

Joven Investigador en la línea de Reproducción. Segundo Puesto
Evaluación del protocolo (Ovsynch) de inseminación artificial a tiempo fijo y diagnóstico temprano de gestación en búfalas de agua (*Bubalus bubalis*) durante la estación reproductiva 2005

Ramírez J.F.a; Rojas J.D.b; Marulanda J. b, Medina S. b;
 Alvarez N. b. Semillero de Investigación sobre Búfalos. Centro de Investigación y Desarrollo;
 Universidad Católica de Oriente. e-mail: bufalosuco@yahoo.com.
 Zootecnista. Universidad de Antioquia. Colombia
 Estudiantes de Agronomía y Zootecnia. Universidad Católica de Oriente. Colombia

Summary

Twenty female buffaloes (*Bubalus bubalis*) with 63 +/- 16 days postpartum, > 3 parity, >3.5 body condition score (scale 0 to 5) and 497 +/- 56 Kgr body weight were utilized to evaluate the efficiency of synchronization ovulation protocol (GnRH/PGF2 α /GnRH) for fixed timed insemination. Animals received day 0 (100 μ g of GnRH), day 7 (25mg of PGF2 α) day 9 (50 μ g of GnRH) and fixed timed insemination (16 hours after second GnRH dose), during the favourable reproductive season 2005. Blood samples were collected in 18 and 21 days (n=11 and n=9, respectively) after Artificial Insemination (A. I.) to evaluate pregnancy rate by progesterone concentrations by quimioluminiscence method. The progesterone concentration in day 18 were 4.9 +/- 0.9 and 0.2 +/- 0.1 ng/mL and day 21 were 3.8 +/- 1.5 and 0.2 +/- 0.1 ng/mL (P<0.05) in predicted pregnant and non-pregnant buffalo cows, respectively. Then, the conception rate was 30% (6/20) by progesterone concentration diagnostic. In 20 day, nine buffaloes predicted non-pregnant were resynchronised with 50 μ g of GnRH and was Inseminated 16 hours after it. Four months after, nine buffaloes were diagnosed pregnant by rectal palpation (45%); four animals (67%) of six found pregnant had been correctly detected by assay at 18 and 21 days. Five (36%) of the 14 animals found non-pregnant had not been correctly detected by assay in 18 and 21 days. In summary, the experiment indicated that the use of synchronization of the ovulation for fixed timed insemination, during the favourable reproductive season, with multiparous buffaloes and good body condition presents satisfactory results in buffalo and the determination of plasma progesterone concentration 18 and 21 days after insemination was not an accurate method of predicting pregnancy or non-pregnancy in water buffalo cows.

Resumen

Veinte búfalas (*Bubalus bubalis*) con 63 +/- 16 días posparto, >3 partos, >3.5 condición corporal (escala de 0 a 5) y 497 +/- 56 Kgr de peso fueron utilizadas

para evaluar la eficiencia del protocolo ovsynch de inseminación artificial a tiempo fijo (GnRH/PGF2 α /GnRH). Los animales recibieron el día cero (100 μ g de GnRH), día 7 (25mg de PGF2 α) el día 9 (50 μ g de GnRH) y se les inseminó 16 horas después de esta última aplicación, durante la estación reproductiva 2005. Se tomó muestra de sangre el día 18 y 21 (n=11 y n=9, respectivamente) después de la inseminación artificial (I.A.) para determinar la tasa de gestación mediante las concentraciones plasmáticas de progesterona por el método de quimioluminiscencia. Las concentraciones plasmáticas de progesterona en el día 18 fueron 4.9 +/- 0.9 y 0.2 +/- 0.1 ng/mL y en el día 21 fueron 3.8 +/- 1.5 y 0.2 +/- 0.1 ng/mL en las búfalas diagnosticadas como preñadas y no preñadas, respectivamente (P<0.05). La tasa de gestación determinada por este método fue de 30% (6/20). En el día 20, nueve búfalas diagnosticadas como no preñadas por sus bajos niveles de progesterona fueron resincronizadas con 50 μ g de GnRH e inseminadas a las 16 horas después de esta última aplicación. Cuatro meses después, nueve de las veinte búfalas fueron diagnosticadas como preñadas por palpación rectal (45%); cuatro búfalas (67%) de las seis diagnosticadas como preñadas por sus altos niveles de progesterona confirmaron esta condición después de la palpación rectal, mientras que 5 (36%) de las 14 diagnosticadas como no preñadas por sus bajos niveles de progesterona mostraron resultado positivo de preñes al momento de la palpación. Ninguna de las búfalas del segundo lote de inseminación mostró resultado positivo de gestación al momento de la palpación rectal. En resumen, el experimento indicó que el uso de la sincronización de la ovulación para inseminación a tiempo fijo durante la estación reproductiva favorable, con búfalas multiparas de buena condición corporal presenta resultados satisfactorios, mientras que el diagnóstico de gestación por determinación de las concentraciones plasmáticas de progesterona en el día 18 y 21 después de la I.A. mostró que no es un método seguro para la detección temprana de gestación en búfalas de agua.

