

Manejo reproductivo en hatos bufalinos

Reproductive management in buffalo herds

David Campos-Jiménez¹, Esteban Garro-Monge², Valery Jiménez-Benavides³, Pablo Mora-Gamboa⁴, Mónica Madrigal-Valverde⁵

Fecha de recepción: 24 de abril de 2021

Fecha de aprobación: 11 de julio de 2021

Campos-Jiménez, D; Garro-Monge, E; Jiménez-Benavides, V; Mora-Gamboa, P; Madrigal-Valverde, M. Manejo reproductivo en hatos bufalinos. *Tecnología en Marcha*. Vol. 35-3. Julio-Setiembre 2022. Pág. 60-72.

 <https://doi.org/10.18845/tm.v35i3.5634>

- 1 Estudiante de la Escuela de Ingeniería en Agronomía, Campus Tecnológico Local San Carlos, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: davidcampos@estudiantec.cr.
 <https://orcid.org/0000-0002-8550-9409>
- 2 Estudiante de la Escuela de Ingeniería en Agronomía, Campus Tecnológico Local San Carlos, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: garromongee@estudiantec.cr.
 <https://orcid.org/0000-0002-4981-1555>
- 3 Estudiante de la Escuela de Ingeniería en Agronomía, Campus Tecnológico Local San Carlos, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: valyjb17@estudiantec.cr.
 <https://orcid.org/0000-0001-8575-8053>
- 4 Estudiante de la Escuela de Ingeniería en Agronomía, Campus Tecnológico Local San Carlos, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: pablomora@estudiantec.cr.
 <https://orcid.org/0000-0001-9090-4326>
- 5 Área académica del doctorado en ciencias naturales para el desarrollo. Campus Tecnológico Local San Carlos, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: mmadrigal@itcr.ac.cr.
 <https://orcid.org/0000-0002-4688-0627>

Palabras clave

Nutrición; estacionalidad; eficiencia reproductiva; salud de hato; *Bubalus bubalis*.

Resumen

La actividad bufalina ha ido en aumento en los últimos años, mostrando cada vez más productores enfocados al sistema de producción de esta especie en América Latina. El objetivo de esta revisión fue recopilar conocimientos existentes en la literatura sobre el manejo y las biotecnologías reproductivas disponibles para los machos y las hembras de la especie *Bubalus bubalis*. La información fue seleccionada de libros y artículos científicos en bases de datos académicas y Google Scholar, durante un periodo de cinco meses (marzo-julio 2020). Se abarcaron los temas de manejo reproductivo de la hembra, el macho y las biotecnologías aplicadas a la especie. Se determinó que la eficiencia productiva de los búfalos está fuertemente relacionada con el manejo a nivel nutricional, reproductivo y de bienestar animal, asimismo de los factores climáticos en el que se desarrollan. Se evidenciaron avances de las biotecnologías aplicadas a la reproducción bufalina.

Keywords

Nutrition; reproductive biotechnologies; seasonality; reproductive efficiency; *Bubalus bubalis*.

Abstract

Buffalo production has increased mainly over the past years, more farmers have been dedicated to the production system of this species in Latin America. The objective of this review is to compile scientific literature corresponding to reproductive management and biotechnologies available for *Bubalus bubalis* bulls and cows. The information was gathered from books and scientific articles from academic databases and Google Scholar in a span of 5 months (March-July). Reproductive management of cows, bulls and biotechnologies applied to the species were covered. It was determined that productive efficiency of buffalos is strongly related to nutritional, reproductive, and animal welfare management, as well as environmental factors were this species develops. Improvements in biotechnologies applied to the buffalo reproduction were evince.

Introducción

La producción de búfalos ha ido en aumento en América Latina en los últimos 20 años. En el año 2001 se estima que la población de búfalos en América superaba ligeramente los 3,3 millones animales [1]. Para el 2007, se estima que la población de búfalos incrementó cerca de los 4 millones de animales en América Latina y el Caribe, siendo Brasil el país número uno en la producción de estos animales seguido por países como Argentina, Venezuela, Cuba y Colombia [1] [2]. Aun así, el seguimiento de esta especie en los países Latinoamericanos ha sido variable y su población real en la región es incierta.

En cuanto a Costa Rica, los primeros búfalos fueron introducidos en el año 1974 y fueron adquiridos animales del grupo racial Bufalypso, los cuales fueron distribuidos en diferentes partes del país [3]. En el año 2007 la especie bufalina estaba distribuida por todo el territorio nacional; sin embargo, a nivel productivo estos estaban siendo subexplotados por parte de los productores [3]. El búfalo tradicionalmente ha sido manejado de manera similar a los bovinos a pesar de que aspectos de comportamiento y fisiología difieren de manera considerable, contando los bufalinos con una mayor adaptabilidad al medio ambiente [4][5].

Por lo anterior, es de vital importancia establecer claramente las diferencias entre las especies bufalinas y bovinas. Es requerido comprender el comportamiento reproductivo tanto de la hembra como del macho bufalino, para así determinar y orientar sobre cuáles son los factores que tienen el mayor peso e influencia para permitir una ciclicidad y tiempo de servicio adecuado. Los búfalos son susceptibles ante diversos factores, como lo son los factores climáticos, donde se ha determinado la influencia de la temperatura ambiental y de las precipitaciones sobre la estacionalidad del ciclo reproductivo y calidad seminal [6] [7] [8]. Por otra parte, los bufalinos presentan menores incidentes y trastornos reproductivos comparados con otras especies, como por ejemplo los bovinos, por lo que esta especie es de interés por su capacidad de resistencia ante ciertas enfermedades y patologías reproductivas [8] [9].

En cuanto a las biotecnologías reproductivas la inseminación artificial (IA) ha sido una de las biotécnicas más difundidas y empleadas; no obstante, ha presentado problemas debido a que el estro de las búfalas es más discreto que en hembras cebuinas, debido a la variación en el momento de ovulación y por poseer un carácter reproductivo estacional. La inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) ayuda a solucionar algunos de estos problemas, ya que sincroniza los eventos de la fase lútea, el crecimiento folicular y la ovulación, lo que hace que se insemine en un momento específico [10]. Además, se han estudiado en búfalos biotecnologías reproductivas como la transferencia de embriones, aspiración folicular guiada con ultrasonido y producción de embriones *in vitro* [10]; todas estas están en función de la colecta, evaluación y criopreservación del semen. Por ello el objetivo de esta revisión es evidenciar los conocimientos existentes sobre el manejo del hato y de las biotecnologías reproductivas disponibles para hembras y machos de la especie *Bubalus bubalis*.

