

Capítulo LXXXII

Inseminación artificial en búfalas

Nelcio Antonio Tonizza de Carvalho
Júlia G. Soares

Entre las principales biotecnologías empleadas en las especies domésticas, podemos mencionar la inseminación artificial (IA) como una herramienta importante para la difusión de material genético superior de origen paterno. Sin embargo, el uso de esta técnica en la forma convencional, es decir, mediante la observación del celo, tiene dos problemas importantes en búfalas. El primero está relacionado con el comportamiento del celo en sí, que en esta especie es más discreto, lo que dificulta su detección. El segundo, se relaciona directamente con el primer factor y se debe a la baja tasa de servicios obtenida en búfalas de agua sometidas a IA, lo que conlleva a que la eficiencia reproductiva del rebaño se vea comprometida y a que el uso de la técnica fracase. Además, es importante destacar que los búfalos criados en regiones alejadas del ecuador son estacionales y solo muestran actividad reproductiva durante los meses de otoño e invierno.

Por lo tanto, el uso de programas de manejo reproductivo que no requieren la detección del celo contribuye al aumento de la eficiencia de la AI, debido principalmente a la facilidad de implementación de esta técnica. Los objetivos de estos programas son la sincronización de la fase lútea, del crecimiento folicular y de la ovulación, lo que permite que la IA se aplique a todos los animales de la finca, incluso en aquellos que manifiestan signos de ciclicidad o de estro.

PROTOCOLOS DE SINCRONIZACIÓN DE LA OVULACIÓN

El estro y/o la ovulación puede ser inducida en los búfalos por medio de un tratamiento hormonal (ver revisión de Baruselli *et al.*, 2007; Campanile *et al.*, 2010). Ante este escenario, grupos de investigación de todo el mundo llevaron a cabo diversos estudios para evaluar la eficacia de los protocolos de sincronización de la ovulación para la IA a tiempo fijo (IATF) en búfalos (Baruselli, 1999a, 1999b; Campanile *et al.*, 2005; Baruselli *et al.*, 2007). El uso de IATF es una ventaja, ya que la IA puede programarse para momentos determinados del día, lo que simplifica el manejo empleado en los programas tradicionales de IA. Sin embargo, la cría estacional observada en los búfa-

los puede interferir con la eficiencia de la sincronización de la ovulación al utilizar los protocolos para IATF.

Durante el periodo de anestro estacional, las búfalas no tienen comportamiento de estro ni ovulan, y por consiguiente, el ovario no produce progesterona (P_4), como tampoco se produce crecimiento de folículos ovulatorios. Además, las vacas en anestro tienen insuficiente liberación pulsátil de la hormona luteinizante (LH) como para estimular las etapas finales del desarrollo folicular y la ovulación (Yavas & Walton, 2000), lo que limita la eficacia de los protocolos de IATF (Baruselli *et al.*, 2004). Por lo tanto, es importante dominar cuales de los diferentes protocolos deben ser usados de acuerdo con la temporada de reproducción y con el estado de la ciclicidad de los rebaños bufalinos.

Sincronización de la ovulación e IATF durante la temporada de reproducción (otoño e invierno)

Se han desarrollado diversos estudios para evaluar la eficacia del protocolo Ovsynch en búfalas: día 0, hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH); día 7, prostaglandina F₂alfa ($PGF_{2\alpha}$); día 9, GnRH; e IATF 16 horas después de la segunda dosis de GnRH (Baruselli *et al.*, 1999a, 1999b). En estos estudios, se confirmó que los búfalos responden al tratamiento hormonal y que una nueva onda folicular emerge debido a la ovulación del folículo dominante presente en el momento de aplicación de la primera dosis de GnRH. En el día 7, los búfalos responden a la $PGF_{2\alpha}$ (luteólisis), y para el día 9, aproximadamente el 80% de los animales logran sincronizar la ovulación dentro de 12 h. Tasas de preñez de alrededor del 50% pueden ser obtenidas en los búfalas cíclicas (con presencia de cuerpo lúteo, CL); sin embargo, la tasa de preñez se ve influenciada por la condición corporal (CC) obteniéndose buena eficiencia con una $CC \geq 3,5$ (en una escala de 1 a 5), al igual que por la paridad, al observar que las primíparas son menos eficientes que las múltíparas, y también por la época del año, ya que en este protocolo las mejores tasas de preñez se obtienen durante en el otoño y el invierno en comparación con la primavera y el verano.