Palabras Claves: Búfalos, Ovsynch, Progesterona

Introducción

La sincronización de la ovulación es la técnica que utiliza la aplicación de hormonas sintéticas o no para estimular la liberación de otras hormonas que están implicadas directamente en el proceso de la ovulación. La aplicación de esta técnica permite realizar la inseminación artificial (I.A.) a tiempo fijo sin la necesidad de observar los celos, para poder optimización del uso de biotecnologías reproductivas como la I.A., transferencia de embriones y monta dirigida.

En la actualidad existen varios protocolos que permiten realizar la sincronización de la ovulación a fin de usar I.A. a tiempo fijo (IATF). El protocolo «Ovsynch» es uno de ellos; en este se utilizan hormonas liberadoras de Gonadotropina (GnRH), prostaglandinas y sus análogos. En vacunos se han desarrollado este tipo de protocolos con gran éxito en la sincronización y buenas tasas de concepción (10,16, 17, 19, 20).

No obstante, en búfalos existen pocos reportes acerca del uso de este protocolo. Baruselli (1) adelantó estudios para lograr optimizar la tasa de concepción en búfalos en la región rural de Sao Pablo (Brasil), en ese trabajo, el autor modificó el protocolo «Ovsynch», aplicando una dosis de GnRH el día menos siete (-7) a la aplicación del protocolo «Ovsynch» tradicional; como una alternativa para mejorar los resultados obtenidos en búfalos.

Estudiando la dinámica folicular durante el tratamiento «Ovsynch» algunos autores (17) verificaron que después de la primera aplicación de GnRH ocurre la ovulación y/o el inicio de una nueva onda de crecimiento folicular, que resulta en la presencia de un folículo dominante 7 días después, el día de la aplicación de PGF2 α ; la luteólisis provocada por esta hace que todos los animales tratados ovulen entre 24 a 32 horas después de la segunda dosis de GnRH. Las inyecciones de GnRH, en cualquier fase del ciclo estral, dan como resultado un pico de LH que provoca la ovulación de los folículos >9.0 mm o la luteinización de los folículos no viables, y una nueva onda de crecimiento folicular aparece 2 o 3 días después (20). Con la ovulación o luteinización del folículo dominante, los niveles de progesterona permanecen altos; por consiguiente la PGF2 α suministrada en el día 7 induce la luteólisis y promueve la ovulación del folículo de la nueva ola de crecimiento folicular (4). La segunda inyección de GnRH es recomendada 48 horas después de la inyección de PGF2 para una buena sincronización de la ovulación y para permitir la inseminación a tiempo fijo (8). Algunos trabajos (2), demuestran que búfalos tratadas

con este protocolo durante la estación reproductiva presentan una tasa de concepción media de 50,2%; con una marcada influencia de la condición corporal en estos porcentajes de gestación. Por lo que las búfalos deben presentar condición corporal superior a 3,5 en la escala de 0 a 5, para poder obtener una buena eficiencia del tratamiento (14).

