




Uso de la progesterona como método de la sincronización de celo durante la estación reproductiva favorable en búfalos de agua¹

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

Diana M Bolívar-Vergara ^{1,2}, Benjamín Londoño-Soto ², Luis F Gallego-Arcila ², Felipe Gual-Restrepo ², David Stiven Ríos-López ², Guillermo A Correa-Londoño ¹, Jesús A Berdugo-Gutiérrez ^{1,3}

¹ *Grupo BIOGEM, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín.*

² *Grupo Probúfalos, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín.*

³ *Centro Latinoamericano para el estudio del búfalo. Medellín Colombia.*

dmboliva@unal.edu.co

(Recibido: 13 de Julio de 2016 Aprobado: 18 de Noviembre de 2016 Actualizado: 7 de diciembre de 2016)

DOI: 10.17151/vetzo.2016.10.2.1

RESUMEN: El objetivo fue evaluar el efecto de la progesterona sobre la preñez en protocolos de sincronización de ovulación para inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) en búfalas durante la época reproductiva favorable. Se utilizaron 16 búfalas paridas en ordeño, asignadas al azar en dos tratamientos. T1: sincronización con implante de progesterona; T2: protocolo OvSynch. Se evaluó la preñez al día 28, la respuesta ovárica mediante ecografía y los niveles de estradiol y progesterona con ELISA. Con una prueba chi-cuadrado, se evaluó el efecto de la progesterona sobre la tasa de preñez. Se realizó una prueba de T para evaluar el efecto del peso, días en leche, niveles de progesterona y estradiol el día de la IA y cinco días después de la IA, sobre la tasa de preñez. Se utilizó un diseño completamente al azar con un arreglo de medidas repetidas en el tiempo, para analizar los niveles hormonales durante el protocolo. La tasa de preñez general fue 31,2%, sin diferencia significativa entre los tratamientos ($P=0,1056$). No se encontró efecto del peso, días en leche, niveles de progesterona y estradiol sobre la tasa de preñez ($P>0,05$). Los niveles de progesterona fueron más altos al momento de la inyección de prostaglandina ($P=0,0006$) y cinco días después de la IA ($P=0,005$) que en la IA. El estradiol no mostró diferencias en los días analizados. Se presentó alta variación en los niveles de progesterona al momento de la aplicación de la prostaglandina entre 0,2 y 28,9 ng/ml y de estradiol en el momento de la inseminación entre 47,4 y 211,9 pg/ml. El uso de progesterona no confiere ventajas sobre el protocolo usualmente utilizado para la época reproductiva favorable en la especie. Debe considerarse la variación hormonal individual al momento de aplicar los protocolos de IATF.

Palabras clave: búfalas en ordeño, hormonas, inseminación a tiempo fijo, protocolo OvSynch

Use of progesterone as a method of estrus synchronization during the favorable reproductive season in water buffalo

ABSTRACT: The objective was to evaluate the effect of progesterone on pregnancy in fixed time artificial insemination (FTAI) synchronization protocols in buffaloes during favorable breeding season. 16 milking calved buffaloes were randomly assigned to one of the following protocols T1: synchronization using progesterone and; T2: conventional OvSynch protocol. Pregnancy was evaluated 28 days after of artificial insemination: ovarian response was determined by ultrasonography and progesterone and estradiol by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Effect of progesterone on pregnancy rate was evaluated through Chi square-test. T-student test was carried out to evaluate the effect of weight, milking days, progesterone and estradiol levels, on day of artificial insemination and 5 days after, on rate of pregnancy. It was used a random design with and arrangement of repeated measures over time, to analyze hormonal levels during the protocol. Overall pregnancy level was 31.2%, without differences between protocols ($P=0.1056$). No effect of weight, milking days and estradiol and progesterone levels on pregnancy rate were found ($P>0.05$). Progesterone levels were higher in prostaglandin injection ($P=0.0006$) and five days after ovulation ($P=0.005$) than in artificial insemination. No differences in estradiol levels were found during experiment. It was observed high variation of progesterone levels in prostaglandin injection (between 0.2 and 28.9 ng/ml) and estradiol levels in insemination (between 47.4 and 211.9 pg/ml). The use of progesterone does not improve pregnancy rates in FTAI during favorable breeding season in analyzed species. Individual hormonal variation must be considered and evaluated during the application of FTAI protocols.

Key words: milking buffaloes, hormones, timed artificial insemination, OvSynch protocol

Introducción

Dadas las ventajas que presenta esta especie, existe gran interés de aumentar la población y su productividad; según los reportes de vacunación de la Federación Colombiana de Ganaderos, FEDEGAN, el inventario de búfalos en Colombia ha tenido un incremento del 16% anual durante los últimos cinco años. La aplicación de biotecnologías reproductivas es una herramienta para mejorar la rentabilidad de los sistemas de producción, entre ellas la inseminación artificial.

En Colombia, la inseminación artificial en la especie bufalina se ha aplicado desde el año 2003 (Berdugo, 2012), pero su uso no se ha masificado debido a la dificultad para detectar el celo (solamente alrededor del 4% de las hembras tienen comportamiento homosexual), a la variable duración del estro (4-64 horas) y a la dificultad en la predicción del momento de la ovulación (De Rensis & López, 2007) y no menos importante, la baja tasa de preñez obtenida (30% en promedio).

