Vale, William G.
Reproducción en hembras bufalinas: inseminación artificial y reproducción asistida
Tecnología en Marcha, *Vol. 24, N.° 5, Revista Especial 2011, P. 5-18*

Reproducción en hembras bufalinas: inseminación artificial y reproducción asistida

William G. Vale[1]

Introducción

El uso de semen congelado de la especie bufalina en la Inseminación Artificial (IA) se realizó por primera vez por Bhattacharya y Srivastava (1955) en la India. Luego, continuaron varios estudios realizados en diferentes países, Roy et al. (1956), Basirov (1964), Allahverdiev (1969) y Sahana y Roy (1972). Sin embargo, la ausencia de un procesamiento tecnológico adecuado del esperma en lo que se refiere a los diluyentes, el de tiempo de equilibración, concentración de glicerol, métodos de congelación y la falta de un estándar adecuado llevó a resultados pobres y variables.

Toda la tecnología de procesamiento se basó en la misma metodología utilizada para el ganado bovino, faltando por lo tanto, el desarrollo de un diluyente especifico para bufalinos. Después del seminario sobre la reproducción y la inseminación artificial, promovido por la FAO y el Gobierno Sueco, en Karnal, India en 1979, varias mejoras se obtuvieron en los laboratorios de diferentes partes del mundo, lo cual culminó en el uso de diluyentes aptos para el semen de búfalo y la obtención de tasas nacimiento mayores al 65% (Sengupta y Sukhija, 1988).

En Brasil, la práctica de la IA en los bufalinos comenzó en los años 80 del pasado siglo, cuando Vale et al. (1984) al utilizar los diluyentes TES y TRIS realizaron con éxito la primera inseminación con semen congelado en la región amazónica, con el cual logró tasas de preñez superiores a 50%. Posteriormente, tasas superiores al 70% de nacimientos fueron obtenidas por los mismos investigadores, iniciando el uso del proceso ampliamente en todo Brasil y América Latina.

En otros países de América Latina, incluyendo Brasil se registran índices de nacimientos arriba del 80%, mientras que en China hay datos oficiales que reportan índices de fertilidad alrededor del 90% en búfalas inseminadas en municipios rurales. Por lo tanto, hoy en día la inseminación artificial en hatos de búfalos llega a la misma tasa de fertilidad que en el ganado bovino.

1. Prof. Dr. Universidad Federal del Oeste de Pará (UFOPA). Santarém, Pará, Brasil.

Técnica de inseminación artificial

La técnica de la inseminación artificial de la hembra bufalina es igual a la de la hembra bovina, o sea de tipo cervical profundo, con deposición del semen en el cuerpo del útero. A diferencia de los bovinos, la inseminación artificial en bubillas debe ser evitada, por el hecho que ellas presentan un cerviz pequeño, lo que puede provocar lesiones con sangrados y bajos índices de fertilidad.

Detección del celo

Para que el procedimiento de IA tenga éxito completo, es necesario que la hembra se encuentre en el momento adecuado para la inseminación. La detección y el reconocimiento de la hembra en el comienzo del celo es fundamental ello. En general se debe tener un lote de hembras aptas para la IA en un número no superior a 100 animales, que deberán estar claramente identificados y en condiciones de perfecta salud y nutrición.

Una práctica muy recomendada y de fundamental importancia es el empleo de un toro marcador el cual debe contar con la ayuda de la identificación visual por parte del personal involucrado en la IA. El marcador se puede colocar libre en el lote o durante los periodos en que se quiere ver si hay alguna hembra en celo.

Al igual que en otras especies de ganado vacuno, la búfala presenta su ciclo estral dividido en proestro, estro, metaestro y diestro, con una duración entre 18 a 32 días con un promedio de 23 días (Vale. 1988). Sin embargo, uno de los principales impedimentos para el éxito de la IA en esta especie es la manifestación del estro o calor, al no ser tan evidente como en la vaca taurina, lo que puede dar lugar a interpretaciones erróneas y por lo tanto una baja tasa de fertilidad.