Con el objetivo de evaluar nuevas alternativas para la sincronización de la ovulación con gonadotropinas en búfalos, se han llevado a cabo otros estudios para estudiar el efecto de la sustitución de la segunda inyección de GnRH del protocolo Ovsynch por LH (Bereber *et al.*, 2002) o por la hormona coriónica humana (hCG) (Carvalho *et al.*, 2004). Estas hormonas podrían mejorar la ovulación y por lo tanto la eficiencia del protocolo, ya que actúan directamente sobre el folículo (GnRH estimula a la glándula hipofisaria para que libere LH endógena). Si hay déficit de LH en la hipófisis, la GnRH no provocará la liberación de LH y, por lo tanto, no habrá ovulación. En estos experimentos, no hubo diferencias en las tasas de preñez después de la IATF, tanto para la LH como para la hCG, en comparación con el tratamiento con GnRH. Por lo tanto, no se confirmó la hipótesis inicial.

Otro estudio evaluó la efectividad de un dispositivo intravaginal con P_4 asociado con el protocolo Ovsynch (Baruselli *et al.*, 2003b). Se supone que el uso de P_4 exógena podría mantener altas concentraciones plasmáticas de P_4 durante el tratamiento, y por lo tanto, mejorar la sincronización de la ovulación con un consiguiente aumento

de la tasa de preñez. No obstante, los autores encontraron que la adición de P_4 al protocolo Ovsynch no aumentó la tasa de preñez en las búfalas inseminadas, por lo cual no fue confirmada la hipótesis inicial.

En un intento de reducir los costos de tratamiento, se realizó un estudio para evaluar la eficacia de la aplicación de $\frac{1}{2}$ dosis de $PGF_{2\alpha}$ en el protocolo Ovsynch (Baruselli *et al.*, 2003d). La tasa de preñez no fue influenciada por la dosis de $PGF_{2\alpha}$, observándose que 88,6% de los búfalas del grupo que recibió $\frac{1}{2}$ dosis y 90,0% de las tratadas con la dosis total experimentaron luteólisis. De acuerdo con estos resultados, la dosis recomendada de $PGF_{2\alpha}$ se puede reducir en un 50%, lo que disminuye los costos del protocolo Ovsynch para IATF en búfalos. Sin embargo, el tamaño correcto de la aguja y la jeringa, así como la precisión de la administración de pequeñas dosis de hormonas pueden determinar la eficiencia del protocolo.

En el mismo sentido, se reportaron mayores tasas de preñez y nacimientos en las búfalas que recibieron una dosis de GnRH 6 días después de la IATF en el protocolo Ovsynch (Carvalho *et al.*, 2007a) La administración adicional de GnRH indujo la formación de CL accesorios, que según Campanile *et al.* (2010) y Marques *et al.* (2012) aumentaron la concentración plasmática de P_4 que resultó en un efecto positivo sobre la preñez y nacimientos. Los estudios han demostrado que la P_4 controla la función y el sistema de secreción glandular uterina (Spencer *et al.*, 2004), que es importante para la nutrición y el desarrollo del embrión (Mann *et al.*, 1999). Por lo tanto, la inducción de CL accesorios en las búfalas es una alternativa para aumentar la eficiencia del protocolo Ovsynch.

