

Sansiñena, M. ; Gasparrini B.

Producción in vitro de embriones en el búfalo

Colaboración en la obra:

Reproducción en búfalas / Crudeli, Gustavo; Konrad, José Luis; Patiño, Exequiel María. Buenos Aires : Moglia Ediciones, 2016. ISBN: 978-987-619-264-4

Este documento está disponible en la Biblioteca Digital de la Universidad Católica Argentina, repositorio institucional desarrollado por la Biblioteca Central "San Benito Abad". Su objetivo es difundir y preservar la producción intelectual de la Institución.

La Biblioteca posee la autorización del autor para su divulgación en línea.

Cómo citar el documento:

Sansiñena, M. Gasparrini, B Producción in vitro de embriones en el búfalo [en línea]. En: Reproducción en búfalas / Crudeli, Gustavo; Konrad, José Luis; Patiño, Exequiel María. Buenos Aires : Moglia Ediciones, 2016. ISBN 978-987-619-264-4 Disponible en: <http://bibliotecadigital.uca.edu.ar/greenstone/cgi-bin/library.cgi?a=d&c=investigacion&d=produccion-in-vitro-embriones-bufalo> [Fecha de consulta:]

PRODUCCION *IN VITRO* DE EMBRIONES EN EL BÚFALO

M. Sansinena^{1,2,*} and B. Gasparrini³

¹Facultad de Ciencias Agrarias, Pontificia Universidad Católica Argentina, Cap. Gral. Ramón Freire 183, CABA 1426, Argentina;

²Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Godoy Cruz 2290, CABA 1425, Argentina;

³Facultad de Medicina Veterinaria, “Universidad Federico II”, Nápoles, Italia.

*Correspondencia: msansinena@uca.edu.ar

INTRODUCCIÓN

La fecundación *in vitro* de ovocitos en especies mamíferas ha sido y es un área de gran interés científica y de aplicaciones productivas. La técnica de fecundación *in vitro* fue utilizada por primera vez por Chang y col. (1959) en la producción de conejos. Un hito en el desarrollo de ésta biotécnica fue marcado por el primer nacimiento de un bebé humano en Inglaterra (Stephoe and Edwards, 1978). La primera especie doméstica de interés zootécnico nacida por fecundación *in vitro* fue el bovino, un ternero macho reportado por Brackett y col. en 1982.

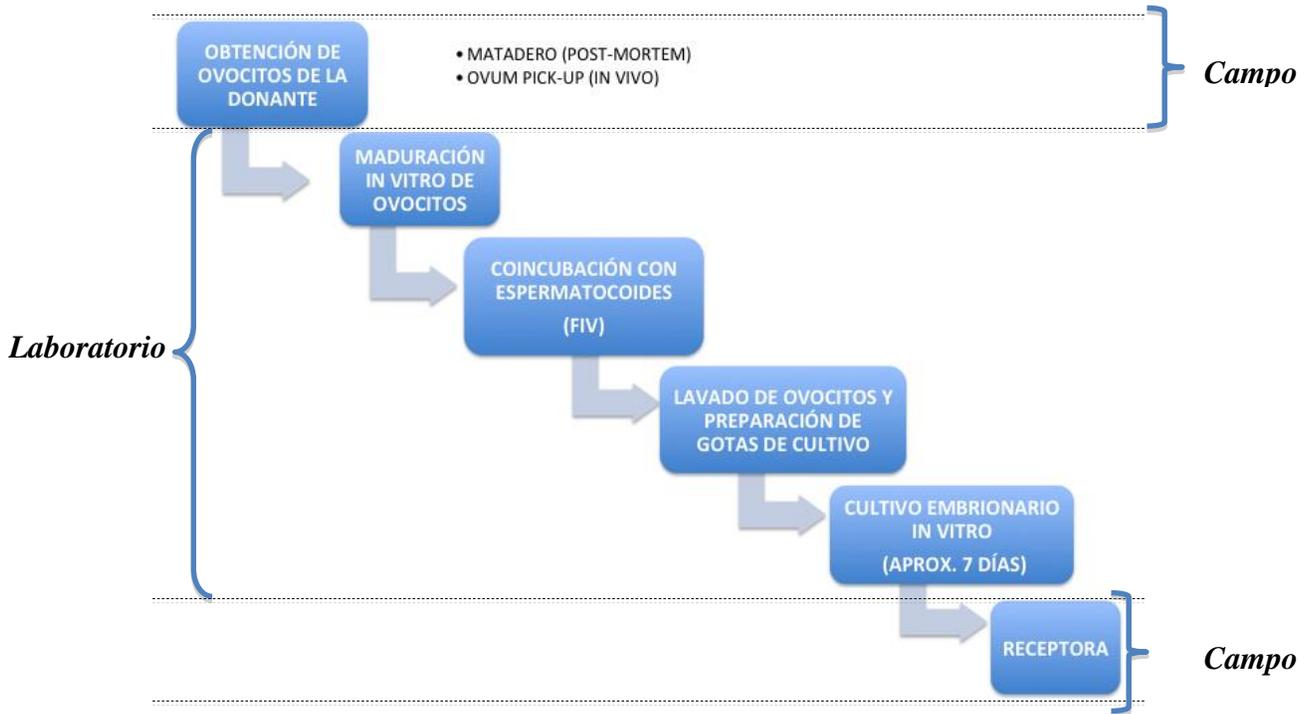
En la última década, el interés en la producción bubalina ha aumentado exponencialmente, debido al rol fundamental que esta especie tiene en aquellos sistemas productivos con limitaciones climáticas. El éxito reproductivo del búfalo depende en gran medida del progreso genético que pueda lograrse, principalmente mediante la aplicación de biotecnologías de la reproducción asistida. En este sentido, la contribución al progreso genético de la hembra se halla seriamente limitada en el búfalo, debido a las respuestas inconsistentes en los programas de Ovulaciones Múltiples – Transferencia Embrionaria (multiple ovulation and embryo transfer, MOET) (Ziacrelli et al., 1997). Esta limitación ha determinado que exista un gran interés mundial en el desarrollo de procedimientos de producción *in vitro* de embriones. La combinación de las técnicas de Ovum Pick Up (OPU) con la producción *in vitro* de embriones es actualmente una de las herramientas más prometedoras para aumentar el número de embriones transferibles por donante.