En los hatos criados bajo condiciones intensivas o semi-intensivas y sometidos a un buen manejo es posible observar los signos de estro o calor que se caracterizan por la inflamación y descarga de moco por la vulva, enrojecimiento, hiperemia, micción y mugidos frecuentes, el incremento del movimiento de elevación de la cola y dejarse montar por el macho. A través del examen rectal es posible percibir un aumento significativo en el tono uterino, el cual es mucho más intenso en la bufaba que en las vacas taurina y cebuina (Vale. 1983).

El uso del toro marcador es indispensable para la detección del celo ya que contrariamente a las vacas taurinas y cebuinas, el fenómeno de comportamiento homosexual durante el estro, es decir, el hábito de las hembras de montarse unas a otras durante la fase de aceptación o receptividad, es inusual en los bufalinos: solo el 3,44% lo presenta. Este comportamiento disminuye la observación del celo y durante mucho tiempo, se creía que los búfalinos presentaban celos débiles y silencios (Baruselli, 1993).

Síntomas y duración del celo

Como ya se mencionó, la manifestación de los síntomas de celo en búfalas no es tan evidente como en la vaca, aun cuando es verificado que presentan un síntoma importancia: la monta con un búfalo marcador, presentándose en el 100% de los celos observados (Vale et al., 1987). Así, la mejor manera de detectar el celo en la búfala es la utilización de búfalos con arnés marcador bucal y tinta, asociado a la observación visual intensa (Vale, 1983). La frecuencia de aparición del celo en las búfalas esta relacionadota con la hora del día, como se observa en el cuadro 1.

En la literatura internacional, la mayoría de los autores enfatiza que el búfalo tiene hábitos sexuales nocturnos, con una predominancia de los síntomas clínicos de celo durante el periodo de las 17:00 a las 20:00 horas y de las 4:00 a las 7:00 de la mañana respectivamente (Hafez, 1954;

Luktuke y Ahuja, 1961, Gill et al, 1973, Valle 1984, 1987). Este hecho parece estar relacionado con la radiación solar y temperatura ambiente que tienen un efecto inhibitorio sobre la manifestación de celo. Es posible que exista también alguna acción de esos factores sobre la secreción de LH porque durante el día, especialmente en las producciones intensivas, estos animales buscan agua y por la noche pastorean, (Gangwar 1980, Valle, 1983).

Recientemente se desarrolló un sistema que funciona por medio de la radiotelemetría para estudiar el comportamiento reproductivo y para la detección del celo. Este sistema (HEATWATCHR; DDX, Incorporated, Boulder, Colorado, EE.UU.) propone sustituir la observación visual diaria y determinar la fase estral con eficiencia y precisión. El método consiste en la fijación en el dorso de la hembra de un sensor que emite ondas de radio cada vez que sufre una presión ejercida por la monta. Estas ondas son captadas por una antena y enviadas a un sistema informático. Así, el sistema puede suplir algunas de las necesidades prácticas, tales como no tener trabajar durante 24 horas y aumentar la precisión de la detección del celo. Nuestro equipo utilizó este sistema para estudiar el comportamiento del celo en las búfalas. Los resultados se muestran en el cuadro 2.

El sistema de radiotelemetría detectó 1,108 eventos de monta en 50 celos inducidos con prostaglandinas, el número promedio de montas por celo fue de 24,6 ± 18,2. Se observó un número de montas muy diferentes, detectando celos con solo 3 montas (n = 1), y estros que presentaban 80 montas (n = 1). La duración promedio de cada monta fue de 3,6 ± 0,7 segundos, con una duración total de las montas por celo de 94,2 ± 80,7 segundos. También se observó una variación de 8 a 373 segundos para la duración total de montas por celo. La duración individual de las montas fue de 2 a 5,5 segundos.

La distribución de las montas durante las 24 horas del día no presentó diferencias

Cuadro 1. Frecuencia de aparición de celo en búfalas criadas en la región Amazónica.

