

## Pregnancy rate obtained with four hormonal protocols for fixed-time artificial insemination in nulliparous water buffaloes (*Bubalus bubalis*)

### Tasa de gestación obtenida con cuatro protocolos hormonales para la inseminación artificial a tiempo fijo en búfalas de río nulíparas (*Bubalus bubalis*)

C. Gallego<sup>1</sup>, J.C. Alonso<sup>2</sup>, R. García López<sup>1</sup>, E. Padrón<sup>3</sup>, L.M. Fraga<sup>1</sup>, Mildred Méndez<sup>1</sup> and Eunice Oba<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Ciencia Animal, Apartado Postal 24, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba

<sup>2</sup>Universidad Agraria de La Habana, Carretera de Tapaste y Autopista Nacional, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba

<sup>3</sup>Empresa Pecuaria Genética Bubalina «El Cangre», El Cangre km 6 1/2, Güines, Mayabeque, Cuba

<sup>4</sup>Universidad Estatal Paulista. Campus de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil

Email: cgallego@ica.co.cu

A total of 120 nulliparous water buffaloes were used to evaluate the effect of different hormonal protocols with fixed-time artificial insemination on the pregnancy rate. Protocol 1 received 2.0 mg of estradiol benzoate and a progesterone intravaginal device for nine days. After the device removal, 0.5 mg of Prostaglandin F2 $\alpha$ , 500 UI of equine chorionic gonadotropin and 0.5 mg of estradiol cypionate were applied. Protocol 2 was similar to 1, but without the chorionic gonadotrophin. In protocol 3, two doses of 0.5 mg of Prostaglandin F2 $\alpha$  were injected, with an interval of 11 d, and 0.5 mg of estradiol cypionate was added to the last dose. Protocol 4 was similar to 3, but, after 48 h of the last Prostaglandin F2 $\alpha$ , 0.01 mg of Buserelin Acetate was injected. Time-fixed artificial inseminations were performed between 56 and 58 h (protocols 1, 2 and 3) and between 20 and 24 h (protocol 4) after the last hormonal application. Pregnancy rates in protocol 1 (60.8%), 2 (50.3 %) and 4 (57.3 %) were superior ( $P < 0.05$ ) to those of protocol 3 (16.0 %). The equine chorionic gonadotrophin had no influence on the increase or decrease of fertility. In the protocol with double doses of Prostaglandin F2 $\alpha$  and estradiol cypionate, fertility decreased, but increased when the estradiol was substituted by Buserelin Acetate. It can be concluded that protocols 1, 2 and 3 synchronize the estrum and ovulation with good pregnancy rates, and it is possible to apply fixed-time artificial insemination for increasing birth rate in herds and achieving economic benefits.

Key words: *hormonal protocols, fixed-time artificial insemination, nulliparous buffaloes*

#### Introduction

Artificial insemination in buffaloes, like in other domestic species, contributes to health improvement and productive progress of herds (Hafez, 1995). However, in order to achieve this purpose, female buffaloes face different difficulties like poor performance and expression of heat, and variability of its appearance during the day. This makes difficult the notice of the estrus and the determination of the most adequate moment to perform a successful insemination (Das and Kan 2010). In addition, there are other limitations related to the short period of service acceptance, variability of ovulation time, and ovarian inactivity during the summer months (El-Wishy 2007).

Se utilizaron 120 búfalas de río nulíparas para evaluar el efecto en la tasa de gestación de diferentes protocolos hormonales con inseminación artificial a tiempo fijo. El protocolo 1 recibió 2.0 mg de Benzoato de estradiol y un dispositivo intravaginal de progesterona durante nueve días. Al retirarse el dispositivo, se aplicó 0.5 mg de Prostaglandina F2 $\alpha$ , 500 UI de Gonadotropina coriónica equina y 0.5 mg de Cipionato de estradiol. El protocolo 2 fue similar al 1, pero sin la Gonadotropina coriónica. En el protocolo 3, se inyectaron dos dosis de 0.5 mg de Prostaglandina F2 $\alpha$ , con intervalo de 11 d, conjuntamente con la última se administró 0.5 mg de Cipionato de estradiol. El protocolo 4 fue similar al 3, pero luego de 48 h de la última Prostaglandina F2 $\alpha$ , se inyectó 0.01 mg de Acetato de Buserelina. Las inseminaciones artificiales a tiempo fijo se realizaron entre 56 y 58 h (protocolos 1, 2, 3) y 20-24 h (protocolo 4) posteriores a la última aplicación hormonal. Las tasas de gestación en el protocolo 1 (60.8%), 2 (50.3 %) y 4 (57.3 %) fueron superiores ( $P < 0.05$ ) a la del protocolo 3 (16.0 %). Se comprobó que la Gonadotropina coriónica equina no influyó en el incremento o reducción de la fertilidad. En el protocolo con doble dosis de Prostaglandina F2 $\alpha$  y Cipionato de estradiol, la fertilidad disminuyó, y aumentó cuando se sustituyó el estradiol por Acetato de Buserelina. Se concluye que los protocolos 1, 2 y 3 sincronizan el estro y la ovulación con buenas tasas de gestación, y que es posible aplicar la inseminación artificial a tiempo fijo para incrementar la natalidad en los rebaños y lograr beneficios económicos.