Sin embargo, cuando se utilizó el protocolo Ovsynch en primavera y verano, período de alta incidencia de anestro en búfalas, se obtuvieron tasas de preñez entre 6,9% (Baruselli *et al.*, 1999b) y 28,2% (Baruselli *et al.*, 2002), lo que indica una baja eficiencia del protocolo en esta época del año. Debido a estos resultados se llevaron a cabo otros estudios para viabilizar la utilización de un protocolo hormonal que aumente la tasa de preñez en búfalas en anestro estacional bajo IATF (Baruselli *et al.*, 2002; 2003a; Bartolomeu, 2003; Porto Filho, 2004; Porto Filho *et al.*, 2004a,b; Carvalho *et al.*, 2005; 2007a,b,c,d),

Sincronización de la ovulación e IATF durante la estación reproductiva desfavorable (primavera y verano)

El uso de progestágenos en protocolos de sincronización promueve un aumento en la frecuencia de pulso de LH durante y después del tratamiento para inducir la ovulación (Rhodes *et al.*, 2002). El tratamiento de vacas en anestro con P_4 resultó en una mayor producción de líquido folicular, mayores concentraciones circulantes de estradiol (E_2), incremento de la secreción pulsátil de LH y aumento de los receptores de LH en las células de la granulosa y una teca de folículos preovulatorios, en comparación con los animales no tratados (Rhodes *et al.*, 2003). Además, conociendo que un corto período con una concentración elevada de P_4 durante el anestro es importante para la expresión del estro y para lograr una función luteal normal (McDougall *et al.*, 1992), se planteó la hipótesis de que la exposición de búfalas en anestro a la P_4 puede estimular el desarrollo y la maduración de un folículo dominante, aumentando la li-

beración de LH y estimulando la expresión de receptores de LH y la secreción de E_2 , y en consecuencia, promover la ovulación.

Existen varios dispositivos intravaginales de liberación lenta de P_4 , con diferentes concentraciones (0,5 a 1,9 g de P_4) disponibles en el mercado. Estos dispositivos contienen P_4 natural y proporcionan concentraciones sanguíneas de 4 a 5 ng/mL de P_4 durante su uso. Dosis bajas de progestágeno sintético como 3 a 6 mg norgestomet, se han utilizado en implantes subcutáneos, siendo más potentes que la P_4 natural.

No obstante, a pesar de que la P_4 es capaz de inducir la ciclicidad posparto, la eficacia de este tratamiento puede verse comprometido en rebaños con una alta proporción de vacas en anestro, con deficiente CC, o con ambas cosas. Por lo tanto, la administración adicional de gonadotropinas con el fin de mejorar el soporte de LH podría incluirse en estos protocolos de sincronización. Por esa razón, la administración de la gonadotropina coriónica equina (eCG) en el momento del retiro de los dispositivos de P_4 también se ha sugerido como alternativa para aumentar la tasa de preñez en los programas de IATF para búfalas con alta prevalencia de anestro (Baruselli *et al.*, 2007; Carvalho *et al.*, 2013).

La eCG tiene actividad tanto de FSH como de LH y su administración parenteral estimula el crecimiento folicular y la ovulación en el ganado bovino (Soumano & Price, 1997). La inserción de implantes subcutáneos de norgestomet o de dispositivos intravaginales de P_4 , combinados con eCG en el momento del retiro de los implantes o de los dispositivos intravaginales han sido ampliamente utilizados en los rebaños *Bos indicus* con alta incidencia de anestro posparto (revisado por Baruselli *et al.*, 2004). De ahí que, la aplicación de 400 UI de eCG al momento retirar la fuente exógena de P_4 dio lugar a aumentos en la ovulación y en la preñez en vacas sin CL al inicio del protocolo (Baruselli *et al.*, 2003c, 2004; Sá Filho *et al.*, 2010).