Materiales y métodos

La información utilizada para la presente investigación bibliográfica fue recopilada durante un periodo de cinco meses (marzo-julio del año 2020). Los documentos de texto incluidos en la presente revisión fueron recopilados de libros y artículos científicos de las bases de datos académicas suscritas del Tecnológico de Costa Rica, complementada con documentos presentes en la plataforma Google Scholar. Esta revisión bibliográfica se encuentra dividida en las siguientes secciones: Manejo reproductivo del macho bufalino, manejo reproductivo de la hembra bufalina y biotecnologías reproductivas.

Resultados

Manejo reproductivo del macho bufalino

El conocimiento de las características, desarrollo y manejo reproductivo de una especie doméstica es de gran interés para conducir en esta la eficiencia productiva y por ello la especie bufalina no es una excepción, en los sistemas de producción animal el macho influye en un 50% en la reproducción del hato y debido a esto se debe ofrecer al animal los cuidados indispensables para obtener mejores y mayores índices de eficiencia reproductiva. Actualmente, la influencia del macho es cada vez más sobresaliente en la fertilidad y fundamental en el mérito genético de las explotaciones pecuarias [7] [11].

En el caso de los búfalos seleccionados como reproductores estos deben cumplir una serie de requisitos como lo son: tener una nutrición apropiada, un buen estado tanto físico como de salud, incluyendo el criterio de temperamento (lo menos agresivos posibles), un buen desarrollo del sistema genital y poseer calidad seminal requerido para este fin, por ende, de una óptima madurez sexual y adecuados periodos de servicio y descanso [11]. Además, existen factores

ajenos al animal como lo son las horas de luz ambiental, esto debido al comportamiento reproductivo estacional presente en esta especie, ya que estos poseen poca protección al sol y estar expuestos a este repercute negativamente a nivel físico y reproductivo [7][12].

Como se mencionó anteriormente, la salud toma un rol importante en el manejo reproductivo del macho, por lo que se deben tener presente ciertas medidas de prevención como lo es la realización de exámenes de sangre, la desparasitación, y un programa de vacunación [12], en el caso de este último elemento cabe señalar que se deben tener los cuidados respectivos en cuanto a las agujas utilizadas, para así evitar la diseminación de alguna enfermedad, por lo tanto se recomienda emplear una por animal [13]. Cabe señalar que esta especie pese a poseer una gran rusticidad también es susceptible a enfermedades, como lo son la brucelosis (*Brucella abortus*), la leucosis enzoótica bovina, rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR) y leptospirosis (*Leptospira sp*), las cuales presentan una seropositividad del 2,6%, 1,3%, 40% y 39% respectivamente [14]. En cuanto a *Brucella abortus* y el virus de la leucosis, estas generan gran afectación a la producción, ya que producen trastornos en el aparato reproductor [15], en el macho la afección se da a nivel de vesículas seminales y en el epidídimo, por lo que provoca una disminución en la reproducción [16]. Por otra parte, el IBR afecta de manera localizada generando una inflamación en el prepucio [14][16], teniendo una incidencia de 40% en el ganado bufalino [17]. En el tópico para el estado físico se deben tomar en cuenta la condición de los aplomos y de las pezuñas, siendo criterios requeridos que estas sean redondas y posean casco plano, mientras que la condición de las patas delanteras es que estas deben ser delgadas, pero lo suficientemente fuertes y sus cuartos traseros deben tener buen desarrollo y conformación, por lo que sus huesos son fuertes y sus articulaciones sanas [13]. A su vez, se debe tener presente que dichas características morfológicas cuentan con heredabilidades medias, por lo que se pueden seleccionar las características más aptas y consecuentemente ser transmitidas a la progenie para generar un mayor rendimiento en la reproducción [13].

De igual manera, existen variables que se pueden mejorar y que influyen en el éxito reproductivo como lo es la edad a la primera monta o madurez sexual del animal, esta puede darse desde los 18 meses de edad; sin embargo, se debe iniciar con la cubrición a los dos años de edad, ya que en este momento es cuando se da la aparición de los espermatozoides viables en el eyaculado del macho; este criterio varía de acuerdo a la raza, en el caso de los grupos raciales bufalinos, los animales pueden presentar espermatozoides en el eyaculado a los 23 meses de edad [18]. No obstante, tan importante es la edad como el peso del animal para iniciar la monta y por tanto se reporta que los animales deben tener como promedio de peso vivo 455 kg, tal peso se obtiene en animales con una alimentación a base de pastos y suplementos minerales a los 23 meses de edad [19].

Consecuentemente con lo anterior, el periodo de intervalo entre partos se encuentra influenciado por la duración del periodo de servicio, debido a que en cuanto más extenso el periodo en que tarda la hembra en que concebir será proporcional la duración del IEP y menor la tasa de nacimientos del rebaño, idealmente la hembra de preñarse entre dos a tres meses posparto [20].

Por lo que deben tomarse algunas consideraciones previo al servicio para garantizar la preñez de la hembra durante el periodo de tiempo mencionado, se deben realizar una serie de exámenes pertinentes al estado del animal, como lo son los análisis andrológicos para conocer la capacidad reproductiva y el buen funcionamiento del sistema genital masculino, además de la verificación de la libido y las cualidades del semen de este [21]. Uno de los parámetros biométricos de mayor interés en la evaluación de los testículos es la circunferencia escrotal (CE), la cual está correlacionada con el volumen de semen producido, del cual se pueden generar mayor número de espermatozoides, también poseen una relación con una menor precocidad

de las hijas del animal, pero para que sea posible esta medición debe estar por encima de los 30 cm a los 2 años de edad [21], por lo anterior la CE del progenitor cobra importancia en el manejo de hatos bufalinos, sin embargo es un parámetro poco estudiado [22].

Adicionalmente, el semen debe ser analizado de manera macroscópica y se toman en cuenta parámetros de color y densidad seminal, ya que se califican como muy buenas aquellas relaciones de concentraciones ($\text{espx}10^9/\text{ml}$) mayores a 1000, con densidades cremosas o espesas y malas cuando tienen una concentración menor a 400 [23]. Además, se debe mencionar que el volumen del eyaculado está asociado con la edad del macho. Complementario a lo anterior, como parte de estos parámetros se tiene que el pH debe estar en un rango de 6,4-7,0 para que los espermatozoides sean viables [23].

Por otra parte, se realiza un análisis microscópico, en el cual se determina la motilidad tanto masal como individual, la concentración, el vigor espermático y la vitalidad, con estas variables es posible estudiar la viabilidad que tendrá el individuo como macho reproductor [22]. Cabe destacar que los parámetros microscópicos son determinantes en la capacidad de fertilización del semen. A mayor cantidad de defectos en cuanto a forma o movilidad, mayor será la infertilidad del eyaculado. Dichas anomalías pueden deberse a varias causas que van desde una espermatogénesis defectuosa heredada, enfermedades, reposo sexual prolongado o bien el estrés por el calor que se genera en los búfalos [22] [23].