FECUNDACIÓN *IN VITRO* (FIV) Y PRODUCCION *IN VITRO* DE EMBRIONES (PIVE)

En búfalos, el primer reporte de un ternero nacido por la técnica de fecundación *in vitro* (FIV) fue producido en 1991 (Madan et al., 1991). En esta especie, la tecnología de FIV está demostrando ser una interesante alternativa a los programas de MOET. La selección de la donante en relación a la cantidad de embriones *in vitro* transferibles parece ser una importante herramienta que permitiría alcanzar ambiciosos resultados. En 2002, Gasparrini et al. informaron una producción de 37 embriones transferibles en el término de 6 meses a partir de una única donante; esto indicaría que la selección de la donante podría realizarse en función de su potencial de foliculogénesis. Adicionalmente, es importante destacar que, a diferencia de la MOET, la recuperación de ovocitos para FIV por OPU puede realizarse en otras categorías tales como animales en anestro, preñados, con patologías oviductales y/o uterinas y en aquellos animales refractarios a la estimulación hormonal. Mas recientemente, seis terneros nacieron luego de la transferencia de 95 embriones vitrificados a 55 receptoras (Hufana et al., 2004). La disponibilidad de ovocitos sigue siendo una de las mayores limitantes para ésta técnica. En promedio, la recuperación de ovocitos de ovarios obtenidos de frigorífico varía entre 0.43 a 3.3 ovocitos/ovario de búfalo (Boni et al., 1999).

Si bien en el búfalo la producción *in vitro* de embriones (PIVE) ha progresado significativamente en los últimos años con producciones consistentes de blastocitos (Gasparrini et al., 2006) e informes de animales nacidos (Negila et al. 2004; Hufana-Duran et al., Sà Filho et al., 2005; Huang et al., 2005), esta tecnología aún se encuentra lejos de las condiciones de repetibilidad y consistencia necesarias para ofrecerla como una herramienta productiva. La baja eficiencia del búfalo comparada con el ganado doméstico radica en las particularidades de la fisiología reproductiva del búfalo; por ejemplo, su reducido número de folículos primordiales y su muy baja calidad ovocitaria general. Sumado a esto, la escasez de rodeos y animales disponibles para el desarrollo de trabajos experimentales en la mayoría de los países hace que el progreso sea lento y limitado. En este sentido, Konrad et al. (2013) evaluaron en Argentina la viabilidad y competencia de la maduración *in vitro* de ovocitos en tránsito previo a la FIV, debido a las grandes distancias existentes entre los rodeos donantes y los laboratorios de alta complejidad necesarios para realizar la FIV.

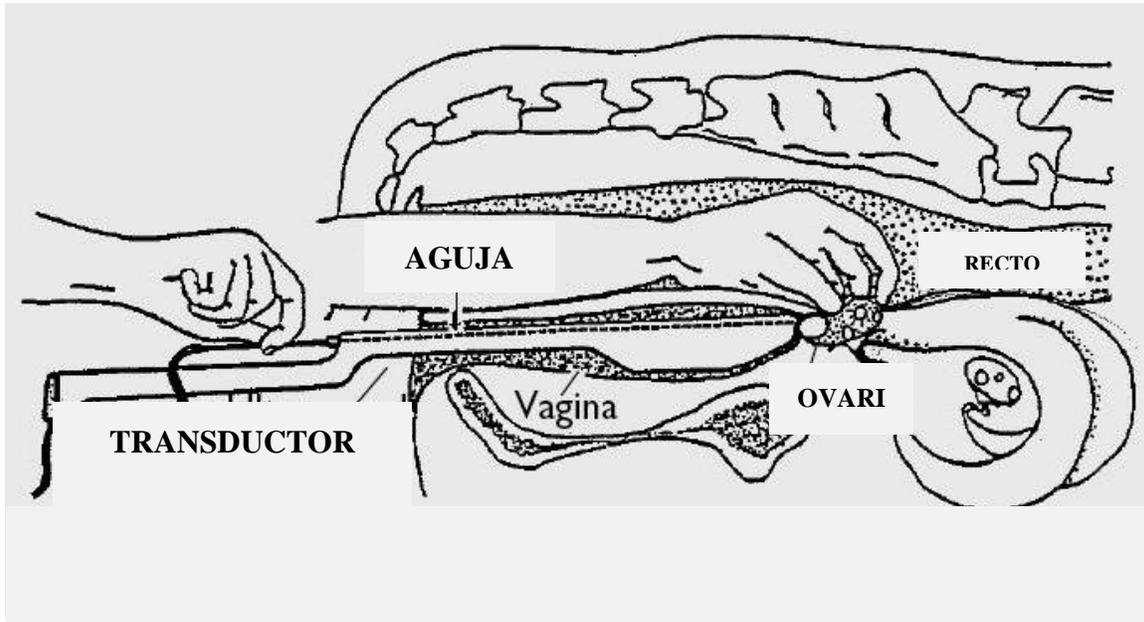
Figura 1. Flujo de los trabajos en la producción *in vitro* de embriones.