Palabras clave: *protocolos hormonales, inseminación artificial a tiempo fijo, búfalas nulíparas*

#### Introducción

La inseminación artificial en los búfalos, al igual que en otras especies de animales domésticos, contribuye al mejoramiento de la salud y al progreso productivo de los rebaños (Hafez, 1995). Sin embargo, para lograr este propósito, las hembras bubalinas confrontan diversas dificultades, entre ellas el pobre comportamiento y expresión del celo y la variabilidad en su presentación durante el día. Esto dificulta que se perciba el estro y se pueda determinar el momento más adecuado para realizar con éxito la inseminación (Das y Kan, 2010). Además, existen otras limitaciones que se relacionan con el breve período de aceptación a la monta, la variabilidad del tiempo

In order to solve these problems, Mishra *et al.* (2007) stated the use of estrus induction and synchronization methods with hormonal protocols (progesterone, estrogens, prostaglandins and gonadotropins) applied to female cattle, and obtain good results in fertility. Nevertheless, as these treatments also need to detect the heat, they do not solve the problems in this species because they do not guarantee a proper synchronization between the estrus and the ovulation (Mohan and Prakash 2010). Therefore, nowadays, protocols that also include the synchronization of ovulation for performing the fixed-time artificial insemination (FTAI) are recommended (Porto Filho *et al.* 2014).

The objective of this paper was to evaluate the effect of four hormonal protocols, which would induce the estrus and synchronize ovulation, on pregnancy percentage and expenses of the FTAI of nulliparous female water buffaloes during the season of higher estrus cyclicity.

### Materials and Methods

#### *Stage of study, location and selection of animals.*

The research was carried out on October, 2013, in a development unit belonging to the Empresa Pecuaria "El Cangre" (latitude 23° 5.35' N; longitude 82° 30.5' W), in Güines, Mayabeque province, Cuba. An amount of 120 nulliparous female water buffaloes were used, with ages between 22 and 24 months old and mean live weight of 374.97 ± 21.94 kg, with no gynecological anomalies at rectal palpation, and free of diseases like tuberculosis and brucellosis. Before applying the hormonal protocols, an examination of internal genital organs was performed (rectal palpation and ultrasonography) to 30 % of the animals in each group, with the purpose of verifying the ovarian cyclicity.

*Management and feeding.* Female buffaloes were managed through day and continuous grazing (from 06:00 a.m. to 07:00 p.m.) with access to lakes and natural shade. At night, they stayed remained stabulated, without supplements and complements, and received water at will. Star grass (*Cynodon nlemfuensis*), without fertilization and irrigation, prevailed as base food. There were also natural grasses included, mainly *Bothriochloa pertusa* and *Paspalum notatum*. Under these conditions, grasses presented an availability of 37.00 kg of DM/female buffalo and covered all the requirements for female buffaloes.

*Experimental design.* Four groups of female buffaloes (n=30/group) were established, which presented a body condition superior to 3.0, in a scale between 1 and 5 points (Kapa and Alapati 2013). Four hormonal protocols (P) were applied to these groups. P1 received 2.0 mg of estradiol benzoate (BE2, Sincrodiol®) and a progesterone intravaginal device (DIVP4, Primer®) for nine days. After the device removal, 0.5 mg of Prostaglandin F2α (PGF2α, Ciosin®), 500 UI of equine

ovulatorio y la inactividad ovárica durante los meses de verano (El-Wishy, 2007).

Para solucionar estos problemas, Mishra *et al.* (2007) plantearon utilizar en esta especie los métodos de inducción y sincronización del estro con protocolos hormonales (progesteronas, estrógenos, prostaglandinas y gonadotropinas) aplicados a la hembra vacuna y obtener buenos resultados en la fertilidad. Sin embargo, como estos tratamientos necesitan también detectar el celo, no solucionan del todo los inconvenientes en la especie, porque no garantizan una sincronización adecuada entre el estro y la ovulación (Mohan y Prakash 2010). Por ello, en la actualidad se recomiendan protocolos que incluyan además, la sincronización de la ovulación para efectuar la inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) (Porto Filho *et al.*, 2014).

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de cuatro protocolos hormonales, inductores del estro y sincronizantes de la ovulación, en el porcentaje de gestación y los gastos incurridos para la IATF de búfalas de río nulíparas durante la época de mayor ciclicidad estral.