Los protocolos desarrollados para búfalas con P_4 o progestágenos consisten en la inserción de un dispositivo intravaginal de P_4 o un implante auricular de norgestomet, asociados con la inyección intramuscular de benzoato de estradiol (BE) en un día aleatorio del ciclo estrual (día 0). Posteriormente, el día 9, se retira el dispositivo o implante y se administran dosis intramusculares de $PGF_{2\alpha}$ y eCG. Luego de 48 horas, la ovulación es inducida por la administración de hCG o GnRH. La IATF se realiza 16 horas más tarde (Baruselli *et al.*, 2003a; Carvalho *et al.*, 2007b).

La combinación de P_4 o progestágeno con BE el inicio del protocolo es efectivo para inducir la emergencia de una nueva onda folicular debido a la supresión de las hormonas FSH y LH, lo que posteriormente promoverá la atresia de todos los folículos presentes en los ovarios de las vacas (revisado por Bó *et al.*, 2003) y de las búfalas (revisado por Baruselli *et al.*, 2007).

Para verificar la eficiencia y la importancia del uso de la eCG en el protocolo anterior, se realizó un estudio con búfalas lactantes que recibieron o no una dosis de eCG, encontrando que el tratamiento con eCG en el momento de retirar el dispositivo intravaginal de P_4 proporcionó una respuesta ovulatoria satisfactoria y aumentó la eficiencia reproductiva de las búfalas en anestro estacional (Carvalho *et al.*, 2013).

En otro estudio se demostró que tanto el dispositivo intravaginal de P_4 como el implante de norgestomet proporcionaron una satisfactoria respuesta folicular y de la

tasa de preñez en búfalas acíclicas (Carvalho *et al.*, 2007c). Sin embargo, la respuesta al tratamiento parece depender de algunos factores relacionados con la “profundidad” del anestro, como la estacionalidad, CC, edad y el intervalo entre partos.

Adicionalmente, se ha observado que las concentraciones bajas de P_4 en los dispositivos intravaginales reutilizados fueron eficaces para controlar el crecimiento folicular, al proporcionar satisfactorias tasas de preñez en las búfalas sometidas a protocolos de sincronización de la ovulación e IATF (Carvalho *et al.*, 2014).

Con respecto a la inducción de la ovulación en los protocolos de IATF en búfalos, es conocido que el uso de GnRH reduce el costo del protocolo, en comparación con la hCG y de la misma forma, el BE lo es con respecto a la GnRH. Esa información, permitió estudiar la eficiencia de diferentes inductores de la ovulación (hCG, GnRH o EB) sobre la dinámica folicular (Carvalho *et al.*, 2005; 2012) y la tasa de preñez (Carvalho *et al.*, 2007b; 2012). Los resultados obtenidos indicaron que el uso de GnRH para reemplazar la hCG y de BE para sustituir la GnRH, proporcionaron satisfactorias respuestas foliculares y de la tasa de preñez, además de permitir reducir el costo del protocolo para la IATF.

Sincronización de la ovulación para IATF durante todo el año en búfalos

En la actualidad, es posible sincronizar la ovulación para IATF durante todo el año con una eficiencia satisfactoria, incluso en países y regiones donde los búfalos presentan evidente estacionalidad reproductiva. Con el uso del protocolo Ovsynch durante la temporada reproductiva favorable y P_4 o progestágeno + BE + PGF2a + eCG + hCG o GnRH o BE como protocolo de desestacionalización para la estación reproductiva desfavorable (anestro) es posible obtener aproximadamente el 50% de fertilidad, tanto en otoño e invierno como en primavera y verano. Esta tecnología permite asociar el uso de la IA con la desestacionalización de los partos, lo cual contribuye a evitar su concentración y de la producción de leche durante épocas determinadas, lo que afectaría el abastecimiento de la demanda industrial de leche de búfala durante todo el año.