Debido a las dificultades mencionadas y a que existen pocos programas donde se utilice el celo natural, en Colombia se ha utilizado la IATF utilizando diferentes esquemas de sincronización de ovulación. El protocolo más conocido es del OvSynch, que se ha

propuesto para ser usado en la estación reproductiva favorable de los búfalos. Para la estación reproductiva desfavorable se ha sugerido el uso de protocolos de sincronización basados en el uso de la progesterona, tanto vaginal como auricular, permitiendo activar el ovario de una manera más eficiente. Autores italianos y asiáticos han informado que las deficiencias en la producción de progesterona, son la principal limitante del éxito en los programas de IA en búfalas y es causa de la alta mortalidad embrionaria en la especie (Zicarrelli et al., 1997; Campanile et al., 2005; Roy & Praksah, 2009).

Para la verificación de la respuesta del animal a los protocolos, se han utilizado la ultrasonografía y las mediciones hormonales. Para la determinación de las hormonas se ha usado radioinmunoensayo, sin embargo, los peligros asociados a la manipulación de radioactividad y la generación de desechos radioactivos, han hecho que se busquen algunos métodos más seguros, como el ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) (Abraham, 1981; Kabir et al., 2011). En todos los casos, los inmunoensayos requieren anticuerpos específicos contra los esteroides, previa remoción de los esteroides a sus proteínas de unión endógena. Se acepta para la determinación de las hormonas el uso de suero o plasma; actualmente existen kits comerciales con una alta sensibilidad y especificidad.

Nuestro grupo de investigación viene evaluando modificaciones al protocolo convencional para incrementar las tasas de preñez en búfalas. Se evaluó la pre-sincronización con prostaglandina en un programa del ATF, sin encontrar diferencia significativa cuando se comparó con el protocolo OvSynch convencional (Saldarriaga et al., 2016). De Rensis et al. (2005) evaluaron el efecto de la suplementación con progesterona en el protocolo OvSynch en búfalas de la raza Mediterránea en Italia, encontrando un efecto significativo en la tasa de preñez en búfalos no cíclicos (30% vs 4,7%), pero no en los búfalos cíclicos (51,5% vs 35,7%). Igualmente, Neglia et al. (2003) compararon dos protocolos de sincronización del estro (OvSynch y con implante de progesterona) en búfalas mediterránea en Italia, sin encontrar diferencia en las tasas de preñez entre los dos protocolos, las cuales fueron 36% y 28%. Sin embargo, cuando se consideraron sólo los animales con P4 elevada en el día 10 después de la IA, la tasa de preñez fue mayor en las búfalas sincronizadas con el protocolo OvSynch (44,4%) que en aquellas que recibieron el implante de progesterona (30,3%).

Con el objetivo de incrementar las tasas de preñez en los programas de inseminación artificial en búfalos de agua, se decidió evaluar el uso de los implantes de progesterona para la sincronización del celo durante la estación reproductiva favorable.

Materiales y Métodos

Localización

El trabajo fue realizado en el municipio de la Apartada, departamento de Córdoba al norte de Colombia, en una zona de bosque húmedo tropical, con temperatura promedio

de 28°C, una altitud de 60 msnm, precipitación anual entre 2000 y 3000 mm y humedad relativa entre 80 y 86%.

Animales

El trabajo se realizó durante noviembre y diciembre del año 2015, época favorable para la reproducción en esta especie, como informan Angulo et al. (2004) y Espitia et al. (2014); esta época se considera como favorable, debido a que entre los meses de agosto y enero se concentra la mayor cantidad de partos en las bufaleras de la región. La aplicación de los protocolos de sincronización se realizó en diciembre, coincidiendo con la época seca en esta región. De un grupo de 56 búfalas fueron seleccionadas 16 aptas anatómicamente, en edad reproductiva, mestizas, múltiparas, vacías con la presencia de un folículo o cuerpo lúteo posparto y con una condición corporal entre 4,0 y 4,5 (escala de 1 a 5), donde 1 es subcondicionada y 5 sobrecondicionada (Carvalho et al., 2014). Las búfalas presentaron un peso promedio de 578±59 kg, y tenían 60±21 días postparto al inicio del estudio. El primer día del experimento, los animales fueron pesados, se les evaluó la condición corporal y se realizó palpación rectal y diagnóstico ecográfico, para determinar la presencia de estructuras en los ovarios. Las búfalas fueron ordeñadas una vez al día y permanecieron en pastoreo de brachiaria (*Brachiaria humidicola*), grama nativa (*Paspalum notatum*), y angleton (*Dichantium aristatum*), con acceso a agua y sal mineralizada a voluntad. Los animales del experimento se mantuvieron en un solo grupo y fueron sometidos a las mismas condiciones de manejo.