### Materiales y Métodos

*Etapas de estudio, localización y selección de los animales.* La investigación se realizó durante octubre de 2013 en una unidad de desarrollo, perteneciente a la Empresa Pecuaria "El Cangre" (latitud 23° 5.35' N; longitud 82° 30.5' O) del municipio Güines, provincia Mayabeque, Cuba. Se utilizaron 120 búfalas de río nulíparas, con edad que osciló entre 22 y 24 meses y peso vivo promedio de 374.97 ± 21.94 kg, sin anomalías ginecológicas a la palpación rectal, y libre de enfermedades infectocontagiosas (brucelosis y tuberculosis). Antes de aplicar los protocolos hormonales, se realizó un examen de los órganos genitales internos (palpación rectal y ultrasonografía) al 30 % de los animales de cada grupo, con el propósito de verificar la ciclicidad ovárica.

*Manejo y alimentación.* Las búfalas se manejaron mediante un pastoreo continuo y diurno (06:00 a.m. hasta las 07:00 p.m.), con acceso a lagunas y sombra natural. Durante la noche, permanecieron estabuladas, sin la oferta de suplementos y complementos, y recibieron agua a voluntad. Como alimento base, prevaleció el pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*), sin fertilización ni riego. En menor cuantía se incluyeron los pastos naturales, fundamentalmente las variedades pitilla (*Bothriochloa pertusa*) y sacasebo (*Paspalum notatum*). En estas condiciones, los pastos presentaron disponibilidad de 37.00 kg de MS/búfala y cubrieron los requerimientos de las búfalas.

*Diseño experimental.* Se formaron cuatro grupos de búfalas (n=30/grupo) que presentaron condición corporal superior a 3.0, en escala de 1 a 5 puntos (Kapa y Alapati 2013). A estos grupos se les aplicaron cuatro protocolos hormonales (P). El P1 recibió 2.0 mg de Benzoato de estradiol (BE2, Sincrodiol®) y se le introdujo un dispositivo intravaginal de progesterona (DIVP4, Primer®) durante nueve días. Al retirarse

chorionic gonadotropin (eCG, Novormon®) and 0.5 mg of estradiol cypionate (CE, E.C.P®) were applied. P2 was similar to P1, but without the eCG. In P3, two doses of 0.5 mg of PGF2 $\alpha$  were injected, with an interval of 11d, and 0.5 mg of CE was added to the last dose. P4 was similar to P3, but, after 48h of the last PGF2 $\alpha$ , 0.01 mg of Buserelin Acetate (GnRH, Sincroforte®) was injected. Time-fixed artificial inseminations were performed between 56 and 58 h (P1, P2 and P3) and between 20 and 24 h (P4) after the last hormonal application. All the hormones used, except DIVP4, were administered intramuscularly. Figure 1 shows the diagrams of the treatments proposed for TFAI.

Pregnancy diagnosis was carried out at 45 d, using a transrectal ecography (AQUILA PRO Esaote Pie

el dispositivo, se aplicó 0.5 mg de Prostaglandina F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ , Ciosin®), 500 UI de Gonadotropina coriónica equina (eCG, Novormon®) y 0.5 mg de Cipionato de estradiol (CE, E.C.P®). El P2 fue similar al P1, sin la aplicación de eCG. En el P3 se inyectaron dos dosis de 0.5 mg de PGF2 $\alpha$ , con intervalo de 11 d. Conjuntamente con la última, se administró 0.5 mg de CE. El P4 fue similar al P3, pero 48 h posteriores a la última PGF2 $\alpha$  se inyectó 0.01 mg de Acetato de Buserelina (GnRH, Sincroforte®). Las inseminaciones artificiales a tiempo fijo se realizaron entre 56 y 58 h (P1, P2 y P3) y entre 20-24 h (P4) posteriores a la última aplicación hormonal. Todas las hormonas utilizadas, excepto el DIVP4, se administraron por vía intramuscular. Los esquemas de los tratamientos propuestos para la IATF se muestran en la figura 1.