El presente trabajo tiene por finalidad estudiar la respuesta de las búfalos de agua en las condiciones propias del norte colombiano al protocolo Ovsynch de sincronización de la ovulación mediante la utilización de GnRH y prostaglandinas, en un esquema de IA a tiempo fijo y determinar si la detección temprana de gestación es posible mediante el método de quimioluminiscencia midiendo los niveles de progesterona en sangre pocos días después de la inseminación artificial.

Materiales y Método

Animales

Se utilizaron veinte (n=20) búfalos multíparas con buena condición corporal y sin problemas reproductivos. Todos los animales se encontraban bajo el mismo sistema de manejo y alimentación con libre acceso a sal mineralizada y agua, en el Municipio de Planeta Rica, Córdoba; Norte de Colombia.

Protocolo Ovsynch

Todos los animales fueron tratados con aplicaciones intramusculares en días aleatorios del ciclo estral. Las búfalos recibieron en el día cero 2ml de un producto comercial equivalente a 100 μ g de Gonadorelina sintética liberadora de GnRH, 7 días después se les inyectó 5 ml de un producto comercial equivalente a 25 mg de PGF2 α (Dinoprost), dos días después se les inyectó 1 ml del mismo producto comercial equivalente a 50 μ g de Gonadorelina sintética liberadora de GnRH y 16 horas después se inseminó sin detección de celo, siguiendo el orden estricto utilizado en las aplicaciones.

Diagnostico Precoz de Gestación

El día Dieciocho (18) y Veintiuno (21) después de la inseminación se tomaron muestras de sangre para determinar las concentraciones plasmáticas de progesterona mediante el método de quimioluminiscencia en Immulite 2000.

Segunda Inseminación Artificial

Veintiun (21) días después de la segunda aplicación de GnRH se aplicó 1 ml del mismo producto comercial equivalente a 50 μ g de Gonadorelina sintética liberadora de GnRH a nueve búfalos diagnosticadas como no preñadas por sus bajas concentraciones

plasmáticas de progesterona en el día 18, y se le inseminó 16 horas después de esta aplicación. Ambas inseminaciones fueron realizadas en las horas de la mañana. Sesenta días después de esta segunda Inseminación se unió al grupo de búfalas un macho reproductor.

Diagnostico de Gestación por Palpación Rectal.

Cuatro meses después de la segunda Inseminación Artificial se palpó las 20 búfalas para diagnostico de gestación.

Análisis Estadístico

Las diferencias de los grupos de los estados reproductivos (preñadas y no preñadas) fueron analizadas con la prueba T (18).

Resultados y Discusión

En la tabla 1 se muestran las características generales del grupo de búfalas utilizado.

Tabla 1

Características Generales de los Animales.

Número de Animales	20
Peso Promedio	497 +/- 56 Kilogramos
Días Posparto	63 +/- 16 días
Numero de Partos	> 3
Condición Corporal	> 3.5

En la tabla 2 se muestran las concentraciones plasmáticas de progesterona de 11 búfalas en el día 18 después de la inseminación.

Tabla 2

Concentraciones Séricas de Progesterona, día 18 después de la Inseminación Artificial.

Número de Animales	Día 18 (ng/mL)	%	Estado
2	4.9 +/- 0.92a	18	Preñada
9	0.2 +/- 0.07b	82	No Preñada

(P<0.05)

En la tabla 3 se muestran las concentraciones plasmáticas de progesterona de 9 búfalas en el día 21 después de la inseminación.

Tabla 3.

Concentraciones Séricas de Progesterona, día 21 después de la Inseminación Artificial.

Número de Animales	Día 21 (ng/mL)	%	Estado
4	3.8 +/- 1.46a	44	Preñada
5	0.2 +/- 0.13b	56	No Preñada

(P<0.05)

Se encontró que dos de las seis búfalas (33%) que habían sido consideradas preñadas por sus altos niveles de progesterona estaban vacías al momento de la palpación. Mientras que cinco de las catorce búfalas (36%) que habían sido consideradas como no preñadas por sus bajos niveles de progesterona se encontraron preñadas al momento de la palpación rectal.