Sincronización de la ovulación

Las búfalas fueron asignadas al azar a dos tratamientos: T1: sincronización con implante de progesterona; T2: protocolo OvSynch. Ocho búfalas por tratamiento. El protocolo seguido para T1 en cada animal fue: el primer día (0), se le introdujo un dispositivo vaginal de 1 g de progesterona (DIB®, Syntex, Argentina) y se aplicaron 250 ug de acetato de buserelina (Gestar®, Over, Argentina) vía intramuscular; el día 7 vía intramuscular 500 ug de cloprosteno, (Estrumate®, Merck, USA); el día 9 fue retirado el implante y el día 11 se les administró 250 ug de acetato de buserelina (Gestar®, Over, Argentina) vía intramuscular. Para el protocolo T2: el día 0 se le administró 250 ug de acetato de buserelina (Gestar®, Over, Argentina) vía intramuscular; el día 7, 500 ug de cloprostenol (Estrumate®, Merck, USA); el día 9 se aplicó 250 ug de acetato de buserelina (Gestar®, Over, Argentina).

Inseminación artificial

La inseminación se realizó 16 horas después de la última inyección de acetato de buserelina, en los dos tratamientos, por un inseminador experimentado, con semen de un mismo búfalo de fertilidad probada. El semen fue analizado mediante el método convencional y por CASA (Computer Assisted Semen Analysis) en el Laboratorio de Reproducción de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. La concentración y movilidad por dosis fueron 69x10⁶ y 91% respectivamente, siendo aptas para usar en IA. En el momento de la inseminación fue evaluada la presencia de moco.

Evaluación de la respuesta ovárica

Se evaluó la respuesta ovárica mediante la presencia de estructuras ováricas por ultrasonido (utilizando un equipo Pie Medical Parous 240®, con una sonda transrectal de 7,5 Mhz) y por la determinación en sangre de los niveles de progesterona (P4) y estradiol (17 β) desde el inicio de los protocolos hasta cinco días después de la inseminación artificial. Las muestras para medir P4 fueron tomadas los días 0, 2, 5, 7, 8, 9, 10, 11 y 15, y para medir los niveles de estradiol los días 5, 7, 8, 9, 10, 11 y 15.

Para medir P4 y 17 β en suero, las muestras fueron tomadas en tubo sin anticoagulante. La determinación hormonal se realizó mediante la técnica de ELISA, utilizando un kit comercial (ACCUBIND®, Elisa microwells, Monobind Inc. CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los valores fueron determinados mediante la construcción de una curva de calibración, con rangos entre 0 y 3000 pg/ml para el estradiol y entre 0 y 60 ng/ml para la progesterona, basada en la curva se calculó el valor de cada muestra evaluada. Las características de rendimiento reportadas por el fabricante son: 1. Sensibilidad del Estradiol de 8,2 pg/ml y la de la progesterona es de 0,105 ng/ml. 2. Coeficiente de correlación entre la prueba enzimática utilizada y la quimiluminiscencia de 0,989 para las dos hormonas evaluadas.

Diagnóstico de preñez

El diagnóstico de preñez fue realizado a los 28 días después de la inseminación artificial, mediante ecografía y se calculó la tasa de preñez.

Análisis estadístico

Con una prueba de independencia chi-cuadrado (χ^2) sobre una tabla de contingencia de 2x2, se evaluó el efecto de la progesterona sobre la tasa de preñez. Se realizó una prueba de homogeneidad de varianzas mediante la prueba F, y una prueba de T para evaluar el efecto del peso, días en leche, niveles de progesterona y estradiol el día de la IA y cinco días después de la IA, sobre la tasa de preñez. Para estos análisis se utilizó el programa R (R Core Team, 2016). Para analizar los niveles hormonales durante el protocolo se utilizó un diseño completamente al azar con un arreglo de medidas repetidas en el tiempo. Para la P4 se comparó la concentración entre los días 0 (inicio), 7 (aplicación de la prostaglandina), 11 (inseminación artificial) y 15 (cinco días después de la IA). Para el estradiol se compararon las concentraciones de los días 5, 7 (aplicación de la prostaglandina), 11 (inseminación artificial) y 15 (cinco días después de la IA). Se utilizó una estructura de varianza autorregresiva de primer orden para el estradiol y simetría compuesta para la progesterona. Se consideró diferencia significativa, cuando se obtuvieron valores de P menores o iguales a 0,05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La tasa de preñez general fue 31,2% (5/16). Aunque se obtuvo 50% de preñez con el implante de progesterona (4/8) y solo el 12,5% (1/8) con el protocolo OvSynch convencional, no se presentó diferencia significativa entre los dos tratamientos ($P=0,1056$). Aunque la diferencia entre los dos protocolos es considerable, la baja potencia de la prueba, dada por el tamaño de muestra, posiblemente no permite concluir que efectivamente haya diferencia a nivel poblacional. Estos resultados coinciden con los reportados por De Rensis et al. (2005), quienes no encontraron efecto de la suplementación con progesterona en el protocolo OvSynch en búfalas que estaban ciclando, obteniendo una tasa de preñez de 51,5% y 35,7% con y sin adición de progesterona. Igualmente, Neglia et al. (2003) no encontraron diferencia en las tasas de preñez cuando utilizaron el protocolo OvSynch e implante de progesterona reportando tasas de preñez de 36% y 28%, para los dos protocolos, respectivamente.