Celos observados	Número	Tasa (%)
Mañana (7:00-12:00 horas)	16	10.6
Tarde (12:00-17:00 horas)	08	5.3
Noche (17:00-07:00 horas)	126	84.0
Total	150	100.0

Cuadro 2. Detección del celo en hembras bufalinas por medio de la radiotelemetría (Porto Filho et al, 1999)

	Media
Duración del celo (h)	11,8 ± 5.6 (45)*
Inicio del celo-ovulación (h)	30,0 ± 4,9 (44)
Final celo –ovulación (h)	179,9 ± 4,1 (43)
Numero de montas por celo	24,6 ± 18,2 (45)
Duración de la monta (seg.)	3,6 ± 0,7 (45)
Duración total de montas (seg.)	94,2 ± 80,7 45

* ( ) Números entre paréntesis representan el número de celos observados.

significativas (P> 0,05). Fue observado un pequeño incremento entre las 04:00 y 08:00 y entre las 22:00 y las 02:00 horas (figura 1). Este resultado demuestra que los búfalos criados en el Centro sur de Brasil, presentan una distribución homogénea de celos durante las 24 horas. Este resultado puede deberse a la manifestación del celo durante la estación de otoño en esta región de Brasil al presentar temperaturas templadas diferentes a las verificadas en la región amazónica. La duración promedio del celo en vaquillas (buvillas) bufalinas estudiadas por radiotelemetría fue de 11,8 ± 5,6 h, menor a la observada en las búfalas paridas 14,7h Baruselli (1994). Fue observada una gran variación con respecto a la duración de los celos (1h a 25h).

La clasificación de los celos en cuanto a la intensidad y a la duración, demostró que la gran mayoría de ellos tuvieron una alta intensidad (75,6%) y una larga duración (80%), con más de la mitad (57,8%) mostrando ambas características. Estos resultados fueron superiores a los reportados por Dransfield et al. (1998), los cuales, en ganado lechero, encontraron porcentajes similares entre celos con alta intensidad y corta duración (34,3%), y celos con baja intensidad y larga duración (33,2%). Contrariamente a lo que se encontró en bufalinos, estos autores indicaron que la duración del celo de larga duración y alta intensidad ocurría con poca frecuencia en el ganado lechero (8,4%).

En el presente experimento, en el caso de que fuera utilizado el esquema tradicional detección de celo (mañana y tarde), solo el 8,9% de los celos no fueron detectados, lo que confirma los resultados obtenidos por Baruselli (1992), quién encontró que apenas el 3,5% de los celos no sería detectados en estos periodos. A pesar de que las búfalas tienen algunas particularidades en la manifestación del celo, la mayoría de las cuales tiene las características evidentes de esta fase, lo que demuestra que es posible detectar el celo en la especie bufalina adoptando un manejo adecuado.

En este experimento se recolectó sangre cada hora durante el periodo para estudiar los niveles circulantes de LH. Se verificó que el pico de LH ocurrió 45,6 ± 10,8 h después de la administración de la prostaglandina. El intervalo entre el pico de LH y la ovulación fue de 25,6 ± 2,6h (figura 2). El intervalo entre el pico de LH y la ovulación fue semejante al encontrado en bufalinos por Kanai y Shimizu (1986), quienes verificaron un intervalo de 27,7

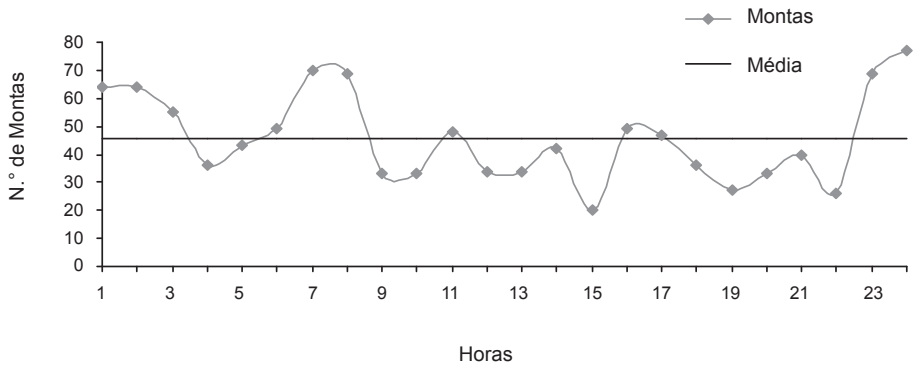


Figura 1. Distribución total de las montas/hora detectadas por radiotelemetría durante las 24 horas en bufalinos n=1180 montas. Porto-Filho (2000).