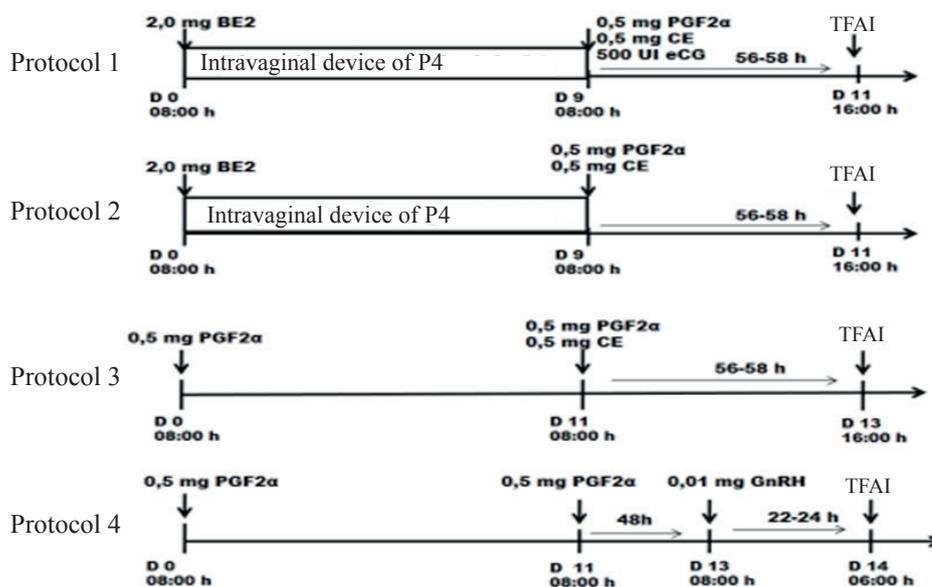


Figure 1. Diagram of protocols proposed for TFAI during the season of more ovarian activity in nulliparous female water buffaloes

Medical®), with a linear probe of 8.0 and 10.0 MHz. The TFAI was performed with semen from Mediterranean breed, with fertility certification, from Italy (Central de Inseminación Artificial “Coffa Semen Bubalino”). For its preservation, it was stored in 0.50 mL straws and in tanks of liquid nitrogen (-196 °C). The semen defrosted at 37.0 °C for 45 seconds, previous to the insemination with a Cassou insemination gun.

*Statistical analysis.* Mixed generalized linear models were applied (Wolfinger and O’Connell 1993), with help of GLIMMIX from SAS (2013), version 9.3. The model considered the treatment (hormonal protocol) as fixed effect, and the animal nested in the treatment as a random effect. The co-variable of liveweight at TFAI was analyzed, but it was not significant so, it was not included on the final model. In order to determine the differences among pregnancy rates obtained in each hormonal protocol, the test of Tukey, modified by Kramer (1956), was used, with a signification level for  $P < 0.05$ . The pregnancy variable was considered

El diagnóstico de gestación se realizó a los 45 d mediante ecografía transrectal (AQUILA PRO Esaote Pie Medical®), con sonda lineal de 8.0 y 10.0 MHz. La IATF se hizo con semen de la raza Mediterránea, con certificado de fertilidad, proveniente de Italia (Central de Inseminación Artificial “Coffa Semen Bubalino”). Para su preservación se almacenó en pajuelas de 0.50 mL y en tanques de nitrógeno líquido (-196 °C). Se descongeló a 37.0 °C durante 45 seg, antes de la inseminación con pistola de Cassou.

*Análisis estadístico.* Se aplicaron modelos lineales generalizados mixtos (Wolfinger y O’Connell, 1993), con ayuda del GLIMMIX del SAS (2013), versión 9.3. En el modelo se consideró como efecto fijo el tratamiento (protocolo hormonal) y como aleatorio, el animal anidado en el tratamiento. Se analizó la covariable peso vivo a la IATF, que al resultar no significativa no se contempló en el modelo final. Para determinar las diferencias entre las tasas de gestación obtenidas en cada protocolo hormonal se utilizó la dócima de

as binomial, and its analysis was contemplated in the program (binomial distribution and logit link). The values were retransformed:

Used model

$$Y_{jk} = \mu + A_j + C_j(A_k) + e_{jk}$$

Where:

$Y_{jk}$  =  $f(\mu)$  phenotypical value expected from the studied variables, according to its specific function of link

$\mu$  = mean or intercept

$A_j$  = fixed effect of the  $j$ -th hormonal protocol ( $k=$  I, II, III, IV)

$C_k(A_j)$  = random effect of the  $k$ -th female buffalo nested in the  $j$ -th hormonal protocol

$e_{jk}$  = random error, due to each  $NID \sim (0, s_2e)$  observation

*Expenses of hormonal therapies.* The expenses were determined from the cost of each hormone (Brazil) and the expenses for each hormonal protocol, taking into account the hormone and the dose used. Expenses of hormonal protocols (USD) were calculated per animal and per pregnancy. Pregnancy expenses (GG) per each hormonal protocol was obtained through the following expression:

$$GG = GTP \div NBP.$$

Where:

GTP = total expenses per each protocol per group

NBP = number of pregnant female buffaloes in each group

## Results and Discussion

Regarding the variable pregnancy percentage, the analysis of variance showed significant effect ( $P < 0.05$ ) among the hormonal treatments during the season of larger reproductive activity. The combination of two doses of PGF2 $\alpha$ , with an interval of 11 d, and the administration of CE (P3) showed a pregnancy percentage significantly inferior regarding the rest of the hormonal protocols (1, 2, 4), which had no differences among them. After analyzing the results obtained between treatments 1 and 2, it was confirmed that removing eCG (P2) did not affect the pregnancy percentage. However, the pregnancy percentage increased significantly in the protocol that substituted CE for GnRH (P4), similar to P1 and P2. These results demonstrate that CE affected fertility in the treatments with double doses of PGF2 $\alpha$  (figure 2).