La tasa de preñez obtenida en este trabajo es comparable con las obtenidas en la literatura, tanto las informadas previamente por el grupo de investigación como por otros autores. Di Francesco et al. (2012), reportaron mayores porcentajes de preñez utilizando el protocolo OvSynch, encontrando 58% y 45,6% en búfalas mediterráneas en la estación reproductiva y en el periodo de transición en Italia, respectivamente. En Colombia no se han hecho reportes sobre el uso de dispositivos vaginales de progesterona en protocolos de sincronización de celo en la especie. Virmani et al. (2016), informan una tasa de concepción del 68,02%, con el protocolo OvSynch que puede ser considerada alta comparada con los resultados de este experimento y lo informado por Mialot et al. (1999), Irikura et al. (2003) y Baruselli et al. (2003), que reportaron 27,2%, 36,1% y 42,4% respectivamente.

En 12 de las 16 búfalas se observó un folículo dominante en el momento de la inseminación (75%), igualmente distribuidas entre los dos protocolos (T1:6 y T2:6) y de éstas un 50% (6/12) mostró un cuerpo lúteo al día cinco después de la IA. Tres búfalas con cuerpo lúteo presentaron preñez. No se encontró asociación entre preñez y la presencia de folículo mayor a 10 mm en el momento de la IA ($P=0,3502$), la ubicación del folículo en los ovarios ($P=0,3770$) y presencia de cuerpo lúteo en los ovarios cinco días después de la ovulación ($P=0,8721$). Únicamente se encontró asociación entre la presencia de moco en el momento de la inseminación y la preñez ($P=0,0249$).

En cuanto los niveles de progesterona y estrógenos en sangre, se observó alta variabilidad entre búfalas en ambos tratamientos durante todo el periodo evaluado. Para el caso de la progesterona, al inicio del experimento se encontró un promedio de $7,76\pm 10,42$ y $5,88\pm 4,31$ ng/ml para los tratamientos 1 y 2 respectivamente. Los rangos estuvieron entre 1,5 y 29,1 ng/ml y entre 1,3 y 12,9 ng/ml, en ambos tratamientos con coeficientes de variación de 134,19 y 73,43 (T1 vs T2). Para el día 8 (un día después de la aplicación de la prostaglandina), si bien se observó una reducción de los niveles de progesterona en todas las búfalas, encontrándose unos promedios de $1,88\pm 1,45$ y $1,50\pm 1,01$ ng/ml, para los tratamientos 1 y 2; se siguió observando una alta variabilidad entre animales con valores entre 0,2 y 4,3 y entre 0,2 y 3,5 ng/ml, con coeficientes de variación de 77,485 y 67,33% para T1 y T2, respectivamente. Para el estrógeno se encontró en el día cinco después de iniciado el protocolo un promedio de $104,83\pm 81,85$ y $80,67\pm 35,57$ pg/ml, con unos valores mínimos de 34,6 y 51,6 pg/ml y valores máximos de 207,6 y 153,8 pg/ml, con coeficientes de variación de 78% y 44%, para los

tratamientos 1 y 2, respectivamente. Para el día 8 se encontraron valores similares con un promedio de $106,11 \pm 73,70$ y $83,59 \pm 38,83$ pg/ml, manteniendo la misma variabilidad con valores entre 55,4 y 212,5 pg/ml y entre 39,3 y 149,8 pg/ml y coeficientes de variación de 63 y 46% para los tratamientos 1 y 2, respectivamente.

No se encontró diferencia significativa entre tratamientos para la concentración promedio de progesterona durante el período evaluado ($p=0,4040$), pero sí hubo diferencia significativa entre el inicio del tratamiento (día 0) y el momento de la inseminación (día 11) ($P= 0,0006$) y 5 días después de la misma ($p=0,005$) (Tabla 1). Para la concentración promedio de estradiol no se encontró diferencia significativa entre tratamientos ($p=0,3914$). Los niveles de esta hormona durante el periodo del protocolo y con la frecuencia de evaluación no se encontraron diferencias ($p>0,05$) (Tabla 1).

Tabla 1. Concentraciones de estradiol y progesterona en sangre de búfalas sincronizadas con el protocolo OvSynch y con implante de progesterona en la estación reproductiva.

Efecto/Hormona	Media \pm EEM	Rango
Progesterona (ng/ml)		
Tratamiento 1: implante con progesterona	$3,94 \pm 1,16^a$	0,1 – 29,1
Tratamiento 2: protocolo OvSynch	$2,53 \pm 1,16^a$	0,1 – 12,9
Día 0: inicio	$6,82 \pm 1,31^a$	1,3 – 29,1
Día 7: aplicación prostaglandina	$3,63 \pm 1,31^{ab}$	0,2 – 28,9
Día 11: IA	$0,64 \pm 1,31^b$	0,1 – 2,6
Día 15: PostIA*	$1,86 \pm 1,31^b$	0,6 – 4,6
Estradiol (pg /ml)		
Tratamiento 1: implante con progesterona	$113,60 \pm 21,37^a$	34,6 - 239
Tratamiento 2: protocolo OvSynch	$86,87 \pm 21,37^a$	39,3 – 153,8
Día 5	$95,83 \pm 15,28^a$	34,6 - 207,6
Día 7: aplicación prostaglandina	$99,73 \pm 15,26^a$	39,3 – 217
Día 11: IA	$100,39 \pm 15,26^a$	47,4 - 211,9
Día 15: PostIA*	$104,98 \pm 15,26^a$	51,1 – 239