ORIGEN Y CALIDAD DE OVOCITOS

Una de las grandes limitaciones que presenta el búfalo es el reducido número de ovocitos inmaduros que pueden ser recuperados por donante mediante la utilización de la técnica de OPU. Gasparrini et al. (2000) indicó que la punción de ovocitos de ovarios post-mortem (matadero) rendía un promedio de 2.4 ovocitos de buena calidad/ovario. En comparación, Gordon et al., informó un promedio de 10 ovocitos de buena calidad por ovario en el vacuno. Siguiendo la misma tendencia, la recuperación de ovocitos por OPU en el búfalo es baja comparada con el vacuno (4.5 en el búfalo vs 10 en el vacuno, Galli et al., 2000). Esta limitación, originada en el menor número de folículos primordiales presentes en el ovario, es una de las principales razones de la baja difusión de FIV y PIVE en el búfalo.

Figura 2. Sistema de Ovum-pick Up. Fuente: cortesía Elmarie y Marius Meintjes.



La cantidad de ovocitos competentes puede aumentarse en base a la selección de la donante en relación a su población folicular (Sa Filho et al., 2005). El tratamiento hormonal de las donantes con bST resultó en el aumento de la población y crecimiento folicular (12.2 vs 8.7 folículos totales en el tratamiento bST vs control); sin embargo, esto no se tradujo en un aumento significativo de la cantidad de ovocitos recuperados luego de OPU. La calidad ovocitaria es un elemento clave en el éxito de la PEIV; este fenómeno es aun más marcado en el búfalo. De acuerdo a Neglia et al. (2003) la proporción de ovocitos de mejor calidad (categorías A y B) es menor. Mishra et al., 2007^a informaron que, sobre un total de 35.286 ovocitos recuperados post-mortem, solo 47.8% correspondían a la calidad ovocitaria A y B.

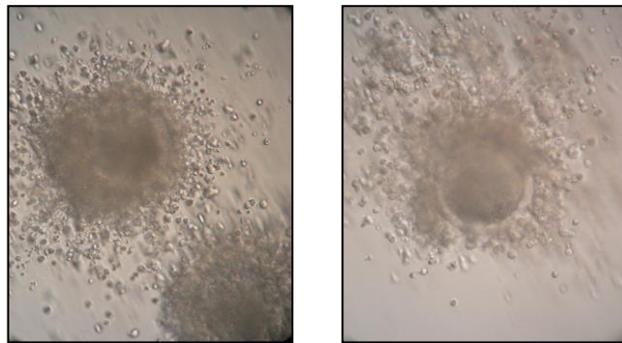


Figura 3. Ovocitos de búfalo recuperados por OPU. Fuente: Sansinena et al., 2014.

La calidad ovocitaria podría estar afectada por aspectos mecánicos de la OPU. La presión de aspiración, el origen de los gametos, el intervalo entre OPU y la estacionalidad son todos factores que podrían influenciar el resultado final. Neglia et al. (2003) informaron que, a pesar de que el aspecto de los ovocitos recuperados por OPU parecería ser inferior a aquellos recuperados de ovarios post-mortem, los primeros tienen mejor competencia en su desarrollo *in vitro*. Este grupo atribuyó las diferencias observadas al hecho de que la técnica de OPU causa una nueva emergencia de una onda folicular, resultando en la recuperación de ovocitos que o se encuentran en su fase de atresia.

El ovocito del búfalo es altamente sensible al shock térmico. Por ello, es importante evitar las fluctuaciones de temperatura durante el proceso de colección y procesamiento, en este sentido, diversos grupos han informado un aumento en el potencia de desarrollo de los ovocitos cuando estos son recuperados de ovarios con baja temperatura durante el transporte (25-29.5°C).