Crudelli *et al.* (2005) reported similar results to those reached in P3, after finding pregnancy percentages of 11.10 % in primiparous buffaloes with continuous lactation. The second application of GnRH of Ovsynch® protocol was replaced by the administration of CE the same day in which PGF2 $\alpha$  was applied. The cited authors considered that low pregnancy indexes could be caused by an anticipated appearance of ovulation regarding the time of FTAI (58-60 hr), because after 48h of the

Tukey, modificado por Kramer (1956), con nivel de significación para  $P < 0.05$ . Se consideró la variable gestación como binomial, y su análisis se tuvo en cuenta en el programa (distribución binomial y link logit). Los valores se ofrecieron retransformados:

Modelo utilizado:

$$Y_{jk} = \mu + A_j + C_j(A_k) + e_{jk}$$

Donde:

$Y_{jk}$  =  $f(\mu)$  valor fenotípico esperado de las variables estudiadas, según su función de enlace específica

$\mu$  = media o intercepto

$A_j$  = efecto fijo de la  $j$ -ésimo protocolo hormonal ( $k=$  I, II, III, IV)

$C_k(A_j)$  = efecto aleatorio de la  $k$ -ésima búfala anidada en la  $j$ -ésimo protocolo hormonal

$e_{jk}$  = error aleatorio, debido a cada observación  $NID \sim (0, s_2e)$

*Gastos de las terapias hormonales.* Se determinaron a partir de los importes de cada hormona (Brasil) y los gastos en que se incurrió para cada protocolo hormonal, en los que se tuvo en cuenta la hormona y la dosis utilizada. Se calcularon los gastos de los protocolos hormonales (USD) por animal y por gestación. El gasto por gestación (GG) de cada protocolo hormonal se obtuvo mediante la siguiente expresión:

$$GG = GTP \div NBP.$$

Donde:

GTP = Gasto total para cada protocolo por grupo

NBP = Número de búfalas gestantes en cada grupo

## Resultados y Discusión

Con respecto a la variable porcentaje de gestación, el análisis de varianza mostró efecto significativo ( $P < 0.05$ ) entre los tratamientos hormonales durante la época de mayor actividad reproductiva. La combinación de dos dosis de PGF2 $\alpha$ , con intervalo de 11 d, y la administración de CE (P3) mostró porcentaje de gestación significativamente inferior con respecto al resto de los protocolos hormonales (1, 2, 4), que no mostraron diferencias entre ellos. Al analizar los resultados obtenidos entre los tratamientos 1 y 2, se constató que al eliminar eCG (P2) no se afectó el porcentaje de gestación. Sin embargo, en el protocolo que se sustituyó el CE por GnRH (P4), el porcentaje de gestación aumentó significativamente, similar al P1 y P2. Estos resultados demuestran que en aquellos tratamientos con doble dosis de PGF2 $\alpha$ , el CE afectó la fertilidad (figura 2).

Crudelli *et al.* (2005) informaron resultados similares a los alcanzados en el P3, al encontrar porcentajes de gestación de 11.10 % en búfalas primíparas con amamantamiento continuo. A estas se les sustituyó la segunda aplicación de GnRH del protocolo Ovsynch® por la administración de CE el mismo día en que se aplicó PGF2 $\alpha$ . Los autores citados consideraron que los bajos índices de preñez pudieron estar dados por la anticipación de la ovulación con

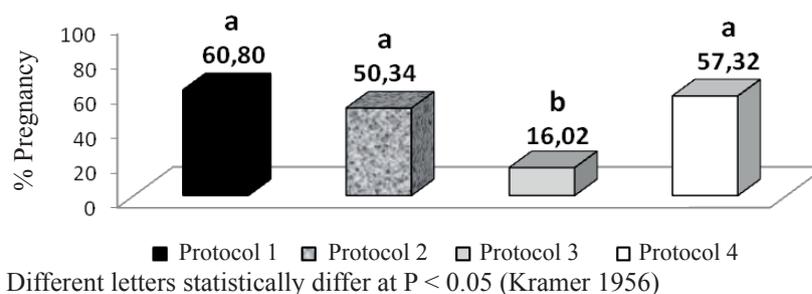


Figure 2. Percentage of pregnancy at TFAI with different hormonal protocols during the breeding season.

application of CE, follicles with ovulation capacity (follicular diameter of 8.00 and 8.50 mm) were found.

Although this study did not determine the follicular development during the hormonal treatment, the results could indicate that CE stimulated earlier the ovulation, regarding the time of FTAI (56-58 hr) in P3. This situation was similar to that observed by other researchers. It is also possible that nulliparous female buffaloes, during the stage of higher ovarian activity, presented, in advance, follicles with ovulatory capacity (<48h). This analysis relates to studies by Presicce *et al.* (2005), who confirmed that nulliparous female buffaloes showed higher daily follicular growth rate (1.30 mm.d<sup>-1</sup>) than primiparous females (0.95 mm.d<sup>-1</sup>).