*Cinco días después de la ovulación

EEM: Error estándar de la media

Los principales resultados para la discusión del presente trabajo tienen que ver con dos aspectos, siendo uno consecuencia del otro. El primer aspecto son las bajas tasas de preñez que se obtienen en la especie bufalina, especialmente si se compara con la reportada en vacas. El segundo aspecto tiene que ver con el particular comportamiento endocrino de las búfalas, fundamentalmente la variación individual en los niveles de

progesterona y los niveles constantes de estradiol durante el periodo evaluado, pudiendo estos contribuir a explicar las bajas tasas de preñez obtenidas. En trabajos futuros es importante realizar mediciones con mayor frecuencia, que permitan identificar a detalle los cambios endocrinos. Para el caso del estradiol, en el que ocurren cambios muy marcados en el periodo preovulatorio, debería tomarse con diferencia de horas.

Los valores de progesterona encontrados durante el período evaluado (desde inicio del protocolo hasta cinco días después de la inseminación) estuvieron entre 0,64 (día de la IA) y 6,82 ng/ml (día 0), independiente del protocolo de sincronización utilizado. Di Francesco et al. (2012), en búfalas mediterráneas sincronizadas con el protocolo OvSynch, encontraron unas concentraciones de P4 a los 10 y 20 días después de la IA de $4,6\pm 0,3$ y $3,4\pm 0,2$ ng/mL, respectivamente en la estación reproductiva y de $1,6\pm 0,12$ y $1,8\pm 0,2$ ng/mL en el período en transición de Italia; siendo mayores en la estación reproductiva ($P<0,01$). Valores superiores a los encontrados en este trabajo cinco días después de la inseminación ($1,86\pm 1,31$). Carvalho et al., (2014), mencionaron que aún no se conocen los niveles de P4 que puedan afectar la preñez e informan que sus niveles al inicio del tratamiento no tienen un efecto significativo sobre las tasas de gestación. La dinámica de la progesterona observada en este experimento, es similar a la observada por Ghuman et al. (2015), para aquellas búfalas a las que se les colocó un implante de progesterona para sincronizar el celo.

Es importante tener en cuenta la alta variación del metabolismo de la P4; se ha reportado es afectado por la raza, estado fisiológico y sistema productivo. A diferencia de lo que sucede en las vacas, en búfalos se ha informado que concentraciones bajas, alrededor de 1 ng/ml, son suficientes para realizar un control del desarrollo folicular, ovulación y tasas de gestación. Altos niveles de P4, pueden afectar la frecuencia de pulsos de la LH (Ireland & Roche, 1982; Bergefeld et al., 1995; Burke et al., 1996). En este experimento, el nivel promedio de P4 cinco días después de la IA fue de 1,86 ng/ml, con el cual se esperaría una adecuada respuesta de los animales a los tratamientos, que no se vio reflejado en la tasa de preñez encontrada. Después de la ovulación, las células existentes dentro del folículo tienen que cambiar su principal ruta metabólica para la producción de progesterona, como parte integral del proceso de luteinización necesario para la preñez; es así como se ha definido una concentración mínima para definir un cuerpo lúteo funcional. En este trabajo, el medir al quinto día y tener niveles comparables con lo informado en la literatura, puede indicar que son funcionales; pero lo que están mostrando los resultados es que al menos en esta experimentación, esos niveles al día 5 no son tan confiables como si se tomaran en días posteriores o en otras especies de bovinos.

Se considera importante mencionar que en este trabajo se utilizó ELISA para la determinación de las hormonas, mientras que la mayoría de informes lo hacen utilizando radioinmunoensayo (Abraham, 1981; Kabir et al., 2011). El kit permite hacer una curva basada en controles internos que el fabricante provee y basado en ello se realizan las curvas. En este trabajo se encontró una alta variabilidad entre búfalas, siendo importante evaluar los valores presentados por algunos animales. Se debe anotar que es el primero en el país en el que se informan valores hormonales para la especie.

En la [tabla 2](#) se presentan los parámetros fisiológicos evaluados en las búfalas preñadas y vacías. No se encontró asociación de los pesos al inicio del protocolo, al momento de la IA, cinco días después de la IA, ni de los días en leche sobre la tasa de preñez. Los

pesos de las búfalas sometidas al implante con progesterona (T1) y al protocolo OvSynch fueron similares ($p>0,05$); los pesos al inicio fueron 587 ± 80 y 570 ± 33 kg, en el momento de la IA 571 ± 84 y 552 ± 32 kg y cinco días después de la IA fueron 558 ± 85 y 536 ± 31 kg para T1 y T2, respectivamente. Igualmente, las búfalas sometidas a los dos tratamientos tenían los mismos días en leche, 65 ± 23 y 54 ± 20 días.

Tabla 2. Comparación de los parámetros fisiológicos de búfalas vacías y preñadas sometidas a IATF.