MADURACIÓN *IN VITRO* (MIV) DE OVOCITOS

El ovocito bubalino puede ser madurado en medios complejos tales como TCM-199 y Ham's F-10 suplementados con suero fetal, hormonas y otros aditivos (Gasparrini et al., 2002, Sansinena et al., 2012). La presencia de las células del cumulus es necesaria para la maduración y la adquisición de competencia citoplasmática y nuclear durante MIV; esto ha sido demostrado mediante la remoción total o parcial del cumulus seguidos por reducciones en las tasas de ovocitos que alcanzan metafase II, clivaje embrionario y estado de blastocito.

Debido a la alta proporción de lípidos presentes en el ovocito del búfalo respecto del vacuno, diversos grupos han evaluado la suplementación del medio de maduración con tiones, conocidos factores antioxidantes, cuya función es la estimulación de la síntesis del glutatión (GSH). Diversos trabajos han demostrado en efecto positivo de la adición de cisteamina (Konrad et al., 2014 y cistina (Gasparrini et al., 2006); resultando en tasas de maduración superiores a 85%. Si bien el periodo necesario para el progreso de la maduración *in vitro* ha sido descrito en el búfalo, con la mayor proporción de ovocitos alcanzado en el estadio de metafase II (maduración nuclear) entre 16 y 24 hs (Negilia et al., 2001; Yadav et al., 1997; Gasparrini et al., 2007b), la mayoría de los autores coinciden en inseminar los ovocitos de búfalo aproximadamente 24 h luego de iniciada la maduración. Gasparrini et al., (2004^a) informaron una reducción en la competencia de desarrollo de ovocitos declina progresivamente cuando el tiempo entre el inicio de la maduración *in vitro* y la inseminación supera las 18 h.

EFICIENCIA DE LA FECUNDACIÓN *IN VITRO* (FIV)

La etapa de fecundación es considerada el aspecto más crítico de la producción *in vitro* de embriones. Numerosos factores afectan la eficiencia de fecundación; tales como,

viabilidad y capacitación espermática, ambiente *in vitro* adecuado para la supervivencia de los gametos, momento de inseminación y la duración de la co-incubación de los gametos.

Actualmente, y si bien la calidad del semen congelando ha mejorado significativamente, el efecto “toro” sigue siendo una considerable fuente de variabilidad en los resultados de PIVE (Totey et al., 1998). Entre los numerosos agentes que han sido evaluados para la capacitación de los espermatozoides *in vitro*, la heparina sigue siendo el de mayor eficiencia. Mas recientemente, otros agentes identificados como capacitantes tales como, progesterona (Boccia et al., 2006^a), suero de búfala en estro o fluido folicular (Boccia et al., 2005).

El proceso de fecundación consiste en un encadenamiento de eventos:

- Capacitación del espermatozoide
- Unión a la zona pelucida y reacción del acrosoma
- Penetración de la zona pelucida
- Fusión espermatozoide-oolema
- Activación del ovocito y reacción de granulos corticales
- Decondensación del núcleo del espermatozoide
- Formación de pronucleos
- Singamia
- Clivaje y desarrollo embrionario