De Rensis and Lopez-Gatius (2007), in a similar season, also obtained inferior values to those of this study (P1, 2 and 4) in female buffaloes under lactation. This disagreement could be related to the body and reproductive state of animals at the beginning of the postpartum hormonal treatment, as a result of the negative energy balance they experience during lactation, which interferes on the range and frequency of FSH (Follicle-Stimulating Hormone) pulses and the pre-ovulatory peak of LH (Luteinizing Hormone), and, consequently, the post-partum ovarian activity.

Animals that received double doses of PGF2 $\alpha$  and GnRH showed a favorable pregnancy percentage for the species, which indicated an effective synchronization between the ovulatory period and the moment of the fixed-time artificial insemination. This therapy could represent an interesting alternative in the programs of FTAI in nulliparous buffaloes during the season of higher ovarian activity.

Results confirm the criterion of Ohashi (2003), who stated that therapies combining PGF2 $\alpha$  and GnRH are relatively easy because they only imply the parenteral supply of products. In addition, its current costs are affordable, which is an important aspect for a wider use of programs of FTAI in buffaloes.

Marques *et al.* (2005) state the positive effect of eCG on the increase of ovulatory follicle size, which improves the ovulation and pregnancy indexes. However, Baruselli

respecto al horario de la IATF (58-60 hr), ya que encontraron a las 48 h posteriores de aplicar el CE, foliculos con capacidad ovulatoria (diámetro folicular 8.00 y 8.50 mm).

Aunque en este trabajo no se determinó el desarrollo folicular durante el tratamiento hormonal, los resultados podrían indicar que el CE estimuló la ovulación más temprano, con relación al horario de IATF (56-58 hr) en el P3, situación similar a lo observado por los investigadores anteriores. Es posible además que las búfalas nulíparas, durante la etapa de mayor actividad ovárica, presentaran foliculos con capacidad ovulatoria de manera anticipada (< 48 h). Este análisis se relaciona con los estudios de Presicce *et al.* (2005), quienes constataron que las búfalas nulíparas mostraron mayor tasa de crecimiento folicular diaria (1.30 mm.d<sup>-1</sup>) que las primíparas (0.95 mm.d<sup>-1</sup>).

De Rensis y Lopez-Gatius (2007), en similar época del año, también obtuvieron valores inferiores a los de este estudio (P1, 2 y 4) en búfalas en lactación. Estas discrepancias podrían estar relacionadas con el estado corporal y reproductivo de los animales al inicio del tratamiento hormonal posparto, como resultado del balance energético negativo que experimentan durante la lactancia, que interfiere en la amplitud y frecuencia de los pulsos de FSH (hormona foliculo estimulante) y el pico pre-ovulatorio de LH (hormona luteinizante) y, en consecuencia, la actividad ovárica posparto.

Los animales que recibieron doble dosis de PGF2 $\alpha$  y GnRH mostraron porcentaje de gestación favorable para la especie, lo que indicó efectiva sincronización entre el período ovulatorio y el momento de la inseminación artificial a tiempo fijo. Esta terapia podría constituir una alternativa interesante en los programas de IATF en búfalas nulíparas durante la época de mayor actividad ovárica.

Los resultados obtenidos reafirman el criterio de Ohashi (2003), quien asevera que las terapias que combinan PGF2 $\alpha$  y GnRH son relativamente fáciles, ya que solo implican la administración parenteral de los productos. Además sus costos actuales resultan viables, aspectos de gran importancia para la adopción más amplia de programas de IATF en la especie bubalina.

Marques *et al.* (2005) refieren el efecto positivo de la

and Carvalho (2005) pointed out that buffaloes show efficient responses with hormonal protocols for TFAI without eCG during the favorable reproductive season. Nevertheless, during the unfavorable reproductive season, hormonal therapies need eCG to stimulate the follicular development.

The criteria of these authors agree with the results of this study, in which the animals from P1 and P2 showed similar pregnancy percentage (figure 2). This study demonstrated that the eCG can be excluded, during the season of more ovarian activity, from the protocols using DIVP4, associated to estradiol esters, luteolitic and synchronizing ovulation products, with the objective of stimulating and normalizing the follicular wave, the estrum and ovulation.

As table 1 shows, the protocols that did not use eCG (P2, P3 and P4) as stimulant of follicular development showed the lowest expenses per animal, regarding the group that included this hormone (P1). Similar results were found by Noguera *et al.* (2013), after comparing the expenses of Ovsynch® (9.50 USD) and CI-Synch (19.33 USD) therapies with a protocol that used and intravaginal sponge of synthetic P4 (Pregna-Heat-E®, VIATECA), BE2 (2,0mg), eCG (400 IU, Folligon®) and GnRH (0.0084 mg Buserelin Acetate, Conceptal®) in nulliparous female buffaloes during the season of higher ovarian activity (43.13 USD), without finding differences regarding the pregnancy percentage at fixed-time artificial insemination. However, the lowest expenses per gestation were shown by the protocol that associated PGF2alpha and GnRH (PIV) hormones.