Características	Estado fisiológico		P
	Preñadas	Vacías	
Peso inicial (kg)	615±88	562±36	0,099
Peso IA (kg)	602±89	543±38	0,079
Peso Pos (kg)	583±93	530±39	0,123
Días en leche (días)	61±23	59±22	0,907
P4 IA (ng/ml)	0,400±0,235	0,745±0,808	0,372
P4 Post IA(ng/ml)	1,560±0,691	1,991±1,260	0,490
Estradiol IA (pg /ml)	87,64±49,33	106,18±58,59	0,550
Estradiol Post IA(pg /ml)	85,80±45,18	113,70±63,08	0,392

Peso Inicial: peso al inicio del protocolo; Peso IA: peso el día de la IA; Peso Pos: peso cinco días después de la IA; P4 IA: concentración de progesterona el día de la IA; P4 Post IA: concentración de progesterona cinco días después de la IA; Estradiol IA: concentración de estradiol el día de la IA; Estradiol Post IA: concentración de estradiol cinco días después de la IA.

Si bien los animales perdieron peso, dichas pérdidas no fueron significativas entre el inicio del tratamiento y el momento de la inseminación artificial, que fue la última vez en que los animales fueron movidos diariamente del potrero al corral (17 kg en promedio). Además, en la [tabla 2](#) se puede observar que las pérdidas de peso fueron similares para los animales vacíos (18 Kg) y preñados (13 Kg) ($P=0,6614$), siendo importante resaltar que el trabajo se realizó durante la época seca. Con estos resultados se puede afirmar que, con buenas condiciones de manejo, las búfalas no presentan alteraciones en cuanto al peso, debido a la manipulación necesaria para la administración de medicamentos, el sangrado y las ecografías, sin que ello represente un sesgo para el protocolo o la realización de los experimentos.

Aunque ha sido ampliamente reportado la influencia que tienen los días abiertos sobre las tasas de preñez en bovinos, en algunos experimentos controlados no se ha reportado efecto, como en el trabajo desarrollado por Sá Filho et al. (2009). Resultados similares fueron encontrados en este estudio, siendo importante resaltar que las búfalas utilizadas tenían en promedio 60 ± 21 días postparto al inicio de este estudio ([Tabla 2](#)), el cual se considera un rango estrecho, más difícil para encontrar diferencias.

En la [tabla 2](#) se puede observar que no se encontraron diferencias en las concentraciones de progesterona y estradiol en el momento de la IA y cinco días después entre los animales vacíos y preñados. Aunque no hubo diferencias significativas en los niveles de progesterona entre los grupos, se pudo observar el comportamiento esperado de la hormona en relación con la dinámica hormonal del ciclo inducido. En todos los

animales, independientemente de los valores individuales, hubo una reducción de los niveles de progesterona después de la inyección de prostaglandina. Además se encontró un aumento considerable cuando se compara el momento de la IA y los cinco días de esta, tanto en vacías ($0,745 \pm 0,808$ vs $1,991 \pm 1,260$) como en preñadas ($0,400 \pm 0,235$ vs $1.560 \pm 0,691$). De nuevo se resalta la alta variación entre las búfalas.

Poca información existe en los búfalos sobre el comportamiento de la P4 en los primeros siete días postovulación. En Italia, Vecchio et al. (2012), encontraron que en el día cinco postovulación no hay diferencias en los niveles de P4 entre preñadas y vacías, demostrando que aún no hay consolidación del cuerpo lúteo. Es importante anotar que los niveles informados por los autores italianos son más de dos veces los encontrados en este trabajo $3,9$ y $3,6$ ng/ml vs $1,99$ y $1,56$ ng/ml para búfalas vacías y preñadas respectivamente.

En el 81% (13/16) de las búfalas se obtuvieron en el día cinco después de la IA, niveles de progesterona que sugerían la presencia de un cuerpo lúteo activo ($>1,5$ ng/ml) (Zicarelli et al., 1997); sin embargo solo cinco fueron diagnosticadas preñadas 28 días después de la IA, indicando que en el momento del muestreo hormonal, posiblemente el cuerpo lúteo no estaba bien consolidado. Al respecto Di Francesco et al. (2012), encontraron cambios en los niveles de P4 entre el día 10 y 20 después de la IA; dichos cambios dependieron de si las búfalas estaban vacías o preñadas y de la estación de servicio. Dichos autores reportaron que durante la estación de servicio las búfalas preñadas presentaron una concentración de progesterona de $4,99 \pm 0,4$ y $4,2 \pm 0,3$ a los 10 y 20 días, mostrando poco cambio; mientras que en las búfalas vacías dichos valores fueron de $4,08 \pm 0,4$ y $2,3 \pm 0,4$, disminuyendo casi en un 50% la concentración de progesterona a los 20 días. En el período de transición, mientras que en las búfalas preñadas la concentración incrementó ($1,93 \pm 0,2$ vs $2,5 \pm 0,2$), en las vacías se mantuvo prácticamente constante ($1,35 \pm 0,1$ vs $1,30 \pm 0,3$). Lo anterior indica un comportamiento variable de la P4 en las búfalas y que el monitoreo debe realizarse por un mayor período. Neglia et al. (2003), reportaron mayores niveles de P4 en leche el día 10 después de la IA en búfalas con implante de progesterona que en búfalas sometidas al protocolo OvSynch, sin embargo no encontraron diferencias en las tasas de preñez entre los dos protocolos de sincronización del estro (36% vs 28,2%).