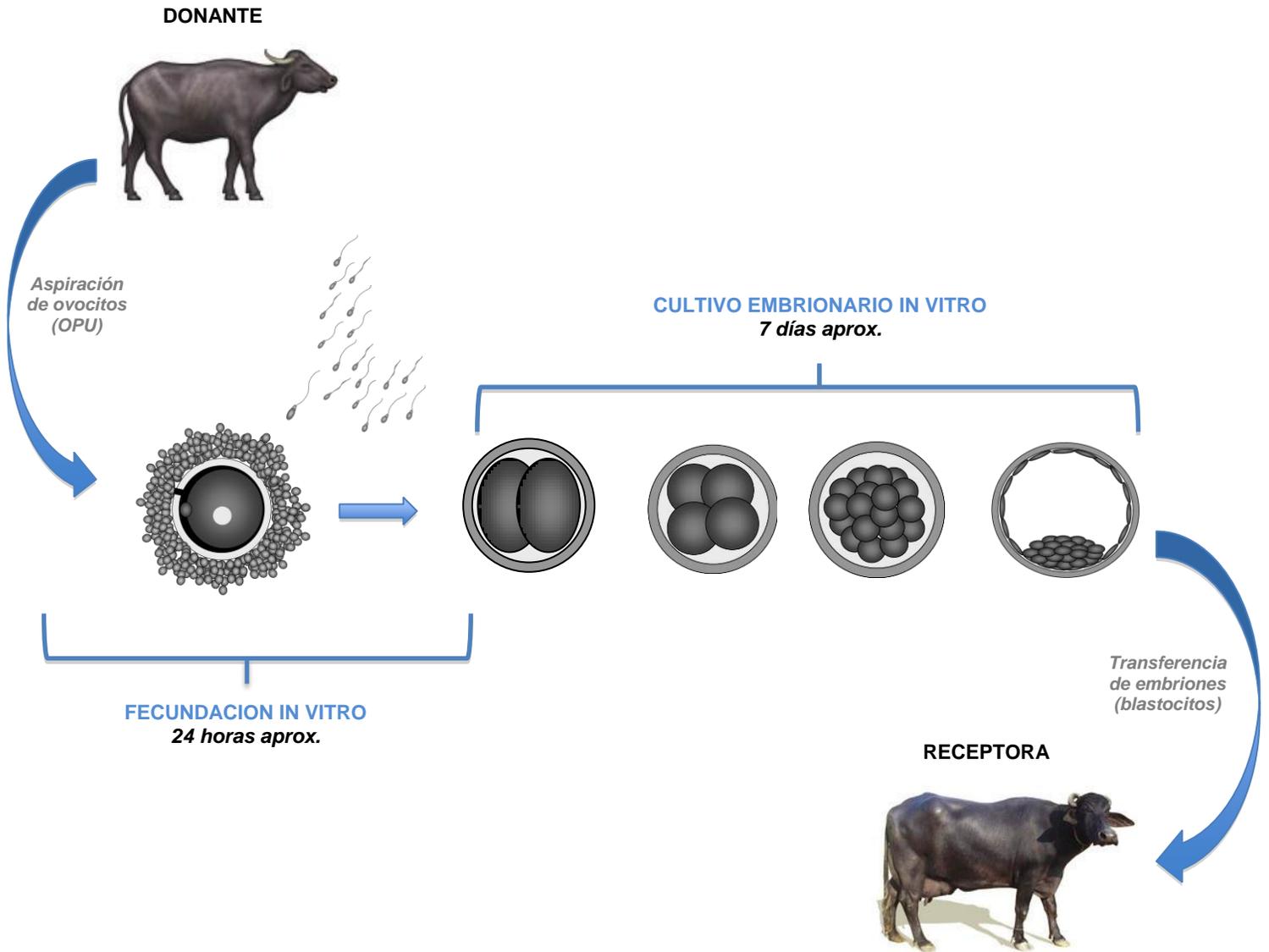


Figura 4. Procedimiento de obtención de ovocitos, fecundación *in vitro*, cultivo embrionario y transferencia en el búfalo.

El medio comúnmente utilizado para la co-incubación de gametos es Tyrode's modified medium (TALP) o Brackett Olophant (BO) (Sansinena et al., 2014), ambos suplementados con agentes promotores de la motilidad espermática como hipotaurina-penicilamina o cafeína (Gasparrini et al., 2004^a). Para el medio de co-incubación en base TALP, el periodo óptimo de incubación es de 16 h. Para el medio base BO, este periodo es reducido a un promedio de 6 h. En ambos casos, la prolongación del periodo de co-incubación (20 h para

TALP y 8 h para BO) resulta en significativo aumento de la incidencia de polispermia y reducción en el desarrollo embrionario.

CULTIVO EMBRIONARIO *IN VITRO*

Los sistemas de cultivo embrionario *in vitro* han sido desarrollado a partir de aquellos desarrollados para otras especies, principalmente el vacuno. Uno de los medios definidos mas generalmente utilizado es el medio sintético oviductal (Synthetic Oviductal Medium, SOF), con sus diversas modificaciones. Con estas modificaciones tales como la inclusión de aa (SOFAa), o de inositol (SOFAai), se han alcanzado tasas de desarrollo a blastocito de 35-40% (Holm et al., 1999). En el búfalo, a diferencia de en vacuno o de la oveja, la presencia de glucosa en el medio es absolutamente imprescindible desde el comienzo del cultivo embrionario, particularmente hasta el día 4 de cultivo (Monaco et al., 2006).

Con el objetivo de reducir la acumulación de radicales libres, amoniaco y otros catabolitos es una practica habitual es el re-emplazo o “refrescado” del medio de cultivo luego de 2-3 días de desarrollo. Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas con el refrescado de medio 3 vs 2 veces durante el cultivo (Boccia et al., 2006^a). Es posible que la mayor sensibilidad del embrión del búfalo a las fluctuaciones de pH y temperatura sean factores influyentes en este resultado; por lo tanto, la recomendación para el búfalo es “molestar” a los embriones lo menos posible durante el cultivo.

Los embriones de búfalo se desarrollan a una tasa 12-24 h mas rápida que sus contrapartes vacunos; este patrón de desarrollo ha sido mayoritariamente observado *in vivo*. La mayoría de los blastocitos recuperados en estado eclosionado se encuentran en los lavajes 6.5 d post estro (Drost y Eldsen, 1985). *In vitro*, la mayoría de los embriones alcanzan el estadio de blastocitos 7, aunque es posible encontrar estados avanzados de desarrollo inclusive en el día 6 (Gasparrini et al., 2001).

PREÑECES Y ANIMALES NACIDOS

Si bien los resultados en términos de PIVE son alentadores y se han hecho grandes progresos en la optimización de las etapas que componen la técnica, los resultados en terminos de preñez y animales nacidos son aún escasos. En el búfalo, se observa una alta tasa de pérdida embrionaria temprana (entre días 25 a 50 de gestación); la incidencia de estas perdidas tempranas es aun mayor en embriones producidos *in vitro*. Recientemente, Gasparrini et al. (comunicación personal) informaron una tasas de preñez del 50% en embriones producidos *in vitro*; sin embargo, esta tasa de preñez disminuyó al 10% al finalizar la gestación debido a pérdidas enbrionarias antes de los 50 días.