En la tabla 5 se muestran los porcentajes de gestación para el tratamiento Ovsynch y para la monta natural cuatro meses después de la utilización el protocolo de sincronización.

Tabla 5.

Diagnostico de gestación por palpación rectal.

Número de Animales	Estado	%
9	Preñadas Ovsynch I. A.	45
8	Preñadas Monta Natural	40
3	Vacía	15

La eficiencia de los tratamientos de sincronización de la ovulación depende de la respuesta del ovario a la primera aplicación de GnRH, De Rensis (9) encontró que la presencia de un folículo grande al inicio del protocolo Ovsynch es un factor determinante en la obtención de altas tasas de gestación. Baruselli (16) encontró ovulación temprana, baja sincronización de la ovulación y bajos niveles de progesterona en el día 7 en aquellas búfalas que no ovularon tras la primera dosis de GnRH, lo cual indica que la ausencia de ovulación al principio del tratamiento entorpece la sincronizar de la onda de crecimiento folicular provocando variaciones en el momento de la ovulación. Estos resultados indican la necesidad de determinar el estado ovárico de las hembras al momento de iniciar el protocolo de sincronización o la adición de una suplementación con progesterona como lo indica De Rensis (9), quien demostró que la suplementación con progesterona entre el día 0 al 7 del protocolo Ovsynch tiene un efecto positivo sobre la tasa de preñes (30% Vs 4.7% en búfalas acíclicas y 51.5% Vs 35.7%, en búfalas normales).

En cuanto a la efectividad del protocolo dada por los índices de ovulación De Araujo et al. (7) encontraron un 86.6 % de ovulación 36.4 horas después de la primer dosis de GnRH y 93.3 % de ovulación después de la segunda dosis de GnRH, y Baruselli (16) reportó un 78.8% de ovulación a las 32 horas después segunda aplicación de GnRH.

Aunque en este ensayo no se consideró la condición corporal como una variable de estudio es claro que para incrementar las tasas de concepción se deben utilizar animales con condición corporal >3.5 (escala

de 1 a 5) como lo sugiere Geary et al (10), quien estudio la sincronización de la ovulación en 220 vacas y demostró que las tasas de concepción son mejores en aquellos animales con mejor condición corporal, ya que la condición corporal influencia notablemente la ciclicidad ovárica controlando el ciclo estral y la ovulación.

También se ha encontrado (16) una marcada diferencia en las tasa de concepción de búfalas primerizas y multíparas (35.5% vs 51.0% respectivamente) demostrando que el número de partos es un factor decisivo en la eficiencia del protocolo, ya que las hembras primerizas aun se encuentran utilizando mucha energía en su crecimiento, mientras que las multíparas convierten esa misma energía en procesos reproductivos, garantizando ciclicidad ovárica y actividad reproductiva normal.

El periodo posparto al inicio del protocolo es un factor importante ya que los procesos involucrados con la involución uterina y la actividad ovárica depende directamente de factores fisiológicos al momento del parto y durante el periodo posparto; pero no se ha encontrado diferencias significativas (16) en la utilización del protocolo entre los 40 y 60 días posparto.

Para incrementar la eficiencia en la utilización de este tipo de protocolos, algunos autores (15) han utilizado como diagnostico temprano de preñez los niveles de progesterona en leche, hallando concentraciones de 7.99 ng/ml el día 11 y 8.04 ng/ml el día 21 después de la inseminación artificial, pero al igual que en este trabajo se ha encontrando que algunas de las búfalas con altos niveles de progesterona resultaron estar no preñadas tras el diagnostico por palpación rectal.

Batra S.K. (3) halló en sangre una concentración de 0.1 ng/mL de progesterona al momento del estro y un nivel de 3.6 ng/mL en el día 13 después de la IA, el cual continuó incrementándose en los animales preñados y cayó en los no preñados a 0.6 ng/mL tres días antes del siguiente estro.