Unlike bovines, most of hormonal therapies in buffaloes synchronize the wave of follicular

eCG en el aumento del tamaño del foliculo ovulatorio, lo que mejora los índices de ovulación y preñez. Sin embargo, Baruselli y Carvalho (2005) señalan que la especie bubalina presenta respuestas eficientes con protocolos hormonales para IATF sin eCG, durante la estación reproductiva favorable. Mientras que en el período reproductivo desfavorable, las terapias hormonales necesitan eCG para estimular el desarrollo folicular.

Los criterios de estos autores concuerdan con los resultados de este estudio, en el que los animales de los P1 y P2 mostraron similares porcentajes de gestación (figura 2). El estudio demostró que es posible excluir, durante la época de mayor actividad ovárica, eCG en los protocolos que utilizan DIVP4, asociados a ésteres de estradiol, productos luteolíticos y sincronizantes de la ovulación, con el objetivo de estimular y regularizar la oleada folicular, el estro y la ovulación.

Como muestra la tabla 1, los protocolos que no utilizaron eCG (P2, P3 y P4) como estimulante del desarrollo folicular mostraron los menores gastos por animal, con respecto al grupo que incluyó esta hormona (P1). Resultados similares hallaron Noguera *et al.* (2013), al comparar los gastos de las terapias Ovsynch® (9.50 USD) y CI-Synch (19.33 USD) con un protocolo que utilizó una esponja intravaginal de P4 sintética (Pregna-Heat-E®, VIATECA), BE2 (2,0mg), eCG (400 IU, Folligon®) y GnRH (0.0084 mg Acetato de Buserelina, Conceptal®) en búfalas nulíparas durante la época de mayor actividad ovárica (43.13 USD), sin encontrar diferencias en cuanto al porcentaje de gestación a la inseminación artificial a tiempo fijo. Sin embargo, el menor gasto por gestación lo mostró el protocolo que asoció las hormonas PGF2alfa y GnRH (PIV).

A diferencia de los vacunos, la mayoría de las terapias hormonales en los bubalinos no solo sincronizan la onda

Table 1. Expenses of each hormonal protocol for FTAI and its relation with fertility

Protocols	Pregnancy (%)	Expenses/Protocol (USD)	Expenses/Pregnancy (USD)
PI	60.80 <sup>a</sup>	16.78	27.59
PII	50.47 <sup>a</sup>	10.28	20.42
PIII	16.44 <sup>b</sup>	7.07	44.18
PIV	57.49 <sup>a</sup>	10.63	18.55

Different letters in a line differ statistically at  $P < 0.05$  (Kramer 1956)

development and estrum, and ovulation, due to the variations in process duration. In this sense, other input are needed, which make therapies more expensive and limit technology implementation. However, during the favorable season for reproduction, expenses can decrease because it is possible to use protocols that do not use hormones (eCG) to stimulate the follicular development (Baruselli and Carvalho 2005).

It was demonstrated that pregnancy rates in P1 (60.8 %), P2 (50.3 %) and P4 (57.3 %) were superior ( $P < 0.05$ ) to P3 (16.0 %). There was no influence of eCG on the increase or reduction of fertility. In the protocol with double doses of PGF2 $\alpha$  and

de desarrollo folicular y el estro, sino también la ovulación, debido a las variaciones en la duración de este proceso. En ese sentido, se necesitan otros insumos que encarecen las terapias y limitan la implementación de la tecnología. Sin embargo, durante la época favorable a la reproducción, los gastos pueden disminuir, ya que es posible utilizar protocolos que no incluyen hormonas (eCG) que estimulen el desarrollo folicular (Baruselli y Carvalho 2005).

Se demostró que las tasas de gestación en el P1 (60.8 %), P2 (50.3 %) y P4 (57.3 %) fueron superiores ( $P < 0.05$ ) al P3 (16.0 %). Se comprobó que la eCG no influyó en el incremento o reducción de la fertilidad. En el protocolo con doble dosis de PGF2 $\alpha$  y CE, la fertilidad

CE, fertility decreases, and it increases when the estradiol is substituted by GnRH. It was evident that the protocol with the most reduced cost (P3) had lower percentage and higher expenses per gestation, regarding the rest of the therapies. However, P1 and P2 showed a fertility that did not differ from P4, although with expenses to obtain a gestation superior to this last group (table 1), which is an aspect that classified it as the most efficient treatment. It can be concluded that protocols 1, 2 and 3 synchronize with the estrum and ovulation with a good pregnancy percentage. It is also possible to apply the FTAI for increasing birth rate in buffalo herds, with economical benefits.