En cuanto al manejo nutricional del ganado bufalino y sus efectos sobre la reproducción machos de esta especie es escasa [24][25]. Sin embargo, Singh (2013) y Paul (2011) mencionan que los machos con bajas condiciones corporales, o bien con sobrepeso, muestran una disminución de su libido a la hora de la monta; además, muestran deficiencias en la calidad del semen. Por otro lado, se han correlacionado dietas con contenidos bajos en proteína con problemas de volumen y motilidad espermática, así como a retrasos de entrada a la pubertad en esta especie, asimismo, el subestimar la necesidad de energía pueden ocasionar la reducción de la espermatogénesis y afectar la morfología y conformación testicular [24] [26].

La suplementación mineral y vitamínica se ha relacionado con mejoras sobre las cualidades del semen en búfalos. Por ejemplo, la suplementación en las dietas con vitamina E, A, D y selenio (Se) han resultado en una mejoría morfológica del semen de búfalo [26] [27]. Otros minerales como el magnesio (Mg), cobre (Cu), calcio (Ca) y zinc (Zn) se han correlacionado con un mayor volumen y concentración espermática, mejoras en la motilidad, la vitalidad y la capacitancia acrosomal de los espermatozoides, asimismo, se indica una disminución de reacciones de oxidación del semen [26] [28]. Sumado a lo anterior, dietas con suplementación de metionina y lisina se han correlacionado con una mejoría en el volumen, concentración y vitalidad de espermatozoides en el eyaculado, una mejora en la motilidad y morfología tanto pre como postcongelación [29].

En síntesis, la reproducción del macho bufalino juega un papel importante dentro del hato, por lo que se debe dar el correcto manejo y registro de diversos factores que influyen en esta, como lo es el estado físico, nutricional y de salud [19] [30]. El identificar los momentos óptimos debido a la edad, estacionalidad y cualidades óptimas del semen son de gran importancia para lograr un correcto manejo reproductivo.

Manejo reproductivo de la hembra bufalina

La producción animal depende en gran medida del éxito que haya dentro del manejo reproductivo que se dé a los animales. En el sistema de producción de búfalos, la eficiencia reproductiva es uno de los principales factores que afectan a la productividad de la hembra, como lo es el inicio tardío de la pubertad, la estacionalidad de nacimientos, la poca expresión del estro, el anestro postparto, así como el intervalo que hay entre los partos [31]. Estos

problemas se pueden atribuir a ciertos factores como lo son los cambios en la estacionalidad de las lluvias, el estrés térmico, así como también los cambios en el fotoperiodo, influenciados por las variaciones en la secreción de melatonina [8].

Las búfalas son animales poliéstricas estacionales de fotoperiodo corto, el intervalo entre ciclos estrales tiene una duración de 16 a 32 días, a su vez, se reporta que las búfalas presentan un predominio de dos a tres ondas foliculares por ciclo [31]. La actividad sexual tiende a darse en horas de poca luz y temperaturas bajas. En las zonas tropicales, donde se da un fotoperiodo constante, la época reproductiva se ve muy influenciada por los cambios en las precipitaciones anuales, donde a su vez se le atribuye a la calidad y disponibilidad del forraje, debido a esto la mayor cantidad de nacimientos se engloba en épocas de mayor abundancia de biomasa, generalmente en el segundo semestre del año [8].

Por otra parte, el estro en las búfalas se presenta por primera vez entre los 24 a 36 meses de edad, por lo que el promedio del primer parto se da entre los 3 o 4 años de edad; en esta especie es difícil detectar el estro, el cual puede llegar a tener una duración de 18 horas, así como tiende a manifestarse en las horas de la noche. Por lo que, la mejor manera para detectarlo es por medio del uso de un macho, ya que el animal logrará percibir los pequeños cambios hormonales que se dan en la hembra [32]. Por lo tanto, al presentar un estro muy discreto no siempre se logra la observación de algún síntoma; sin embargo, pueden mostrar bramidos y micciones frecuentes, descargas vaginales, edematización de la vulva, hiperemia vaginal, levantamiento de la cola, montas entre otras o reflejo de inmovilidad al ser montada, entre otros síntomas [33].

El periodo de gestación en la especie bufalina tiene una duración de 310 a 330 días, en el cual se tiene una cría por parto. El puerperio tiene una duración cerca a los 25 días después del parto, con un rango de duración entre los 15 a 66 días, lo que indica que esta especie bajo buenas condiciones presenta un reinicio a la actividad reproductiva temprana comparada a los bovinos. A su vez, se reporta un reinicio de la actividad ovárica temprana, manifestándose el primer estro postparto hacia los 30-45 días. A su vez, se considera un intervalo de parto promedio cercano a los 13 meses [33].

Por su parte, la prevalencia en los desórdenes y patologías reproductivas en búfalos se dan en menor medida comparado con el hato bovino, estos son animales más rústicos y resistentes ante distintos problemas; no obstante, en estos se pueden presentar trastornos en la repetición del estro, el anestro, el prolapso genital, abortos, nacimiento de crías débiles, natimortos, la retención placentaria, la torsión uterina y la distocia, a su vez, la susceptibilidad ante estas patologías se atribuye a cuestiones de temperatura elevada, alta humedad en el ambiente y a la baja disponibilidad del forraje [9].

Dentro de las patologías reproductivas que se pueden presentar se pueden asociar con la presencia de agentes infecciosos como la Diarrea Viral Bovina (DVB), Herpes Virus Bovino tipo 1 y 4 (HVB-1 y HVB-4), *Leptospiría spp*, *Chlamydia psitacci*, *Campylobacter spp.*, *Trichomona* y *Brucella abortus*, además de parásitos como *Neospora caninum* y *Criptosporidium* [34]. A causa de esto, los fetos pueden morir en el útero, ser reabsorbidos, autolisiados e incluso pueden nacer vivos, pero con mucha debilidad, además de presentarse momificación fetal, nacimientos prematuros, placentitis, disentería y fiebre aguda en los animales [9].

Como se ha mencionado brevemente, el manejo nutricional influye en la eficiencia reproductiva de las hembras bufalinas. A grandes rasgos, las búfalas que reciban dietas desbalanceadas son propensas a tener impactos negativos sobre su fertilidad. Una mala condición corporal de las búfalas durante la gestación se ha vinculado a intervalos posparto mayores, una reducción en la tasa de preñez, un incremento en los servicios por animal y consecuentemente, a un menor rendimiento productivo [4] [35] [36]. En cambio, Aggarwal y Upadhyay (2013) comentan

que las hembras con condiciones corporales cercanas a 3,5 se han relacionado a mejores respuestas de protocolos de inseminación a tiempo fijo, dentro de la misma línea Quereshi (2009) menciona que la tasa de preñez aumenta significativamente al mantener condiciones entre 3,0 y 4,0.

