN, Cordeiro MS, Silva TV, Sastre D, Santana PP, Sá AL, Sampaio RV, Santos SS, Adona PR, Miranda MS, Ohashi OM.** Effect of triiodothyronine on developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology*, v.80, p.295-301, 2013.
- Driver AM, Penagaricano F, Huang W, Ahmad KR, Hackbart KS, Witbank MC, Khatib H.** RNA-Seq analysis uncovers transcriptomic variations between morphologically similar in vivo- and in vitro-derived bovine blastocysts. *BMC Genomics*, v.13, p.118, 2012.
- Dyck MK, Zhou C, Tsoi S, Grant J, Dixon WT, Foxcroft GR.** Reproductive technologies and the porcine embryonic transcriptome. *Animal Reproduction Science*, v.149, p.11-18, 2014.
- Elamaram G, Singh KP, Singh MK, Singla SK, Chauhan MS, Manik RS, Palta P.** Oxygen Concentration and Cysteamine Supplementation During In vitro Production of Buffalo (*Bubalus bubalis*) Embryos Affect mRNA Expression of BCL-2, BCL-XL, MCL-1, BAX and BID. *Reproduction in Domestic Animals*, v.47, p.1027-1036, 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 pickup. *Anim Reprod Sci*, v.154, p.1-7, 2015.
- Di Francesco S, Boccia L, Campanile G, Di Palo R, Vecchio D, Neglia G, Zicarelli L, Gasparrini B.** The effect of season on oocyte quality and developmental competence in Italian Mediterranean buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Animal Reproduction Science*, v.123, p.48-53, 2011.
- Di Francesco S, Novoa MVS, Vecchio D, Neglia G, Boccia L, Campanile G, Zicarelli L, Gasparrini B.** Ovum pick-up and in vitro embryo production (OPU-IVEP) in Mediterranean Italian buffalo performed in different seasons. *Theriogenology*, v.77, p.148-154, 2012.
- Galli C, Duchi R, Colleoni S, Lagutina I, Lazzari G.** Ovum pick up, intracytoplasmic sperm injection and somatic cell nuclear transfer in cattle, buffalo and horses: from the research laboratory to clinical practice. *Theriogenology*, v.81, p.138-151, 2014.
- Gasparrini B, Neglia G, Di Palo R, Vecchio D, Albero G, Esposito L, Campanile G, Zicarelli L.** Influence of oocyte donor on in vitro embryo production in buffalo. *Animal Reproduction Science*, v.144, p.95-101, 2014.
- Gilchrist GC, Tscherner A, Nalpathamkalam T, Merico D, LaMarre J.** MicroRNA Expression during Bovine Oocyte Maturation and Fertilization. *International Journal of Molecular Sciences*, v.17, p.396, 2016.
- Graf A, Krebs S, Zakhartchenko V, Schwalb B, Blum H, Wolf E.** Fine mapping of genome activation in bovine embryos by RNA sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.111, p.1-6, 2014.
- Han Y, Gao S, Muegge K, Zhang W, Zhou B.** Advanced Applications of RNA Sequencing and Challenges. *Bioinformatics and Biology Insights*, v.9, p.29-46, 2015.
- Huang W, Khatib H.** Comparison of transcriptomic landscapes of bovine embryos using RNA-Seq. *BMC Genomics*, v.11, p.711, 2010.
- ICMBio.** Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, Relatório de Gestão Exercício 2017. Disponível em <http://www.icmbio.gov.br/acesoainformacao/relatorios-de-gestao.html>. Acesso em 19 set. 2018.
- Jiang Z, Sun J, Dong H, Luo O, Zheng X, Obergfell C, Tang Y, Bi J, O'Neill R, Ruan Y, Chen J, Tian XC.** Transcriptional profiles of bovine in vivo pre-implantation development. *BMC Genomics*, v.15, p.756, 2014.
- Kandil OM, Ghanem N, Abdoon a SS, Hölker M, Phatsara C, Schellander K, Tesfaye D.** Transcriptional analysis of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes during in vitro maturation using bovine cDNA microarray. *Reproduction in Domestic Animals*, v.45, p.63-74, 2010.