### Acknowledgements

Thanks to the Coordenação de Perfeccionamiento para la Educación Superior of the Brazil Republic (CAPES) for the financing (Project 96/2010) to perform this study.

disminuye, y aumenta cuando se sustituye el estradiol por GnRH. Se evidenció que el protocolo con el importe más reducido (P3) presentó menor porcentaje y mayor gasto por gestación, con respecto a las restantes terapias. Sin embargo, los P1 y P2 mostraron una fertilidad que no difirió del P4, aunque con gastos para obtener una gestación superior a este último grupo (tabla 1), aspecto que lo distingue como el tratamiento más eficiente (P4). Se concluye que los protocolos 1, 2 y 3 sincronizan el estro y la ovulación con buen porcentaje de gestación, y que es posible aplicar la IATF para incrementar la natalidad en los rebaños bubalinos, con beneficios económicos.

### Agradecimientos

Se agradece a la Coordinación de Perfeccionamiento para la Educación Superior de la República de Brasil (CAPES) por el financiamiento (Proyecto 96/2010) para la ejecución de este trabajo.

### References

- Baruselli, P.S. & Carvalho, N.A.T. 2005. Controle do desenvolvimento folicular para emprego de biotecnologias da reprodução em bubalinos (*Bubalus bubalis*). Revista Brasileira de Reprodução Animal. 27: 102
- Bó, G.A., Cutaita, L., Peres, L.C., Pincinato, D., Moraña, D. & Baruselli, P.S. 2007. Technologies for Fixed-Time artificial insemination and their influence on reproductive performance of *Bos indicus* cattle. In: Reproduction in Domestic Ruminants VI, Nottingham University Press 223-236
- Crudeli, G., Pellerano, G., Fontana, S., Amuchastegui, F. & Molinari, F. 2005. Inseminación artificial a tiempo fijo en la búfala. Comparación de diferentes dosis de ciproionato de estradiol versus protocolo Ovsynch. I Congreso Europeo–Americano de Búfalos, Salerno, Italia
- Das, G. K. & Khan, F.A. 2010. Summer Anoestrus in Buffalo – A Review. Reprod Dom Anim. 45: 494
- De Rensis, F. & Lopez-Gatius, F. 2007. Protocols for synchronizing estrus and ovulation in buffalo (*Bubalus bubalis*): a review. Theriogenology. 67:216
- El-Wishy, A.B. 2007. The postpartum buffalo: I. Endocrinological changes and uterine involution. Anim. Reprod. Sci. 97: 215
- Hafez, E. 1995. Reprodução animal: Comportamento Reprodutivo. 6. ed. São Paulo: Editora Manole. 581pp.
- Kapa, S. & Alapati, A. 2013. Body Condition Score (BCS) system in Murrah buffaloes. Buffalo Bulletin 32:1298
- Kramer, C.Y. 1956. Extension of multiple range tests to group means with unequal numbers of replications. Biometrics 12: 307
- Marques, M.O., Sa Filho, M.F., Gimenes, L.U., Figueiredo, T.B., Sória, G.F. & Baruselli, P.S. 2005. Efeito do tratamento com PGF2 $\alpha$  na inserção/ou tratamento com eCG na remoção do dispositivo intravaginal de progesterona na taxa de concepção à inseminação artificial em tempo fixo em novilhas nelore. Acta Sci. Vet. 33:287 (abstract).
- Mishra, V., Mishra, A.K. & Sharma, R. 2007. Effect of ambient temperature on *in vitro* fertilization of Bubaline oocyte. Anim. Reprod. Sci. 100: 384
- Mohan, K & Prakash, B. S. 2010. Changes in endogenous estrogens and expression of behaviors associated with estrus during the periovulatory period in Heatsynch treated Murrah buffaloes (*Bubalus bubalis*). Trop. Anim. Health Prod. 42: 952
- Noguera, S.E., Vale, W.G., Ribeiro, H.F.L., Rolim Filho, S.T., Reis, A.N., Sousa, J. S. & Silva, A.O. 2013. Fixed-time artificial insemination in cows and buffaloes using an intravaginal releasing progesterone insert. Livestock Research for Rural Development. 25: 247
- Ohashi, O. M. 2003. Contribuição ao estudo dos bubalinos. Períodos de 1972-2001. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. Sao Paulo. Varela eds. Livreria Cap. 6. p. 97
- Porto Filho, R., Gimenes, L., Monteiro, B., Carvalho, N., Ghuman, S., Madureira, E & Baruselli, P. 2014. Detection of estrous behavior in buffalo heifers by radiotelemetry following PGF2 $\alpha$  administration during the early or late luteal phase. Animal Rep. Sci. 144: 94
- Presicce, G.A., Bella, A., Terzano, G.M., De Santis, G. & Senatore, E.M. 2005. Postpartum ovarian follicular dynamics in primiparous and pluriparous Mediterranean Italian buffaloes (*Bubalus bubalis*). Theriogenology 63: 1439
- SAS. 2013. SAS User's guide: Statistics. Version 9.3. SAS. Institute. INC, Cary, N.C., USA
- Wolfinger, R. & O'Connell, M. 1993. Generalized linear models: a pseudo-likelihood approach. J. Statist. Computo Simul. 48:243