En cuanto la calidad nutricional y composición de las dietas, las búfalas disminuyen aspectos reproductivos deseables debido a dietas con niveles muy altos o muy bajos de proteína y por dietas de baja energía durante todas las etapas de su desarrollo, a pesar de esto, se debe prestar principal atención a esos dos factores durante el último tercio de la gestación y los primeros 3 meses posparto. Algunos de los resultados de Qureshi et al. (2002) mencionan que para búfalas de la raza Nili-Ravi, las relaciones de proteína cruda (PC) y energía metabolizable (EM) cercanas 11,9 g PC/MJ EM mantuvieron en promedio retornos a ovulación posparto iguales o menores de 75 días, en cambio dietas de PC/EM mayores o menores a este valor alargaron el período de retorno de ovulación. En general, se ha encontrado que las dietas balanceadas en componentes de proteína cruda y energía, acompañadas de suplementación mineral, han demostrado disminuir la cantidad de servicios por preñez, también se ha vinculado mejorías sobre los periodos al primer parto, tasas de preñez y a nivel productivo desde la influencia de las dietas, ya sea positiva o negativamente, en la composición de la leche [36] [37] [38] [39].

Otro factor importante para el correcto manejo reproductivo de la hembra es la suplementación mineral y vitamínica. En cuanto a minerales, la relación de calcio (Ca) y Fosforo (P) son de gran importancia, especialmente durante el último tercio de la gestación. En esta etapa, una inadecuada relación Ca:P puede causar desórdenes de interacción con otros minerales, ocasionando problemas reproductivos como prolapso uterino o vaginal, retención de placenta, calcemia posparto, infertilidad, retraso o repetición del estro e incrementado desordenes en la salud del animal [38][39][40]. Sobre esto Terramoccia et al. (2005) hacen referencia a que una relación óptima de Ca:P debe ser 1:1.1 durante el último tercio de gestación [38]. En cuanto a la suplementación vitamínica, los búfalos son capaces de sintetizar vitaminas del complejo B, K y C, pero no las vitaminas A, D y E las cuales deben ser incorporadas en la dieta en todas las etapas de desarrollo y producción [41] [42].

En síntesis, el éxito reproductivo de las hembras bufalinas está situado en gran parte por la selección de las reproductoras, así como de su genética; sin embargo, también se debe considerar factores como el manejo nutricional, la temperatura, el fotoperiodo, la humedad relativa y el periodo de precipitaciones que se presente en la zona, ya que todos estos factores intervienen significativamente en el ciclado de la hembra [8]. Es por ello por lo que se debe de dar un buen control y estudio en registros, coordinación y búsqueda de prácticas que permitan dar al animal las mejores condiciones para poder brindar un buen rendimiento productivo [8] [9].

Biotecnologías reproductivas

Existe una amplia gama de biotecnología reproductivas, con estas se busca aumentar la eficiencia de la producción sea lechero o de cría, más no todas se pueden implementar en esta especie. Se describirán a continuación la colecta de semen, sistemas CASA para análisis semen, inseminación artificial, inseminación artificial a tiempo fijo, aspiración folicular, fertilización in vitro y transferencias de embriones.

Colecta y preservación seminal

Es el primer proceso para llevar a cabo la inseminación artificial [43], este puede llevarse a cabo por medio de la utilización de un electroeyaculador o de una vagina artificial [44] [45] [46]. El semen es eyaculado en un tubo graduado con una cubierta protectora para evitar los rayos UV y los cambios bruscos de temperatura [44]; Canizales 2011 menciona que el macho de esta

especie es quizás una de las especies domésticas más fáciles de entrenar para la extracción seminal a través de la vagina artificial. Por otro lado, dice que 2 eyaculados seguidos cada 3,5 días a partir de los 30 meses de edad estimula no solo el volumen del eyaculado, sino que también la producción de espermatozoides y agrega que el descanso nocturno es suficiente para mantener el número de espermatozoides.

Los eyaculados son analizados bajo criterios de forma y movimiento, las muestras con altos parámetros de calidad seminal (motilidad > 30%, espermatozoides normales > 70%) [47], pueden ser preservadas, ya sea por medio de la refrigeración o de la congelación. Para realizar el proceso de criopreservación, el semen se diluye posterior a su colecta en un diluyente que contiene crioprotectores que minimizan la muerte de los espermatozoides durante el congelamiento [45], la dilución es realizada para alcanzar una concentración específica de 10-60 millones de espermatozoides por mililitro [47] [46], posteriormente las dosis de semen son sometidas a un tiempo de equilibrio de 4 horas a 4 °C 16, después de este proceso las dosis son sometidas a vapores de nitrógeno por 10 minutos y consecuentemente son sumergidas en nitrógeno líquido a -196 °C [46].

Análisis seminal asistido por computadora (CASA)

Para evaluar la capacidad fecundante de los espermatozoides se pueden hacer pruebas macroscópicas, microscópicas y análisis computarizado de semen (CASA) [43][44]. Este último análisis mezcla las capacidades de los equipos y le agrega capacidades de software para el análisis de las características del semen. Los análisis mediante CASA tienen la ventaja de medir variables comunes de movimiento de los espermatozoides, pero agrega la posibilidad de estudiar parámetros cinéticos como velocidad y trayectoria; o morfológicos como tamaño. De manera sistemática, la capacidad de sistematización reduce la variación técnica de los análisis y permite realizar análisis cuantitativos sobre las cualidades del semen [43]. Otros análisis más especializados como vitalidad por fluorescencia y fragmentación del ADN de los espermatozoides también son posibles [43]. El uso de análisis CASA en la especie bufalina ha permitido un mayor alcance sobre el conocimiento reproductivo de la especie bufalina, además, las ventajas y constante mejoras que se le atribuyen a esta técnica de análisis hace que sea cada vez más utilizada no solo a nivel investigativo, sino también a nivel productivo[48].

Inseminación artificial (IA)

Esta biotecnología es una de las más investigadas en el mundo, según Vale (2011) esta técnica consiste en introducir una sonda a nivel cervical, la cual deposita el semen en el cuerpo del útero, tanto en vacas como búfalas; no obstante, por las diferencias anatómicas de las búfalas (tamaño del cérvix) se deben tener algunos cuidados especiales cuando se ejecuta.