- Kropp J, Khatib H.** mRNA fragments in in vitro culture media are associated with bovine preimplantation embryonic development. *Frontiers in Genetics*, v.6, p.273, 2015.
- Kropp J, Salih SM, Khatib H.** Expression of microRNAs in bovine and human pre-implantation embryo culture media. *Frontiers in Genetics*, v.5, p.91, 2014.
- Kumar P, Verma A, Roy B, Rajput S, Ojha S, Anand S, Yadav P, Arora J, De S, Goswami SL Datta TK.** Effect of Varying Glucose Concentrations during In Vitro Maturation and Embryo Culture on Efficiency of In Vitro Embryo Production in Buffalo. *Reproduction in Domestic Animals*, 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 invitro-produced embryos. *Theriogenology*, v.80, p.914-922, 2013.
- Lourenço Júnior JB, Garcia AR.** Panorama da bubalinocultura na Amazônia, 2008. Disponível em http://www.cienciaanimal.ufpa.br/CA_selecao/M/2012/biblio. Acesso em 20 set. 2018.
- Love MI, Huber W, Anders S.** Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, v.15, p.550, 2014.
- Macaulay AD, Gilbert I, Scantland S, Fournier E, Ashkar F, Bastien A, Saadi HAS, Gagné D, Sirard M-A, Khandjian ÉW, Richard FJ, Hyttel P, Robert C.** Cumulus Cell Transcripts Transit to the Bovine Oocyte in Preparation for Maturation. *Biology of Reproduction*, v.94, p.16, 2016.
- Marcondes, CR.** Melhoramento de búfalos no Brasil: avanços, entraves e perspectivas. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.40, p.307-315, 2011.
- Mazzoni G, Salleh SM, Freude K, Pedersen HS, Stroebech L, Callesen H, Hyttel P, Kadarmideen HN.** Identification of potential biomarkers in donor cows for in vitro embryo production by granulosa cell transcriptomics. *PLOS ONE*, v.12, p.e0175464, 2017.
- Milazzotto MP, Goissis MD, Chitwood JL, Annes K, Soares CA, Ispada J, Assumpção MEOÁ, Ross PJ.** Early cleavages influence the molecular and the metabolic pattern of individually cultured bovine blastocysts. *Molecular Reproduction and Development*, v.83, p.324-336, 2016.
- Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L, Wold B.** Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Meth*, v.5, p.621-628, 2008.
- Nagina G, Asima A, Nemat U, Shamim A.** Effect of melatonin on maturation capacity and fertilization of Nili-Ravi buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes. *Open Veterinary Journal*, v.6, p.128-134, 2016.
- Neglia G, Gasparrini B, Caracciolo Di Brienza 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.
- Ohashi OM, Cordeiro MS, Miranda MS.** Biotecnologia da reprodução aplicada a bubalino. Disponível em <https://www.scribd.com/document/80761912/Biotecnologia-da-reproducao-aplicada-a-bubalino>. Rev Ciên Agrárias, 45. 2006.
- Ohashi OM, Costa NN, Cordeiro MS, Santos SSD, Silva TVG, Miranda MS, Rolim Filho ST.** Produção in vitro de embrião (PIVE) na espécie bubalina. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.41, p.195-200, 2017.
- Pariset L, Chillemi G, Bongiorno S, Romano Spica V, Valentini A.** Microarrays and high-throughput transcriptomic analysis in species with incomplete availability of genomic sequences. *N Biotechnol*, v.25, p.272-279, 2009.
- Pereira RGA, Costa NL, Toussend CR, Magalhães JA, Marcolan AL, Salman AKD.** Produção de leite e trabalho de búfalos em propriedades familiares em Rondônia. In: Seminário de pesquisa e extensão rural, 2007, Porto Velho. Disponível em <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/349518/producao-de-leite-e-trabalho-de-bufalos-em-propriedades-familiares-em-rondonia>. Acesso em 20 set. 2018.
- Reyes JM, Chitwood JL, Ross PJ.** RNA-Seq profiling of single bovine oocyte transcript abundance and its modulation by cytoplasmic polyadenylation. *Molecular Reproduction and Development*, v.82, p.103-114, 2015.
- Santana PPB, Silva TVG, Costa NN, SILVA BB, Carter TF, Cordeiro MS, Silva BJM, Santos SSD, Herculano AM, Adona PR, Ohashi OM, Miranda MDS.** Supplementation of bovine embryo culture medium with L - arginine improves embryo quality via nitric oxide production. *Mol. Reprod. Dev.*, v.81, p.918-927, 2014a.
- Santana PPB, Carvalho CMF, Costa NN, Silva TVG, Ramos PCA, Cordeiro MS, Santos SSD, Khayat AS, Ohashi OM, Miranda MS.** Effect of dexamethasone on development of in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology*, v.82, p.1-7, 2014b.
- Santana PPB, Silva BB, Silva TVG, Costa NN, Cordeiro MS, Santos SSD, Ohashi OM, Miranda MS.** Addition of L-arginine to the fertilization medium enhances subsequent bovine embryo development rates. *Theriogenology*, v.85, p.1132-1138, 2016.
- Santos S do SD, Dantas JK, Miranda M dos S, Biondi FC, Ohashi OM.** Cinética da maturação nuclear in vitro de oócitos bubalinos. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.39, p.266-270, 2002.
- Scholz MB, Lo CC, Chain PSG.** Next generation sequencing and bioinformatic bottlenecks: The current state of metagenomic data analysis. *Current Opinion in Biotechnology*, v.23, p.9-15, 2012.
- 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.