Después de la inyección de prostaglandina hubo un descenso en los mismos en todos los casos. En las búfalas preñadas se pudo observar un aumento de 3,9 veces en los niveles progesterona en el día cinco después de la IA. Para el estradiol se observó que los niveles se mantuvieron prácticamente constantes en los dos momentos evaluados, en la inseminación y en el día cinco después de la IA, encontrándose valores de $87,4$ pg/ml y $85,8$ pg/ml, respectivamente. Una posible explicación para lo observado es que el pico de estrógenos ocurre aproximadamente entre 8 y 16 horas post-inyección de GnRH (Roy & Pracksh, 2009; Mirmamoudhi et al., 2014), por tanto la frecuencia de mediciones en este experimento no permitieron observar dichos cambios. Además en el momento de realizar el muestreo para determinar las hormonas (día cinco después de la IA) el cuerpo lúteo no está completamente formado, indicando que este período de medición no fue suficiente para ver diferencias.

Desde el punto de vista clínico, es fundamental entender cuál puede ser el efecto sobre la respuesta al tratamiento en el caso de una búfala que al inicio del protocolo tenga una concentración de progesterona de $29,1$ ng/ml, cuatro veces la concentración promedio

encontrada (6,82 ng/ml). Es de anotar que los animales con parámetros fuera de la media no tuvieron preñez. El hecho que no haya cambios en los niveles de estradiol durante la inducción muestra una dinámica especial en los búfalos, que requiere ser estudiada ya que pudieran ser la explicación de las particularidades de la expresión del calor y de la baja tasa de preñez con los protocolos tradicionalmente utilizados.

Conclusiones

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que el uso de progesterona durante la época favorable no confiere ventajas en términos de preñez cuando se compara con el protocolo OvSynch utilizado convencionalmente en la especie. Los hallazgos ecográficos y hormonales muestran un particular comportamiento endocrino de las búfalas, dada la alta variación individual en los niveles de progesterona y los niveles constantes de estradiol durante el periodo evaluado, pudiendo esto contribuir a explicar las bajas tasas de preñez obtenidas. Se debe continuar con esta línea de investigación realizando trabajos con un mayor número de búfalas, en diferentes épocas y determinando niveles hormonales con mayor frecuencia. Esto permitirá entender mejor el comportamiento endocrino en esta especie, lo cual puede conllevar a la adaptación de los protocolos de sincronización para mejorar la respuesta en términos de preñez.

Agradecimientos

Los autores agradecen por la financiación a la Universidad Nacional de Colombia, a la Asociación Colombiana de Criadores de Búfalos por facilitar el semen, y a GARLEMA S.A. (bufalera El Teatro) por permitir el uso de sus animales.

Referencias bibliográficas

Abraham, G.E. **The application of natural steroid radioimmunoassay to gynecologic endocrinology**. In: Abraham G.E. (Ed). Radioassay Systems in Clinical Endocrinology. Basel: Marcel Dekker, 1981. p. 475-529.

Angulo, A.; Muñoz, L.; González M. et al. Sincronización de la ovulación e inseminación artificial en búfalas a tiempo fijo. **MVZ-Córdoba**, v. 9, n.2, 2004. Disponible en: <http://revistas.unicordoba.edu.co>. Accesado en: 13/06/2016.

Baruselli, P.S.; Madureira, E.H.; Barnabe, R.C. et al. Evaluation of synchronization of ovulation for fixed timed insemination in buffalo (*Bubalus bubalis*). **Brazilian Journal**

of **Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, p.431-442, 2003. Disponible en: <http://www.scielo.br/pdf/bjvrras/v40n6/a07v40n6.pdf> Accesado en: 13/06/2016.

Berdugo, J.A. Historia de la aplicación de biotecnologías reproductivas en la cría del búfalo en Colombia. **Uni-pluri/versidad**, v.12, n.3, p. 87-91, 2012.

Bergefeld, F.G.; Kojima, F.N.; Wehrman, M.F. et al. Frequency of luteinizing hormone pulses and circulating 17 β -estradiol concentration in cows is related to concentration of progesterone circulation when progesterone in circulation when the progesterone comes from either an endogenous and exogenous source. **Animal Reproduction Science**, v. 37, p. 9-13, 1995.

Burke, C.R.; Macmilland, K.L.; Boland M.P. Oestradiol potentials a prolonged progesterone-induced suppression of LH release in ovariectomized cows. **Animal Reproduction Science**, v. 45, p.13-28, 1996.

Campanile, G.; Neglia, G.; Gasparrini, B. et. al. Embryonic mortality in buffaloes synchronized and mated by AI during the seasonal decline in reproductive function. **Theriogenology**, v. 63, p. 2334-2340, 2005.

Carvalho, N.A.T.; Soares, J.G.; Souza, D.C. et al. Different circulating progesterone concentrations during synchronization of ovulation protocol did not affect ovarian follicular and pregnancy responses in seasonal anestrous buffalo cows. **Theriogenology**, v. 81, p. 490–495, 2014.

De Rensis, F.; Ronci G.; Guarneri P, Xuan B. et al. 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**, v. 63, p. 1824–1831, 2005.