La IA es además la biotecnología reproductiva más antigua, pero no fue hasta 1955 que se reportó la primera IA en búfalas [32]. En Colombia en 1976 tuvieron las primeras experiencias con esta técnica; sin embargo, se dejó de implementar por un número considerable de experiencias desagradables y fracasos[49]. Vale (2011) recomienda evitar la IA en búfalas, ya que provoca lesiones con sangrado y bajos índices de fertilidad debido a que presentan un cérvix pequeño. Por otro lado, Berdugo (2012), dice que implementar IA es un problema importante en hembras jóvenes, pero que se puede solucionar seleccionando hembras con cérvix grueso y una exhaustiva palpación de la sonda. Inclusive se ha estudiado el rendimiento reproductivo de la IA en ganado bufalino empleando semen sexado [48][50], 117 lo cual indicó tasas de preñez satisfactorias y similares al semen no sexado.

Desde las primeras investigaciones y hasta 2012 la tasa de preñez promedio se ha mantenido en 30%, en términos prácticos quiere decir que se necesitan tres IA para obtener una cría [49]. Por otro lado, la estacionalidad (incluso en el trópico) juega un papel importante en la fertilidad, hay una diferencia de hasta 31% cuando se insemina en época fértil con respecto a la época no fértil. La detección del estro es determinante, ya que los signos de estro no son tan evidente como en vacas *Bos taurus*, lo que conlleva a bajas tasa de fertilidad [32].

Por lo anterior, el uso de un toro marcador se vuelve indispensable para la detección del estro, debido a que el comportamiento homosexual en esta especie es solo de 3,44% [32]. A estos toros se les practica una cirugía para extraerle el epidídimo, por lo que este puede no solamente montar a la hembra, sino que también puede eyacular dentro de la hembra, lo que facilita el transporte de los espermatozoides hacia el sitio de la fertilización después de hacer la IA.

Inseminación artificial a tiempo fijo (IATF)

Esta tecnología busca incrementar los índices de preñez en el hato y está basada en la IA, suprime la detección del estro, ya que la IA es realizada en un momento determinado [9][51]. Con los diferentes protocolos de IATF se logra sincronizar la fase lútea, el crecimiento folicular y la ovulación por medio del suministro de fármacos; cabe destacar que esta tecnología permite incluir a las hembras en anestro post parto y en ausencia o en manifestación del estro [32] [52].

Dentro de los protocolos de sincronización se utiliza la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y las prostaglandinas ($PGF_{2\alpha}$) en días específicos [48] [53] (figura 1). Cabe señalar que para lograr resultados positivos en búfalas es necesario realizarlo en la estación reproductiva favorable debida a su estacionalidad [32]; no obstante, esto conlleva a problemas de abastecimiento de leche en el caso de tratarse de un hato de búfalas. Existen también protocolos de IATF basados en progestágenos y estradioles [54]47 (figura 2), estradioles y prostaglandina [55], o bien estradioles, prostaglandina y GnRH [56], así mismo son utilizados protocolos de resincronización, posterior a la confirmación negativa de la preñez [51] [56], en relación a esto Crudeli y colaboradores (2009) encontraron que se puede lograr una tasa de preñez mayor y significativa en el día 35 (68%) con respecto al Ovsynch (44%). En hembras bufalinas la combinación de las hormonas, GnRH, prostaglandina, gonotropina coriónica equina (eCG) y progestágenos, inducen a una mayor tasa de ovulación y de preñez, comparado a grupos donde se emplean las hormonas anteriores excluyendo eCG [58].



Figura 1. Protocolo de sincronización y resincronización Ovsynch para búfalas (Elaboración propia), basado en [54].



Figura 2. Protocolo de sincronización y resincronización utilizando progestágenos para búfalas.

Aspiración folicular, fertilización in vitro y transferencias de embriones

La producción *in vitro* de embriones se puede realizar en hembras maduras y bubillas con el fin de la recuperación in vivo de los oocitos [59]. Es importante realizar desinfección y lavado de la zona perineal y colocar una inyección epidural previo a la aspiración de los oocitos, ya que la extracción se realiza con una aguja conectada a una bomba de vacío guiada con un ultrasonido por medio de una sonda transvaginal convexa. Es trascendental lavar constantemente el sistema de aspirado con una solución establecida previamente para evitar contaminación [60]. Según Gamarra y colaboradores (2015) el 8% de las veces que se realizó el proceso de aspiración no se obtuvieron oocitos y que del total de los oocitos colectados 92% se clasificaron como viables, de los cuales agregan que es indiferente usar semen sexado o no.

Lo primero que se realiza es un aspirado de oocitos de los ovarios, sean estos del animal en pie [59] [61] o de ovarios colectados tras el sacrificio del animal [59] [62][63], los cuales son colocados en tubos de ensayo con un medio específico, clasificados según calidad A, B, C o D y trasladados al laboratorio [62]. Estos son transferidos a cajas Petri para su maduración y 20 horas después de la aspiración se fertilizan con el semen de preferencia [60] [63]. Las pajillas se descongelan a 37°C por 30 segundos se centrifuga y el pellet se resuspende en un medio específico y así obtener una concentración de 1,5 a 2 millones de espermatozoides/ml. En cada placa Petri con 20 oocitos se coloca una alícuota de 50 µl. Para obtener los cigotos se cultiva por 20-24 horas a 38,5°C, una atmósfera de 5% de CO₂ y 90% de humedad relativa [48] [60].

Los presuntos cigotos se trasladan a un nuevo medio de cultivo [61]. Se hace un cambio de medio 4 días después de la aspiración, ya que no es posible identificar la cantidad de blastómeros característicos de los oocitos de la especie; se hace un segundo cambio de medio a los 6-7 días post-aspiración, donde ya se observan los primeros blastocistos. Cuando alcanzan el crecimiento se congelan para una posterior transferencia directa [60]. Finalmente, los embriones se transfieren a hembras receptoras para ello las hembras se sincronizan con un protocolo de progesterona (P₄), PGF_{2a} y GnRH, luego se evalúa el cuerpo lúteo (CL) con ultrasonido y por último se transfieren al cuerno ipsilateral (en el mismo que tiene el CL) al quinto día posterior al momento en que se definió el estro [49].

La trasferencias de embriones in vivo es un proceso que da inicio con la colocación de hormonas en las hembras donadoras, las cuales presentan características heredables favorables para la producción animal, estas hormonas provocan la superovulación de la hembra, estos óvulos son fertilizados mediante la inseminación de la hembra y posteriormente colectados para ser transferidos a una hembra receptora, la cual se ocupará de llevar el feto a término y que amamantará a la cría hasta su destete [64]. Por otro lado, es importante señalar que se encuentra en estados iniciales los estudios sobre la reproducción bufalina por medio de la clonación [63].