Steijger T, Abril JF, Engstrom PG, Kokocinski F, Consortium TR, Hubbard TJ, Guigo R, Harrow J, Bertone P. Assessment of transcript reconstruction methods for RNA-seq. *Nat Meth*, v.10, p.1177-1184, 2013.

Strazzullo M, Gasparrini B, Neglia G, Balestrieri ML, Francioso R, Rossetti C, Nassa G, De Filippo MR, Weisz A, Di Francesco S, Vecchio D, D'Esposito M, D'Occhio MJ, Zicarelli L, Campanile G. Global transcriptome profiles of italian mediterranean buffalo embryos with normal and retarded growth. *PLoS ONE*, v.9, p.1-9, 2014.

Suresh KP, Nandi S, Mondal S. Factors affecting laboratory production of buffalo embryos: a meta-analysis. *Theriogenology*, v.72, p.978-85, 2009.

Varago FC, Mendonça LF, Lagares MA. Produção *in vitro* de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.32, p.100-109, 2008.

Viana JHM, Siqueira LGB, Palhão MP, Camargo LSA. Use of *in vitro* Fertilization Technique in the Last Decade and its Effect on Brazilian Embryo Industry and Animal Production. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.38, p.661-674, 2010.

Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*, v.10, p.57-63, 2009.

Williams JL, Iamartino D, Pruitt KD, Sonstegard T, Smith TPL, Low WY, Biagini T, Bomba L, Capomaccio S, Castiglioni B, Coletta A, Corrado F, Ferré F, Iannuzzi L, Lawley C, Macciotta N, McClure M, Mancini G, Matassino D, Mazza R, Milanese M, Moioli B, Morandi N, Ramunno L, Peretti V, Pilla F, Ramelli P, Schroeder S, Strozzi F, Thibaud-Nissen F, Zicarelli L, Ajmone-Marsan P, Valentini A, Chillemi G, Zimin A. Genome assembly and transcriptome resource for river buffalo, *Bubalus bubalis* (2n = 50). *GigaScience*, v.6, p.1-6, 2017.

Xu H-Y, Yang X-G, Lu S-S, Liang X-W, Lu Y-Q, Zhang M, Lu K-H. Treatment with acetyl-l-carnitine during *in vitro* maturation of buffalo oocytes improves oocyte quality and subsequent embryonic development. *Theriogenology*, v.118, p.80-89, 2018.

Xue Z, Huang K, Cai C, Cai L, Jiang C, Feng Y, Liu Z, Zeng Q, Cheng L, Sun YE, Liu J, Horvath S, Fan G. Genetic programs in human and mouse early embryos revealed by single-cell RNA sequencing. *Nature*, v.500, p.593-597, 2013.