INSEMINACIÓN ARTIFICIAL A TIEMPO FIJO EN NOVILLAS

Aun cuando se han obtenido resultados prometedores con el uso de la IATF en búfalas adultas (primíparas y múltiparas) son pocos los estudios que implican el uso de esta biotecnología en novillas bufalinas (buvillas). En estudios recientes en bubillas se utilizó un aplicador o pistola uterina desarrollada para la IA de ovejas y cabras (Carvalho *et al.*, 2010a). Esta adaptación se realizó debido al menor grosor de este instrumento en comparación con el aplicador convencional. El diámetro del cuello del útero de las buvillas es muy pequeño, tanto que no permite el paso de los aplicadores convencionales de semen utilizados para vacas y búfalas adultas, lo que impide la IA de esta categoría de animales. Este estudio demostró que el aplicador o pistola de semen para ovinos y caprinos fue eficaz para atravesar el conducto cervical en el 100% de las buvillas, lo que posibilita su uso en esta especie. Asimismo, como el costo de este instrumento no impide su uso rutinario en el campo, es posible aplicarlo a gran escala, ampliando así esta línea de investigación recientemente iniciada.

Carvalho *et al.* (2007a,d) evaluaron la efectividad del tratamiento con norgestomet + BE, seguido de eCG + PGF_{2α} y GnRH en comparación con el protocolo Ovsynch, demostrando que el protocolo para inducir la ciclicidad reproductiva resultó satisfactorio en la respuesta folicular y la fertilidad en las buvillas sometidas a IATF durante la temporada de anestro; sin embargo, también se confirmó que el protocolo Ovsynch no fue eficiente en las buvillas en esta temporada, confirmando lo observado en las búfalas adultas.

Al ser evaluada la utilización de un dispositivo intravaginal de P₄ y del implante subcutáneo de norgestomet (Carvalho *et al.*, 2011), se encontró que ambos protocolos hormonales proporcionaron una respuesta folicular y una tasa de preñez satisfactorias en las buvillas manejadas bajo un programa de IATF durante la temporada reproductiva desfavorable.

Asimismo, se evaluó la eficiencia de diferentes inductores de la ovulación (BE o GnRH) para su uso en protocolos de IATF (Carvalho *et al.*, 2010b; Nichi *et al.*, 2011); el tratamiento con P₄ + EB (día 0), seguido de la administración de eCG + PGF_{2α} (día 9) y la inducción de la ovulación con BE y GnRH en el día 11 (Carvalho *et al.*, 2010b) o BE en el día 10 y GnRH en el día 11 (Nichi *et al.*, 2011), resultaron en una satisfactoria respuesta folicular y de la tasa de ovulación, por lo cual su uso está indicado en la sincronización de la ovulación y la IATF en buvillas durante la temporada reproductiva desfavorable.

CONCLUSIONES

El uso de la IA hace posible la introducción de material genético mejorador en los rebaños bufalinos. Sin embargo, la estacionalidad reproductiva, además del tiempo y esfuerzo gastados para la detección del estro, limitan la aplicación a gran escala y el éxito de esta tecnología. La incorporación de técnicas concebidas para controlar la dinámica de las ondas de crecimiento folicular y la ovulación ha reducido los problemas asociados con la detección del estro.

El desarrollo folicular puede ser controlado mediante tratamiento hormonal como el Ovsynch, cuyo protocolo ha producido tasas de preñez satisfactorias después de la IATF en las búfalas cíclicas durante la temporada reproductiva favorable.

Los protocolos para inducir la desestacionalización proporcionan la oportunidad para la aplicación de la IATF en la estación reproductiva desfavorable, promoviendo la ovulación y el reinicio de los ciclos estruales en las búfalas en anestro. En la actualidad, la IATF puede ser utilizada durante todo el año, lo que ayuda a evitar la concentración de los partos y de la producción de leche en determinados períodos, favoreciendo el agronegocio con búfalos.