La información expuesta en esta sección fue compilada de otros países latinoamericanos, Costa Rica podría tecnificar la actividad por medio de estas tecnologías y con ello generar información de su empleo en las condiciones específicas del país, para así ponerla a disposición de los productores actuales como de los potenciales.

Conclusiones

La especie bufalina aporta a nivel mundial productos cárnicos y lácteos, la bufalocultura ofrece ventajas competitivas a nivel productivo y de crecimiento de la economía, siendo el manejo reproductivo de importancia para la optimización de la producción, debe ampliarse el estudio y producción en hatos bufalinos como opción al cambio climático y combate de la pobreza. La presente investigación literaria realiza aportes al campo de estudio de la reproducción animal,

primeramente por desarrollar el tema de hatos bufalinos en condiciones tropicales, tópico escasamente abordado y registrado por los investigadores costarricense. Posteriormente el presente documento, incluye tanto información sobre manejo de la hembra y macho bufalino en un solo texto, reflejando la integralidad que representa el manejo de estos dos componentes para el equilibrio en la reproducción y con ello en la productividad. Adicionalmente, el registro de las biotecnologías reproductivas tradicionales, actuales y emergentes, brinda información valiosa al lector, sobre la introducción de estas biotecnologías en los hatos bufalinos costarricenses, las ventajas, requerimientos y funcionamiento de las mismas.

Referencias

- [1] A. Borghese y M. Mazzi, "Buffalo population and strategies in the world," en Buffalo production and research, Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2005.
- [2] W. G. Vale, "Effects of environment on buffalo reproduction," *Ital. J. Anim. Sci.*, vol. 6, no. 2, pp. 130-142, ene. 2007, doi: 10.4081/ijas.2007.s2.130.
- [3] R. Rosales, "Situación del búfalo de agua en Costa Rica," *Tecnol. Marcha*, vol. 24, no. 5, pp. 19-24, nov. 2011.
- [4] A. Aggarwal y R. Upadhyay, "Heat Stress and Reproduction, Heat Stress and Animal Productivity". Springer: India, 2013.
- [5] R. R. Rosales Rodríguez y R. WingChing-Jones, "Sistemas de producción bufalinos en Costa Rica. I. Cuantificación de la población y caracterización de los sistemas," *Agron. Costarric.*, vol. 31, no. 2, pp. 65-69, abr. 2007.
- [6] F. Napolitano, P. Corrado, F. Grasso, A. Braghieri, y G. Rosa, "The behaviour and welfare of buffaloes (*Bubalus bubalis*) in modern dairy enterprises," *Animal*, vol. 7, no. 10, pp. 1704-1713, oct. 2013.
- [7] A. S. Nanda, P. S. Brar, y S. Prabhakar, "Enhancing reproductive performance in dairy buffalo: major constraints and achievements," *Reprod. Suppl.*, vol. 61, pp. 27-36, 2003.
- [8] J. A. Sánchez, M. H. Romero y Y. J. Suárez-Vela, "Estacionalidad Reproductiva de la Hembra Bufalina (*Bubalus bubalis*)," *Rev Inv Vet Perú*, vol. 3, no. 28, pp. 606-618, jul. 2017.
- [9] J. Motta-Giraldo, I. Waktero-García, M. Abeledo-García, I. Miranda y R. Campos-Pipaon, "Principales trastornos reproductivos en búfalas y vacas en hatos mixtos y de una especie en el departamento de Caquetá, Colombia," *Rev. Med. Vet. Zoot.*, vol. 61, no. 3, pp. 228-240, set.-dic. 2014.
- [10] R. Rodrigues, E. M. Moreira, J. E. Ferreira, R. C. Soares Reis y M. R. Bourg, "Biotécnicas da reprodução aplicada aos bubalinos (*Bubalus Bubalis*)," *PUBVET*, vol. 12, no. 10, pp. 1-16, oct. 2018.
- [11] Y. Almaguer Pérez, "El búfalo, una opción de ganadería," *REDVET*, vol. 8, no. 8, pp. 1-23, ago. 2007.
- [12] J. Marques, N. Zoccal, y M. Figueiró, "Manejo reproductivo de búfalos con o uso de biotécnicas da reprodução," *Embrapa Amaz. Orient.*, vol. 3, pp. 443-472, may. 2019.
- [13] Z. Jara, "Salud de hato: definición y estrategias para el establecimiento de programas de medicina veterinaria preventiva," *Rev. la Fac. Med. Vet. y Zootec.*, vol. 56, no. 3, pp. 147-167, nov. 2009.
- [14] A. Calderón, V. Tique, C. Ensuncho, y V. Rodríguez, "Seroprevalencia de *Brucella abortus* en búfalos de agua (*Bubalus bubalis*) en el municipio de Lorica, Córdoba," *MVZ, M.Sc. Univ. Córdoba, Fac. Med. Vet. y Zootec. Inst. Investig. Biológicas del Trópico. Sede Berástegui*, vol. 13, no. 2, pp. 125-132, dic. 2010.
- [15] D.M. Bulla-Castañeda, D.J. García-Corredor y M.O. Pulido-Medellín, "Leucosis Enzootica Bovina, Revisión sistemática de literatura". *Rev. Pensamiento y Acción*, vol. 25, pp. 7-18, jul-dic. 2019
- [16] Á. J. Aguilar Setién, "El virus de la rinotraqueítis infecciosa bovina," *Cienc. Vet.*, vol. 4, pp. 123-134, 2007.
- [17] R.A. Jacobo, M.F. Cipolini, D.E. Martínez, M. Dellamea y M.G. Draghi, "Identificación de serovares de *Leptospira* sp. en búfalos de Corrienes, Argentina," *Red.vet.*, vol. 34, no. 2, pp. 126-227, 2009.
- [18] G. A. Bavera, "Razas de bovinas y búfalos de la Argentina," Iberti-Ibara: Argentina, 2011.
- [19] G. Crudeli, "Fisiología reproductiva de la búfala," *Rev. Vet. Argentina*, vol. 24, no.5 pp. 94-81, nov. 2011.
- [20] R.G.A. Pereira, Townsend, C.R. Costa, N.L., "Eficiência reprodutiva de búfalos", Embrapa: Embrapa Rondônia, 2007.
- [21] O. M. Ohashi, M. dos S. Miranda, M. da S. Cordeiro, y S. do S. D. Santos, "Desenvolvimento reproductivo do macho bubalino: circunferência escrotal, atividade espermática e endocrinologia," *Rev. Bras. Reprodução Anim.*, vol. 31, no. 3, pp. 299-306, set. 2007.