En Filipinas, Ocampo et al. (2000) informo que 30 embriones producidos por FIV fueron transferidos a receptoras (no se informo el numero total de receptoras); de estas transferencias reportaron el nacimiento de dos terneros, un macho y una hembra. También en ese país, Hufana-Durand et al. (2005) reportaron un total de 149 embriones de FIV

criopreservados por vitrificación y transferidos a 79 receptoras; de estas transferencias se logró el nacimiento de 11 (14%) terneros vivos.

En China, Huang et al. (2004) aspiraron 42 búfalas por OPU obteniendo un promedio de recuperación ovocitaria de 67% (59% de estos de calidad utilizable para PIVE). Esta serie dio como resultado la transferencia de embriones de FIV, y el nacimiento del primer búfalo de agua transferido a una receptora de pantano. Un total de nueve embriones fueron transferidos a 9 receptoras sincronizadas, obteniéndose una tasa de preñez del 33%. De estas, se logró un total de 2 nacimientos vivos.

REFERENCIAS

- Boccia L., De Rosa A., Attanasio L., Di Palo R., Zicarelli L., Gasparrini B., 2005. Capacitation of buffalo spermatozoa *in vitro*. *Reprod. Fertil. Dev.* 17 (1,2): 270.
- Boccia L. Attanasio L., Monaco E., De Rosa A., Di Palo R., Gasparrini B., 2006a. Effect of progesterone on capacitation of buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa *in vitro*. *Reprod. Dom. Anim.* 41 (4): 311.
- Boccia L., Monaco E., Attanasio L., De Rosa A., Gasparrini B., 2006b. Influenza del cambio di coltura (doppio vs singolo) sullo sviluppo di embrioni bufalini *in vitro*. "XII Giornate scientifiche", Università degli Studi di Napoli Federico II, Polo delle Scienze e delle Tecnologie per la Vita; 15-16 Giugno, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Napoli: 171.
- Boccia L., Attanasio L., De Rosa A., Pellerano G., Di Palo R., Gasparrini B., 2007. Effect of sodium nitroprusside on buffalo sperm capacitation *in vitro*. *Reprod. Fertil. Dev.* 19: 276.
- Boni R., Santella L., Dale B., Roviello S., Di Palo R., Barbieri V., 1992. An ultrastructural study of maturation in buffalo oocytes. *Acta Medica Veterinaria* 38: 153-161.
- Boni R., Roviello S., Gasparrini B., Langella M., Zicarelli L., 1999. *In vitro* production of buffalo embryos in chemically defined medium. *Buffalo Journal.* 1: 115-120.
- Brackett B.G., Bousquet D., Boice M.L., Donawick W.J., Evans J.F., Dressel M.A. 1982. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biol. Reprod.* 27: 147-158.
- Caracciolo di Brienza V., Neglia G., Masola N., Gasparrini B., Di Palo R., Campanile G., 2001. *In vitro* embryo production in chemically defined media. Atti 1° Congresso Nazionale sull'Allevamento del Bufalo, 3-5 ottobre, Eboli (SA), Italy: 341-344.
- Chang M.C. 1959. Fertilization of rabbit ova *in vitro*. *Nature* 184:166-176.

Danell B., 1987. Oestrus behaviour, ovarian morphology and cyclic variations in follicular system and endocrine pattern in water buffalo heifers. PhD thesis, Uppsala, Sweden: Sveriges Lantbruksuniversitet.

de Matos D.G., Furnus C.C., Moses D.F., 1997. Glutathione synthesis during *in vitro* maturation of bovine oocytes: role of cumulus cells. *Biol Reprod* 57: 1420-1425.

De Rosa A., Di Palo R., Attanasio L., Monaco E., Campanile G., Gasparrini B., 2006. Open pulled straw vitrification for *in vitro* produced buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. *Reprod. Fertil. Dev.* 18 (1,2):153.

De Rosa A., Attanasio L., Boccia L., Pellerano G., Campanile G., Gasparrini B., 2007. Cryotop vitrification for *in vitro* produced buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. *Reprod. Fertil. Dev.* 19: 174.

Di Francesco S., Boccia L., Di Palo R., Attanasio L., De Rosa A., Gasparrini B. Influence of temperature (and time for) during ovary transportation on *in vitro* embryo production efficiency in the buffalo species (*Bubalus bubalis*). *Proc. VII World Buffalo Congress.*

Dominko T., First N.L., 1997. Timing of meiotic progression in bovine oocytes and its effect on early embryo development. *Mol. Reprod. Dev.* 47: 456-67.

Drost M., Elsdon R.P., 1985. Blastocyst development in water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology* 23: 191.

Galli C., Duchi R., Crotti G., Lazzari G., 1998. Embryo production by Ovum Pick-up in Water Buffalo. *Theriogenology* 50: 259.