El uso de esta biotecnología en buvillas aumentará el progreso genético en las operaciones bufalinas comerciales, ya que en un proceso continuo de selección y mejora genética, las vaquillas son consideradas de gran importancia en el rebaño. Por lo tanto, el uso de la IATF en esta categoría hace posible aumentar la velocidad de la mejora genética, representando un avance considerable en el mejoramiento genético de la especie, como en las operaciones comerciales bufalinas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bartolomeu CC. 2003. Estudo da dinâmica folicular durante o tratamento com CIDR-B e Crestar visando a inseminação artificial em tempo fixo em fêmeas bubalinas (*Bubalus bubalis*). Faculdade Medicina Veterinária Zootecnia, Universidade São Paulo. Tese Doutorado. 120 pp.
- Baruselli PS, Madureira EH, Barnabe VH, Barnabe RC, Visintin JA, Oliveira CA, Amaral R. 1999a. Estudo da dinâmica folicular em búfalas submetidas à sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo. Arq Facul Veterinária UFRGS 27: 210.
- Baruselli PS, Madureira EH, Visintin JA, Barnabe VH, Barnabe RC, Amaral R. 1999b. Inseminação artificial em tempo fixo com sincronização da ovulação em bubalinos. Rev Brasil Reprod Anim 23: 360-362.
- Baruselli PS, Carvalho NAT, Henriquez CHP, Amaral R, Nichi M. 2002. Synchronization of ovulation for timed artificial insemination during the off breeding season in the buffalo. Proc 1st Buffalo Symp Americas. Belém pp. 418-420.
- Baruselli PS, Carvalho NAT, Nichi M, Reichert RH. 2003a. Reduction of hCG dosage in a protocol for synchronization of ovulation for timed artificial insemination during the off breeding season in buffalo. Proc. 2nd Cong Nazionale Sull'Allevamento Del Buffalo, Roma, 1: 261-264.
- Baruselli PS, Carvalho NAT, Henriquez CEP, Amaral R, Nichi M, Reichert RH. 2003b. Use of progesterone associated to "Ovsynch" protocol for timed artificial insemination in buffalo (*Bubalus bubalis*). Proc 2nd Cong Nazionale Sull'Allevamento Del Buffalo, Roma 1: 265-268.
- Baruselli PS, Marques MO, Nasser LFT, Reis EL, Bó GA. 2003c. Effect of eCG on pregnancy rates of lactating zebu beef cows treated with CIDR-B devices for timed artificial insemination. Theriogenology 59 (1): 214.
- Baruselli PS, Berber RCA, Madureira EH, Carvalho NAT. 2003d. Half dose of prostaglandin F2 is effective to induce luteolysis in the synchronization of ovulation protocol for fixed-time artificial insemination in buffalo (*Bubalus bubalis*). Brazil J Vet Anim Sci, São Paulo. 40 (6): 397-402.
- Baruselli PS, Reis EL, Marques MO, Nasser LF, Bo G.A. 2004. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrous beef cattle in tropical climates. Anim Reprod Sci 82-83: 479-486.
- Baruselli PS, Carvalho NAT, Gimenes LU, Crepaldi GA. 2007. Fixed-time artificial insemination in buffalo. Ital.J Anim Sci 6 (Suppl 2): 107-118.
- Berber RCA, Madureira EH, Baruselli PS. 2002. Comparison of two ovsynch protocols (GnRH vs. LH) for fixed timed insemination in buffalo (*Bubalus bubalis*). Theriogenology 57: 1421-1430.
- Bó GA; Baruselli PS, Martinez MF. 2003. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. Anim Reprod Sci 78: 307-326.
- Campanile G, Neglia G, Gasparrini B, Galero G, Prandi A, Di Palo R, D'Occhio M.J, Zicarelli L. 2005. Embryonic mortality in buffaloes synchronized and mated by AI during the seasonal decline in reproductive function. Theriogenology 63: 2334-2340.
- Campanile G, Baruselli PS, Neglia G, Vecchio D, Gasparrini B, Gimenes LU, Zicarelli L, D'Occhio M.J. 2010. Ovarian function in the buffalo and implications for embryo development and assisted reproduction. Anim Reprod Sci 121: 1-11.