De Rensis, F.; López G. Protocols for synchronizing estrus and ovulation in buffalo (*Bubalus bubalis*): A review. **Theriogenology**, v. 67, n. 2, p. 209- 216, 2007.

Di Francesco, S; Neglia, G.; Vecchio, D. et al. Influence of season on corpus luteum structure and function and AI outcome in the Italian Mediterranean buffalo (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, v. 78, p.1839-1845, 2012.

Espitia, P.A.; Montes, V.D.; Prieto, M.E.; et al. Caracterización de parámetros productivos reproductivos de ganado bufalino, en finca de San Marcos Sucre, Colombia. **Revista Colombiana Ciencia Animal**, v. 6, n.1, p.145-158, 2014, Disponible en: <http://www.recia.edu.co> Accesado en: 13/06/2016.

Ghuman, S.P.; Honparkhe, M.; Singh, J. Use of progesterone-based protocol to synchronize ovulation and optimize subsequent fertility in subestrous buffalo. **Buffalo Bulletin**, v. 34, p.327-332, 2015.

Ireland, J.J.; Roche, J.F. Effect of progesterone on basal LH and episodic LH and FSH secretion in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 64, n.2, p.8 -12, 1982.

Irikura, C.R., Ferreria, I., Martin, L.U., Cimenes, E. Follicular dynamics in buffalo heifers (*Bubalus bubalis*) using GnRh-PGF2 α -GnRH protocol. **Buffalo Journal**, v. 19, n.3, p.323-327, 2003.

Kabir, S.; Rahman, S.; Rahman, N. Milk Progesterone ELISA to Monitor the Success of Artificial Insemination (AI) in Buffaloes. **International Journal of Bio Research**, v. 1, n.3, p.5-9, 2011.

Mialot, J.P.; Laumonier C.; Ponsert H. et al. Postpartum suboestrus in dairy cows: comparison of treatment with prostaglandin F2 α or GnRH + prostaglandin F2 α + GnRH. **Theriogenology**, v. 52, p.901-911, 1999.

Mirmahmoudi, R.; Souri, M.; Prakas, B. Comparison of endocrine changes, timing of ovulations, ovarian follicular growth and efficacy associated with Estradoublesynch and Heatsynch protocols in Murrah buffalo cows (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, v. 82, p. 1012-1020, 2014.

Neglia, G.; Gasparri, B.; Di Palo, R. et al. Comparison of pregnancy rates with two estrus synchronization protocols in Italian Mediterranean Buffalo cows. **Theriogenology**, v. 60, n. 1, p. 125-133, 2003.

R Core Team (2016). **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

Roy, K.S.; Praksah, B.S. Changes in endocrine profiles during ovasynch and ovsynch plus norprolac treatment in Murrah buffalo heifers at hot summer season. **Tropical Animal Health and Production**, v. 41, p. 677-687, 2009.

Sá Filho, O.G.; Meneghetti, M.; Peres, R.F. et al. Fixed time-artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows II. Strategies and factors affecting fertility. **Theriogenology**, v. 72, p. 210-218, 2009.

Saldarriaga, A.; Serna, D.F.; Londoño, B.; Ríos, D.S.; Gual, F. et al. Tasa de preñez utilizando los protocolos Ovsynch convencional y presincronización con prostaglandina en búfalos (*Bubalus bubalis*) en el trópico bajo colombiano. **Livestock Research for Rural Development**, v. 28, 2016. Disponible en: <http://www.lrrd.org/lrrd28/3/sald28034.html>/ Accesado en: 13/06/2016.

Vale, G.W. Reproducción en hembras bufalinas: inseminación artificial y reproducción asistida. **Tecnología en marcha**, v. 24, n.5, p.5-18, 2011. Disponible en: <http://dialnet.unirioja.es/servlet/oaiart?codigo=4835767> Accesado en: 13/06/2016.

Vecchio, D.; Neglia, G.; Gasparri, B. et al. Corpus luteum development and function and relationship to pregnancy during breeding season in the Mediterranean buffalo. **Theriogenology**, v. 77, p.1811-1815, 2012.

Virmani, V.; Malik, R.K.; Singh, P. Effect of gonadotropin releasing hormone (GnRH) preparations on induction of estrus and fertility in buffaloes under field conditions in Haryana. **Buffalo Bulletin**. v. 35, p. 93-100, 2016.

Zicarelli, L.; Esposito, L.; Campanile G. et al. Effects of using vasectomized bulls in artificial insemination practice on reproductive efficiency of Italian buffalo cow. **Animal Reproduction Science**, v. 47, p. 171- 180, 1997.

Como citar: Bolívar-Vergara, D.M; Londoño-Soto, B; Gallego-Arcila L.F; Gual-Restrepo, F.; Ríos-López, D.S.; Correa-Londoño, G.A.; Berdugo-Gutiérrez, J.A. Uso de la progesterona como método de la sincronización de celo durante la estación reproductiva favorable en búfalos de agua. **Revista Veterinaria y Zootecnia**, v. 10, n. 2, p. 01-14, 2016. DOI: 10.17151/vetzo.2016.10.2.1

Esta obra está bajo una [Licencia de Creative Commons Reconocimiento CC BY](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