Galli C., Crotti G., Notari C., Turini P., Duchi R., Lazzari G., 2000. Embryo production by ovum pick-up from live donors. *Theriogenology Ital.J.Anim.Sci.* vol. 6, (Suppl. 2), 92- 101, 2007 99

VIII World Buffalo Congress 55:1341-1357.

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

Gasparrini B., Neglia G., Caracciolo di Brienza V., Campanile G., Di Palo R., Zicarelli L., 2001. Preliminary analysis of vitrified *in vitro* produced embryos. *Theriogenology* 55: 307.

Gasparrini B., 2002. *In vitro* embryo production in buffalo species: state of the art. *Theriogenology* 57 (1): 237-256.

- Gasparrini B., Sayoud H., Neglia G., de Matos D., Donnay I., Zicarelli L., 2003. Glutathione synthesis during *in vitro* maturation of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes: effects of cysteamine on embryo development. *Theriogenology* 60: 943-952.
- Gasparrini B., Boccia L., De Rosa A., Di Palo R., Campanile G., Zicarelli L., 2004a. Chemical activation of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes by different methods: effects of aging on post-parthenogenetic development. *Theriogenology* 62 (9): 1627-1637.
- Gasparrini B., Boccia L., De Rosa A., Vecchio D., Di Palo R., Zicarelli L., 2004b. *In vitro* fertilization of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes: effects of media and sperm motility inducing agents. *Reprod. Fertil. Dev.* 16: 255.
- Gasparrini B., Boccia L., Marchandise J., Di Palo R., George F., Donnay I., Zicarelli L., 2006. Enrichment of *in vitro* maturation medium for buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes with thiol compounds: Effects of cystine on glutathione synthesis and embryo development. *Theriogenology* 65(2): 275-287.
- Gasparrini B., 2006. Advances on *in vitro* embryo production in water buffalo. Proc of the 5th Asian Buffalo Congress on “Social economic contribution of buffalo to rural areas”, April 18-22, Nanning, China Vol 1: 15-21.
- Gasparrini B., Attanasio L., De Rosa A., Monaco E., Di Palo R., Campanile G., 2007a. Cryopreservation of *in vitro* matured buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes by minimum volumes vitrification methods. *Anim. Reprod. Sci.* 98 (3-4): 335-42.
- Gasparrini B., De Rosa A., Attanasio L., Boccia L., Di Palo R., Campanile G., Zicarelli L., 2007b. Influence of the duration of *in vitro* maturation and gamete co-incubation on the efficiency of *in vitro* embryo development in Italian Mediterranean Buffalo (*Bubalus bubalis*). *Anim. Reprod. Sci.* (in press) PMID: 17481834.
- Gordon I., 1994. Aspiration techniques: Old and new. In *Laboratory Production of Cattle Embryos*. Wallingford, UK: CAB International, 71-72.
- Huang Y., Zhuang X., Gasparrini B., Presicce G.A., 2005. Oocyte recovery by ovum pick-up and embryo production in Murrah and Nili-Ravi buffaloes (*Bubalus bubalis*) imported in China. *Reprod. Fertil. Dev.* 17 (1,2): 273.
- Hufana-Duran D., Pedro P.B., Venturina H.V., Hufana R.D., Salazar A.L., Duran P.G., Cruz L.C., 2004. Post-warming hatching and birth of live calves following transfer of *in vitro*-derived water buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. *Theriogenology* 61: 1429-1439.

- Hunter R.H.F., Greve T., 1997. Could artificial insemination of cattle be more fruitful? Penalties associated with aging eggs. *Reprod. Domest. Anim.* 32: 137-42.
- Konrad, J.L.; Scian, R.; Garrido, M.J.; Taminelli, G.; M. Sansinena. (2013). Producción de embriones de búfalo por fecundación *in vitro* luego de la maduración de los ovocitos durante el transporte prolongado. *Revista Veterinaria*, ISSN 1668-4834, 24 (2):97-101.
- Konrad, J., M.J. Garrido, G. Clérico, G. Taminelli, **M. Sansinena**, R. De la Sota, P. Maldonado Vargas y G. Crudeli. Obtención de ovocitos para producción *in vitro* de embriones mediante la aplicación de implantes de melatonina en búfalos (*Bubalus bubalis*) con anestro estacional en Argentina. VII Simposio de Criadores de Búfalos de las Américas y Europa. Antigua, Guatemala. 10-12 de Noviembre, 2015.
- Konrad, J., G. Clérico, M.J. Garrido, G. Taminelli, G. Crudelli y **M. Sansinena**. Competencia de ovocitos recuperados durante el anestro estacional para producción *in vitro* de embriones en el búfalo doméstico (*Bubalus bubalis* sp.). XI Simposio Internacional de Reproducción Animal, Córdoba, 13-15 de Agosto, 2015.
- Kumar A., Solanki V.S., Jindal S.K., Tripathi V.N., Jain G.C., 1997. Oocytes retrieval and histological studies of follicular population in buffalo ovaries. *Anim. Reprod. Sci.* 47: 189-195.
- Madan M.L., Singla S.K, Jaikhani S., Ambrose J.D. 1991. *In vitro* fertilization in buffaloes and birth of test tube buffalo calf "Pratham". *Proceedings of the III World Buffalo Congress.*
- Madan M.L., Singla S.K., Chauhan M.S., Manik R.S., 1994. *In vitro* production and transfer of embryos in buffaloes. *Theriogenology* 41: 139-143.
- Marston J.H., Chang M.C., 1964. The fertilizable life of ova and their morphology following delayed insemination in mature and immature mice. *J. Exp. Zool.* 15: 237-51.
- Meur S.K., Roy S.B., Mohan G., Dhoble R.I., 1988. Cryogenic changes in seminal proteins of cattle and buffalo. *Theriogenology* 30:1005-1010.
- Mishra V., Misra A.K., Sharma R., 2007a. A comparative study of parthenogenetic activation and *in vitro* fertilization of bubaline oocytes. *Anim. Reprod. Sci.*, doi:10.1016/j.anireprosci. 2006.12.019.
- Mishra V., Misra A.K., Sharma R., 2007b. Effect of ambient temperature on *in vitro* fertilization of Bubaline oocyte. *Anim. Reprod. Sci.* doi:10.1016/j.anirepro-100 Ital.J.Anim.Sci. vol. 6, (Suppl. 2), 92-101, 2007 VIII World Buffalo Congress sci.2006.10.020.