Carvalho NAT, Reichert RH, Nichi M, Henriquez CEP, Oliveira CA, Baruselli PS., 2004. Use of hCG to timed artificial insemination in buffalo. Proc 15 Intern Cong Anim Reprod. PortoSeguro.

Carvalho N.A.T, Carvalho M.V., Visintin J.A., Vannucci F.S., SáFilho M.F., Nichi M., Reichert R.H., Baruselli P.S., 2005. Uso de dispositivos intravaginais de progesterona associados ao hCG ou GnRH para sincronização da ovulação em búfalas na estação reprodutiva desfavorável. Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 16, Goiânia, GO. Anais: Resumos.

Carvalho NAT, Nagasaku EM, Vannucci FS, Toledo LM, Alvarez RH, Maio JRG, Verones DAG, Baruselli PS. 2007a. Resposta folicular e taxa de concepção em búfalas sincronizadas com dispositivo intravaginal de progesterona e GnRH para IATF durante a estação reprodutiva desfavorável. Reunião Anual Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões.

Carvalho NAT, Nagasaku EM, Vannucci FS, Toledo LM, Baruselli PS. 2007b. Conception rate according intravaginal progesterone device and hCG or GnRH to induce ovulation in buffalo during the off breeding season. 7th World Buffalo Congress, Caserta.

Carvalho NAT, Nagasaku EM, Vannucci FS, Toledo LM, Baruselli PS. 2007c. Uso do DIB® e do CRESTAR® para a sincronização da ovulação e IATF em búfalas leiteiras durante a estação reprodutiva desfavorável. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões.

Carvalho NAT, Nagasaku EM, Vannucci FS, Toledo LM, Alvarez RH, Maio JRG; Carreiro SS, Baruselli PS. 2007d. Sincronização da ovulação em novilhas bubalinas para IATF durante a estação reprodutiva desfavorável. In: XXI Reunião Anual Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Costa do Sauípe-BA. Acta Scientiae Veterinariae: UFRGS, 2007. 35: 1101.

Carvalho NAT, Soares JG, Souza DC, Baruselli P.S. 2010a. Inseminação artificial em tempo fixo em novilhas bubalinas. Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Disponível em: http://www.aptaregional.sp.gov.br/artigo.php?id_artigo=794.

Carvalho NAT, Soares JG, Souza DC, Baruselli PS. 2010b. Buffalo Heifers Ovulation Synchronization With GnRH or EB to FTAI During the Off Breeding Season (Partial Results) In: XXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Porto de Galinhas. Acta Scientiae Veterinariae 38:725.

Carvalho NAT, Soares JG, Reis EL, Baruselli PS. 2011. Uso do DIB® e do CRESTAR® para a Sincronização da Ovulação e IATF em Novilhas Búfalas Durante a Estação Reprodutiva Desfavorável In: XXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Cumbuco-CE. Anais XXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões.

Carvalho NAT, Soares JG, Souza DC, Maio JRG, Sales JNS, Martins BJ, Macari RC, Baruselli PS. 2012. Ovulation synchronization with EB or GnRH in buffalo TAI during the non breeding season. In: Proc XXVI Reunião Anual Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões. Foz do Iguaçu, Paraná, Brazil. 9: 523.

Carvalho NAT, Soares JG, Porto Filho RM, Gimenes LU, Souza DC, Nichi M, Sales JNS, Baruselli PS. 2013. Equine chorionic gonadotropin improves the efficacy of a timed artificial insemination protocol in buffalo during the nonbreeding season. Theriogenology 79: 423–428.