Y aunque algunos autores (5) han encontrado muerte embrionaria entre el día 26 al 40 asociada a la presencia de agentes infecciosos en el 8% de los animales, se puede atribuir un 50% de muerte embrionaria a la reducida capacidad de secreción de progesterona después de los protocolos de IA. Este último factor unido al hecho que las hembras bufalinas presentan una alta variabilidad en la longitud de sus ciclos estrales (11) promueve la búsqueda de un método invasivo ó no que sea más confiable para determinar el estado luteal de las hembras que serán sometidas a programas de sincronización.

Tal método que pudiera basarse en los hallazgos de Hattab S.A. (12) quines encontraron que las concentraciones de progesterona en sangre se correlacionan con las concentraciones de sus metabolitos en heces fecales o los hallazgos de Kamboj

M. (13) quien determinó que las concentraciones de progesterona en leche son 4 veces mas altas que en plasma. Así todos estos esfuerzos contribuirían a un mejor diagnostico de gestación temprana en esta especie.

Conclusiones

- La utilización del protocolo ovsynch mostró ser una herramienta eficaz para la obtención de índices aceptables de gestación en búfalas de agua.
- El diagnostico temprano de gestación mediante las determinación de los niveles de progesterona en sangre demostró ser una herramienta medianamente confiable para este propósito.
- La resincronización de la ovulación con una aplicación de GnRH en el día 20 después de la inseminación artificial mostró ser una práctica totalmente ineficiente para incrementar los índices de gestación en este tipo de protocolos con búfalas.
- Otras investigaciones son necesarias para determinar cuales son los factores fisiológicos que mas influyen en la efectividad del protocolo ovsynch en búfalas.

Agradecimientos

Los autores expresan sus agradecimientos al Centro de Investigación y Desarrollo de la Universidad Católica de Oriente y a la Hacienda LA ESMERALDA.

Bibliografía

1. BARUSELLI P S. Reproducción en búfalos. Disponible en <http://www.fmvz.usp.br/menú/bufaloesnhol.html-INTRODUÇÃO>. 2003; P.34- 114.
2. BARUSELLI, P.S. Reproducción en bubalinos. in: oliveira, g.j.c.; almeida, a.m.l.; soza-filho, u.a. (eds.) o búfalo no brasil. cruz das almas: ufba, escola de agronomia, 1995, p. 117-153.
3. BATRA SK, ARORA RC, BACHLAUS NK, PANDEY RS. Blood and milk progesterone in pregnant and nonpregnant buffalo. J Dairy Sci. 1979 Sep;62(9):1390-3.
4. BODENSTEINER, K. J.; KOT, K.; WILTBANK, M. C.; GINTHER. O. J. Synchronization of emergence of follicular wave in cattle. Theriogenology, v. 45, n. , p. 1115-1128, 1996.
5. CAMPANILE G, NEGLIA G, GASPARRINI B, GALIERO G, PRANDI A, DI PALO R, D'OCCHIO MJ, ZICARELLI L. Embryonic mortality in buffaloes synchronized and mated by AI during the seasonal decline in reproductive function. DISCIZIA, Federico II University, 80137 Napoles, Italy. giucampa@unina.