- [22] W. Vale, "Avances biotecnológicos en reproducción de búfalo," *Tecnología en Marcha.*, vol. 24, no. 5 pp. 89-104 2011.
- [23] S. A. Canizales, U. Zulia, y F. D. C. Veterinarias, "Características seminales del Búfalo de agua (*Bubalus bubalis*)," *Rev. Colomb. Cienc. Anim., RECIA*, vol. 4, no. 1, pp. 95-102, 2011.
- [24] S. Singh, "Semen Production in Buffalo Bulls," *Buffalo Bull.*, vol. 32, no. 1, pp. 277-284, 2013.
- [25] S. S. Paul, "Nutrient requirements of buffaloes," *Rev. Bras. Zootec.*, vol. 40, pp. 93-97, enero 2011.
- [26] A. Singh, S. Rajak, P. Kumar, S. Kerketta, y R. Yogi, "Nutrition and bull fertility: A review," *J. Entomol. Zool. Stud.*, vol. 6, no. 6, pp. 635-643, 2018.
- [27] M. El-Sharawy, E. Eid, S. Darwish, I. Abdel-Razek, M. R. Islam, K. Kubota, N. Yamauchi, y I. El-Shamaa, "Effect of organic and inorganic selenium supplementation on semen quality and blood enzymes in buffalo bulls," *Anim. Sci. J.*, vol. 88, no. 7, pp. 999-1005, jul. 2017, doi: 10.1111/asj.12736.
- [28] M. Eghbali, S. M. Alavi-Shoushtari, S. Asri-Rezaei, y M.-H. Khadem Ansari, "Calcium, Magnesium and Total Antioxidant Capacity (TAC) in Seminal Plasma of Water Buffalo (*Bubalus bubalis*) Bulls and their Relationships with Semen Characteristics," *Vet. Res. Forum.*, vol. 1, no 1, pp. 12-20, jun. 2010.
- [29] P. Singh, B. P. Sengupta, y V. N. Tripathi, "Effect of supplemental amino acid feeding on sexual behaviour, quality and freezability of buffalo bull semen," *J. Buffalo Sci.*, vol. 16, no. 1, pp. 41-46, ene. 2000.
- [30] A. Espitia, D. Montes Vergara, E. Hernández, y H. Sfeir B, "Circunferencia escrotal y parámetros morfométricos en machos *Bubalus bubalis* de la raza Murrah," *Rev. Colomb. Cienc. Anim. RECIA*, vol. 9, no. 1, pp. 73, jun. 2017.
- [31] J. A. Sánchez, M. H. Romero y A. F. Meneses, "Dinámica folicular durante el ciclo estral natural en búfalas (*Bubalus bubalis*)," *Rev. investig. vet. Perú.*, vol. 30, no. 1, mar. 2019.
- [32] W. Vale, "Reproducción en hembras bufalinas: inseminación artificial y reproducción asistida," *Tecnol. Marcha*, vol. 24, no. 5, pp. 5-18, nov. 2011.
- [33] N. Montiel-Urdaneta, "Algunos aspectos reproductivos e inseminación artificial en búfalas," en X Seminario de Pastos y Forrajes, Maracaibo, 2006, pp. 174-186.
- [34] J. Motta-Giraldo, I. Waltero-García y M. Abeledo, "Prevalencia de anticuerpos al virus de la diarrea viral bovina, Herpesvirus bovino 1 y Herpesvirus bovino 4 en bovinos y búfalos en el Departamento de Caquetá, Colombia," *Rev. Salud Anim.*, vol. 35, no. 3, pp. 174-181, dic. 2013.
- [35] F. Napolitano, P. Corrado, F. Grasso, A. Braghieri, y G. Rosa, "The behaviour and welfare of buffaloes (*Bubalus bubalis*) in modern dairy enterprises," *Ital. J. Anim. Sci.*, vol. 7, no. 10, pp. 1704-1713, oct. 2013.
- [36] M. S. Qureshi, "Nutritional and Management Support to Reproduction in Dairy Buffaloes Under Tropical Conditions," *Pak. J Zool Suppl Ser*, no. 9, pp. 895-909, ene. 2009.
- [37] M. Sarwar, M. A. Khan, M. Nisa, S. A. Bhatti, y M. S. Shahzad, "Nutritional Management for Buffalo Production," *Asian-Australas. J. Anim. Sci.*, vol. 22, no. 7, pp. 1060-1068, jul. 2009.
- [38] S. Terramoccia, S. Bartocci, y A. Borghese, "Nutritional requirements in buffalo cows and heifers," en Buffalo production and research, Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2005, pp. 145-160.
- [39] T. Bülbül, "Energy and Nutrient Requirements of Buffaloes," *Kocatepe Vet. J.*, vol. 3, no. 2, pp. 55-64, 2010.
- [40] M. S. Qureshi, G. Habib, H. A. Samad, M. M. Siddiqui, N. Ahmad, y M. Syed, "Reproduction-Nutrition Relationship in Dairy Buffaloes. I. Effect of Intake of Protein, Energy and Blood Metabolites Levels," *Asian Australas. J. Anim. Sci.*, vol. 15, no. 3, pp. 330-339, 2002, doi: 10.5713/ajas.2002.330
- [41] A. J. Mendes y C. de Lima-Francisco, "Aspectos nutricionales del búfalo," *Rev. Tecnol. En Marcha*, vol. 24, no. 5, pp. 105-120, nov. 2011.
- [42] B. S. Punia y S. Singh, "Buffalo calf feeding and management," *Buffalo Bull.*, vol. 20, no. 1, pp. 3-11, 2001.
- [43] A. Valverde y M. Madrigal-Valverde, "Sistemas de análisis computadorizado de semen en la reproducción animal," *Agron. Mesoam.*, vol. 29, no. 2, pp. 469-484, ago. 2018, doi: doi:10.15517/ma.v29i2.30613.
- [44] S. E. Canizales, "Características seminales del Búfalo de agua (*Bubalus bubalis*)," *RECIA*, vol. 4, no. 1, pp. 95-102, 2011.
- [45] S. Akhter, M.S. Ansari, B.A. Rakha, S.M.H. Andrabi, M. Khalid, y N. Ullah, "Effect of low lipoprotein and fertility of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull semen," *Theriogenology*, vol. 76, no. 4, pp. 759-764, set. 2011.
- [46] S. Akhter, M.S. Ansari, B.A. Rakha, S.M.H. Andrabi, S. Iqbal, N. Ullah, "Cryopreservation of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen in Bioxcell R extender," *Theriogenology*, vol. 74, no. 6, pp. 951-955, jun. 2010.