Carvalho NAT, Soares JG, Souza DC, Vanucchi FS, Amaral R, Maio JRG, Sales JNS, Sá Filho, MF, Baruselli PS. 2014. Different circulating progesterone concentrations during

synchronization of ovulation protocol did not affect ovarian follicular and pregnancy responses in seasonal anestrous buffalo cows. *Theriogenology* 81: 490-495.

Mann GE, Lamming GE, Robinson RS, Wathes DC. 1999. The regulation of interferon- δ production and uterine hormone receptors during early pregnancy. *J Repro Fert* 54: 317-328.

Marques MO, Nasser LF, Silva RCP, Bó GA, Sales JNS, Sá Filho MF, Reis ML, Binelli M, Baruselli PS. 2012. Follicular dynamics and pregnancy rates in *Bos taurus* \times *Bos indicus* embryo transfer recipients treated to increase plasma progesterone concentrations. *Anim Reprod* 9 (Suppl 2): 111-119.

McDougall S, Burke CR, Macmillan KL, Williamson NB. 1992. The effect of pretreatment with progesterone on the oestrous response to oestradiol-17 β benzoate in the postpartum dairy cow. *Proc NZ. Soc Anim Prod* 52: 157-160.

Nichi M, Carvalho NAT, Soares JG, Souza DC, Baruselli PS. 2011. Sincronização da Ovulação em Novilhas Bubalinas com Benzoato de Estradiol ou Gonadorelina. In: XXV Reunião Anual Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Cumbuco-CE. Anais XXV Reunião Anual Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões.

Porto-Filho RM. 2004. Sincronização da ovulação para a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) durante estação reprodutiva desfavorável em fêmeas bubalinas. Tese Doutorado em Medicina Veterinária, Faculdade Medicina Veterinária e Zootecnia, Univ São Paulo. 100 pp.

Porto-Filho RM, Carvalho NAT, Viel Júnior JO, Vannucci FS, Amaral R, Reichert RH, Baruselli PS. 2004a. eCG dosage reduction in a protocol for synchronization of ovulation for timed artificial insemination during the off breeding season in buffalo. *Proc. 2nd Buffalo Symposium America*. Corrientes, CD-room.

Porto-Filho RM, Carvalho NAT, Viel Júnior JO, Reichert RH, Nichi M, Baruselli PS. 2004b. Follicular responses according hCG and eCG dosage in buffalo treated with progesterone vaginal device during the off breeding season. *Proc 15 Intern Cong Anim Reprod*, Porto Seguro.

Rhodes FM, Burke CR, Clark BA, Day M.L, Macmillan.KL. 2002. Effect of treatment with progesterone and oestradiol benzoate on ovarian follicular turnover in postpartum anoestrous cows and cows which have resumed oestrous cycles. *Anim Reprod Sci* 69: 139-150.

Rhodes FM, McDougall S, Burke CR, Verkerk GA, Macmillan KL. 2003. Treatment of cows with an extended postpartum anestrous interval. *J Dairy Sci* 86: 1876-1894.

Sá Filho MF, Ayres H, Ferreira RM, Marques MO, Reis EL, Silva RCP, Rodrigues CA, Madureira EH, Bo GA, Baruselli PS. 2010. Equine chorionic gonadotropin and gonadotropin-releasing hormone enhance fertility in a norgestomet-based, timed artificial insemination protocol in suckled Nelore (*Bos indicus*) cows. *Theriogenology* 73: 651-658.

Soumano K, Price CA. 1997. Ovarian Follicular steroidogenic Acute Regulatory Protein, Low-Density Lipoprotein Receptor, and Cytochrome P450 Side-Chain Cleavage Messenger Ribonucleic Acids in Cattle Undergoing Superovulation. *Biol Reprod* 56: 516-522.

Spencer TE, Burghardt RC, Johnson GA, Bazer FW. 2004. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Anim Reprod Sci* 82: 537-550.

Yavas Y, Walton JS. 2000. Postpartum acyclicity in suckled beef cows: a review. *Theriogenology*. 54: 25-55.