- it Theriogenology. 2005 May;63(8):2334-40.
6. CAVALLIERI, J.; FITZPATRICK, L. A. Artificial insemination of Bos indicus heifers: the effects of body weight, condition score, ovarian cyclic status and insemination regimen on pregnancy rate. Australian Veterinary Journal, v. 72, n. , p. 441-447, 1995.
 7. DE ARAUJO BERBER RC, MADUREIRA EH, BARUSELLI PS. Comparison of two Ovsynch protocols (GnRH versus LH) for fixed timed insemination in buffalo (Bubalus bubalis). Department of Animal Reproduction, Medicine College of Veterinary, Sao Paulo University, Brazil. berber@ffalm.br Theriogenology. 2002 Mar 15;57(5):1421-30.
 8. DE RENSIS, F.; PETERS, A. R. The control of follicular dynamics by PGF2, GnRH, hCG and oestrus synchronization in cattle. A review. Reproduction Domestic Animal. v. 34, n. , p. 49-59, 1999.
 9. DE RENSIS F, RONCI G, GUARNERI P, NGUYEN BX, PRESICCE GA, HUSZENICZA G, SCARAMUZZI RJ. Conception rate after fixed time insemination following ovsynch protocol with and without progesterone supplementation in cyclic and non-cyclic Mediterranean Italian buffaloes (Bubalus bubalis). Theriogenology. 2005 Apr 15;63(7):1824-31.
 10. GEARY, T. W.; WHITTIER, J. C.; DOWNING, E. R., LEFEVER, D. G.; SILCOX, R. W.; HOLLAND, M. D.; NETT, T. M.; NISWENDER, G. D. Pregnancy rates of postpartum beef cows that were synchronized using Syncro-Mate-B® or the ovsynch protocol. Journal Animal Science. v. 76, n. , p. 1523-1527, 1998
 11. GUPTA M, PRAKASH BS. Milk progesterone determination in buffaloes post-insemination. Division of Cattle Physiology, National Dairy Research Institute, Karnal, India. Br Vet J. 1990 Nov-Dec;146(6):563-70.
 12. HATTAB SA, KADDOUMAK, PALME R, BAMBERG E. Effect of CRESTAR on estrus synchronization and the relationship between fecal and plasma concentrations of progestagens in buffalo cows. Theriogenology Department, Faculty of Veterinary Medicine, Alexandria University Edfina, Behira, Egypt. Theriogenology. 2000 Oct 15;54(7):1007-17.
 13. KAMBOJ M, PRAKASH BS. Relationship of progesterone in plasma and whole milk of buffaloes during cyclicity and early pregnancy. Division of Cattle Physiology, National Dairy Research Institute, Karnal, India. Trop Anim Health Prod. 1993 Aug;25(3):185-92.
 14. KIZUR, ADRIANA - PELLERANO, GABRIELA S. - MALDONADO VARGAS, PABLO RODRÍGUEZ, SEBASTIAN - CRUDELI, GUSTAVO A. Eficiencia en el uso del protocolo de sincronización "Ovsynch" con resincronización en Búfalos en el NEA Argentino. UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas 2003. Argentina.
 15. MEHMET UÇAR, MUSTAFÁ KUÇUKKEBAPÇI, MUSTAFÁ GUNDOGAN AND ERDAL SABAN. Using Milk Progesterone Assay at the Time of Oestrus and Post-mating for Diagnosing Early Pregnancy in Anatolian Water Buffaloes. Revista Turkey Journal Vet. Animal Science No 28 de 2004 pag 513 a 518 15;55(2):563-71.
 16. PIETRO SAMPAIO BARUSELLI; ED HOFFMAN MADUREIRA; VALQUÍRIA HIPOLLITO BANARBEI; RENATO CAMPANARUT BARNABEI; RODOLFO CASSIMIRO DE ARAÚJO BERBERI, Evaluation of synchronization of ovulation for fixed timed insemination in buffalo (Bubalus bubalis). Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science. vol.40 no.6 São Paulo 2003
 17. PURSLEY, J.R.; MEE, M.O.; WILTBANK, M. C. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2 and GnRh. Theriogenology, v. 44, p. 915-923, 1995.
 18. SPSS 10.0 User Guide. New York: McGraw-Hill. 2001 (10) THATCHER, W.W.; DROST, M.; SAVIO, J.D. et al. new clinical uses of GnRH and its analogues in cattle. anim. reprod. sci., v. 33, p. 27-49, 1993.
 19. Thatcher, W.W.; Drost, M.; Savio, J.D. et al. new clinical uses of GnRH and its analogues in cattle. anim. reprod. sci., v. 33, p. 27-49, 1993.
 20. TWAGIRAMUNGU, H.; GUILBAULT, L. A.; DEUFOR, J. J. Synchronization of ovarian follicular waves with a gonadotropin-releasing hormone agonist to increase the precision of estrus in cattle: a review. Journal Animal Science v. 73, n. , p. 3141-3151, 1995.