Monaco E., De Rosa A., Attanasio L., Boccia L., Zicarelli L., Gasparrini B., 2006. *In vitro* culture of buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos in the presence or absence of glucose. *Reprod. Domest. Anim.* 41 (4): 332.

Neglia G., Marino M., Di Palo R., Wilding M., Caracciolo di Brienza V., Dale B., Gasparrini B., Zicarelli L., 2001. A comparison of *in vitro* maturation in buffalo (*Bubalus Bubalis*) and bovine oocytes using confocal microscopy. *Theriogenology* 55: 488.

Neglia G., Gasparrini B., Caracciolo di Brienza V., Di Palo R., Campanile G., Presicce G.A., Zicarelli L., 2003. Bovine and buffalo *in vitro* embryo production using oocytes derived from abattoir ovaries or collected by transvaginal follicle aspiration. *Theriogenology* 59: 1123-1130.

Neglia G., Gasparrini B., Caracciolo di Brienza V., Di Palo R., Zicarelli L., 2004. First pregnancies to term after transfer of buffalo vitrified embryos entirely produced *in vitro*. *Vet. Res. Commun. (Special Issue)* 28: 233–236.

Ocampo M.B., Ocampo L.C., Lorenzo N.D., Mamuad F.V., Aquino F.P., Mori T., Shimizu H and Cruz L.C. (2000). Live Births Resulting from Swamp Buffalo Oocytes Matured, Fertilised and Cultured *in vitro*. *Asian-Aus. J. Anim. Sci.* 13 Supplement: 279-282.

Palta P., Banzai N., Prakash B.S., Manik R.S., Madan M.L., 1998. Endocrinological observation of atresia in individual buffalo ovarian follicles. *Ind. J. Anim. Sci.* 68: 444-447.

Pawshe C.H., Totey S.M., 1993. Effects of cumulus cells monolayer on *in vitro* maturation of denuded oocytes of buffalo (*Bubalus Bubalis*). *Theriogenology* 39: 281.

Sá Filho M.F., Carvalho N.A.T., Gimenes L.U., Torres-Junior J.R., Ferriera C.R., Perecin F., Perini A.P., Tetzner T.A.D., Vantini R., Soria G.F., Garcia J.M., Tonhati H., Zicarelli L., Gasparrini B., Baruselli P.S., 2005. Birth of the first buffalo calves after transfer of vitrified embryos produced *in vitro* in America. *Atti del 3° Congresso Nazionale sull'Allevamento del Bufalo- 1° Buffalo Symposium of Europe and the Americas*; October 12-15, Capaccio-Paestum (SA), Italy: 250.

Stephoe P.C., Edwards R.G. 1978. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet* 312 (8085):366.

Totey S.M., Singh G., Taneja M., Pawshe C.H., Talwar G.P., 1992. *In vitro* maturation, fertilization and development of follicular oocytes from buffalo (*Bubalus Bubalis*). *J. Reprod. Fertil.* 95: 597-607.

Totey S.M., Pawshe C.H., Singh G.P., 1993. *In vitro* maturation and fertilization of buffalo oocytes (*Bubalus Bubalis*): Effects of media, hormones and sera. *Theriogenology* 39: 1153-1171.

Wilding M., Gasparrini B., Neglia G., Dale B., Zicarelli L., 2003. Mitochondrial activity and fertilization potential of fresh and cryopreserved buffalo sperm. *Theriogenology* 59: 466.

Yadav B.R., Katiyar P.K., Chauhan M.S., Madan M.L., 1997. Chromosome configuration during *in vitro* maturation of goat, sheep and buffalo oocytes. *Theriogenology* 47: 943-51.

Zicarelli L., 1997. Superovulatory response in buffaloes bred in Italy. *Third Course on Biotechnology of Reproduction in buffaloes, Caserta, Italy*, 167-188.