- [47] Colegio Brasileiro de Reproducao Animal (CBRA), "Manual para examen andrológico e avaliacao de semen animal," 3ed. CBRA, Belo Horizonte, p. 46, 2013.
- [48] A. Gaviraghi, R. Puglisi, D. Balduzzi, A. Severgnini, V. Bornaghi, A. Frana, L.M. Gandini, A. Lukaj, C. Bonacina, A. Galli, "Minimum number of spermatozoa per dose in Mediterranean Italian buffalo (*Bubalus bubalis*) using sexed frozen semen and conventional artificial insemination," *Theriogenology*, vol. 79, no. 8, pp. 1171-1176, mar. 2013.
- [49] J. A. Berdugo, "Historia de la aplicación de biotecnologías reproductivas en la cría del búfalo en Colombia," *Uni-pluri/versidad*, vol. 12, no.3, pp. 87-91, abr. 2013.
- [50] G. Campanile, B. Gasparini, D. Vecchio, G. Neglia, E. M. Senatore, A. Bella, G. A. Presicce, L. Zicarelli, "Pregnancy rates following AI with sexed in Mediterranean Italian buffalo heifers (*Bubalus bubalis*)," *Theriogenology*, vol. 76, no. 3, pp. 500-506, abr. 2011.
- [51] G. Neglia, M. Capuano, A. Balestrieri, R. Cimmino, F. Iannaccone, F. Palumbo, G.A. Presicce, y G. Campanile, "Effect of consecutive re-synchronization protocols on pregnancy rate in buffalo (*Bubalus bubalis*) heifers out of the breeding season," *Theriogenology*, vol. 113, pp. 120-126, feb. 2018.
- [52] G. A. Crudeli, R. L. De La Sota, R. E. Scarnatto, J. L. Konrad, y E. M. Patiño, "Tasa de preñez en búfalas sometidas a distintos protocolos de inseminación artificial a tiempo fijo en el nordeste argentino," *Rev. Med. Vet. Zoot*, vol. 20, no. 1, pp. 41-44, jul. 2009.
- [53] B.D.S. Nahúm, N.Z. Soraiva, C. Faturi, A.G. M.E. Silva, J.D.B. Lourenco Junior, J.S.D. Souza, J.M.D. Amaral Junior, G.D.P. Nogueira, y G.Z. Mingoti, "Effect of dietary supplementation of palm kernel cake on ovarian and hepatic function in buffalo (*Bubalus bubalis*)," *Anim. Reprod. Sci.*, vol. 204, pp. 76-85, may. 2019.
- [54] F. Gamarra, V. Rendón, A. Chávez, L. Perez, W. Cardona, y J. Berdugo, "Establishing an in-vitro production program for buffalo embryos (*Bubalus bubalis*) in Colombia," *Rev. MVZ Córdoba*, vol. 20, no. 1, pp. 4495-4504, ene. 2015.
- [55] M. Honparkhe, V.K. Gandotra, J.S. Matharoo, S.P.S. Ghuman, D. Dadarwal, y J. Singh, "Synchronization of follicular wave emergence following ultrasound-guided transvaginal follicle ablation or estradiol-17B administration in water buffalo (*Bubalus bubalis*)," *Anim. Reprod. Sci.*, vol. 146, pp. 5-14, abr. 2014.
- [56] R. Mirmahmoundi, M. Soury, y B.S. Prakash, "Endocrine changes, timing of ovulation, ovarian follicular growth and efficacy of a novel protocol (Estradodoublesynch) for synchronization of ovulation and timed artificial insemination in Murrah buffaloes (*Bubalus bubalis*)," *Theriogenology*, vol. 82, no. 7, pp. 237-242, oct. 2014.
- [57] U. Arshad, A. Qayyum, M. Hassan, A. Husnain, A. Sattar, N. Ahmad, "Effect of resynchronization with GnRH or progesterone (P4) intravaginal device (CIDR) on Day 23 after timed artificial insemination on cumulative pregnancy and embryonic losses in CIDR-GnRH synchronized Nili-Ravi buffaloes," *theriogenology*, vol. 103, pp. 104-109, nov. 2017.
- [58] K. Murugavel, D. Antoine, M. S. Ragu, y F. López-Gatius, "The Effect of addition of equine chorionic gonadotropin to a progesterone-based estrous synchronization protocolo in buffalo es (*Bubalus bubalis*) under tropical conditions," *Theriogenology*, vol. 71, no. 7, pp. 1120-1126, abr. 2009.
- [59] J. G. S. D. Carvalho, N. A. T. D. Carvalho, B. M. Bayeux, Y. F. Watanabe, O. Y. Watanabe, R. D. Mingoti, y P. S. Baruselli, "Superstimulation prior to the ovum pick-up improves the in vitro embryo production in nulliparous, primiparous and multiparous buffalo (*Bubalus bubalis*) donors," *Theriogenology*, vol. 138, pp. 164-168, oct. 2019.
- [60] M. D. Quintana, P. Herrera, B. Ramos, y F. Agüero, "Biotecnología reproductiva aplicada a la mejora genética de *Bubalus bubalis* en Cuba," *Rev. Salud Anim.*, vol. 40, no. 3, pp. 1-5, dic. 2018.
- [61] L. U. Gimenes, M. L. Ferraz, P. Fantinato-Neto, M. R. Chiaratti, L. G. Mesquita, M. F. Sá Filho, F. V. Meirelles, L. A. Trinca, F. P. Rennó, Y. F. Watanabe, y P. S. Baruselli, "The interval between the emergence of pharmacologically synchronized ovarian follicular waves and ovum pickup does not significantly affect embryo production in *Bos indicus*, *Bos Taurus*, and *Bubalus bubalis*," *Theriogenology*, vol. 83, no. 3, pp. 385-393, feb. 2015.
- [62] S. Kumar, S.K. Singla, R. Manik, P. Palta, y M.S. Chauhan, "Effect of basic fibroblast growth factor FGF2) on cumulus cell expansion, in vitro embryo production and gene expression in buffalo (*Bubalus bubalis*)," *Reprod. Biol.*, vol. 20, no. 4, pp. 501-511, dic. 2020.
- [63] S. Shyam, P. Goel, D. Kumar, S. Malpotra, M. K. Singh, S. S. Lathwal, S. Chand, y P. Palta, "Effect of Dickkopf-1 and Colón y stimulating factor-2 on the developmental competente, quality, gene expression and live birth rate of buffalo (*Bubalus bubalis*) embryo produce by hand-made cloning," *Theriogenology*, vol. 157, pp. 254-262, nov. 2020.
- [64] P.S. Baruselli, J.G.S.D. Carvalho, F.M. Elliff, J.C.B.D. Silva, D. Chello, y N.A.T.D. Carvalho, "Embryo Transfer in buffalo (*Bubalus bubalis*)," *Theriogenology*, vol. 150, pp. 221-228, jul. 2020.