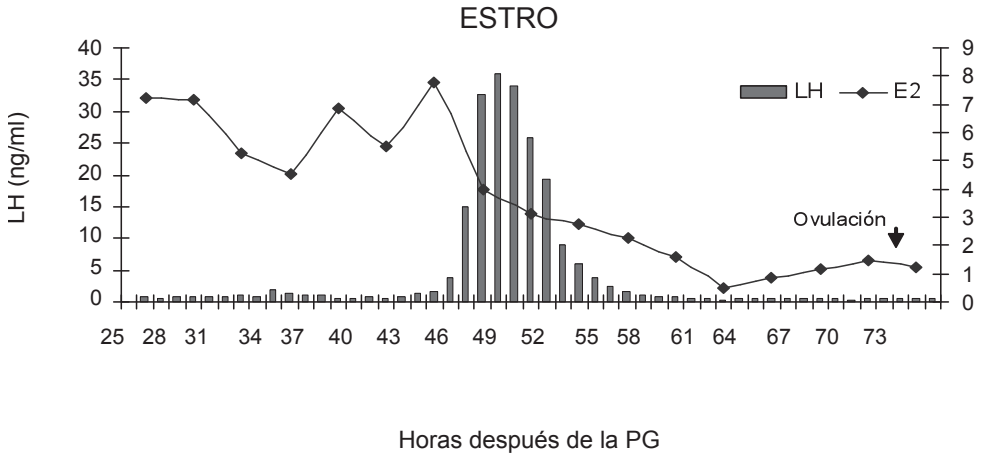


Figura 2. Niveles de LH y estradiol en una novilla bufalina con celo detectado por medio de radiotelemetría. (Porto-Filho 2000)

± 0,5 h para que ocurriera la ovulación después del pico de LH. El intervalo entre el inicio del celo y el pico de LH fue de 3,6 ± 3,4h. Este intervalo está en conformidad con los datas de la literatura, al utilizarse la observación visual para la detección de celo (Kanai y Shimizu, 1986; Avenell et al. 1995).

Se verificó también que el pico de estradiol fue de 8,9 ± 1,7 pg/ml, con una variación 7,2 pg/ml y 10,9 pg/ml. Este dato es próximo a la variación de 9 a 13 pg/ml observado por Seren y Parmeggiani (1997), y cercano al pico de 12,9 ±0,6 pg/ml observado por Avenell et al. (1995). Este resultado demuestra que los bufalinos tienen bajas concentraciones de estradiol en comparación con el ganado bovino durante la fase estral. Según Pandey (1979), durante el ciclo estral de la búfala, los niveles máximos de 17-beta estradiol coinciden con el rápido descenso en los niveles de P4, lo que sugiere un efecto antagónico de estas dos hormonas en las manifestaciones psicológicas y clínicas del celo.

Durante el ciclo estral es posible la palpación de los folículos y cuerpo lúteo, aunque es más difícil que en la vaca de carne, esto se debe a que el cuerpo lúteo de la búfala crece hacia la médula del ovario, es decir, hacia adentro. En el ganado bovino se observa lo contrario: el control de crecimiento es en sentido cortical. El cuerpo lúteo alcanza su máximo crecimiento entre 10º y 16º días del ciclo, llegando muchas veces a tomar casi dos tercios del tamaño total del ovario, con un diámetro de 1,5 cm. (Hafez. 1954; Luktuke y Rao. 1962; Vale et al. 1982; Valle. 1983).

Cuadro 3. Endocrinología del estro en los búfalos (Porto Filho (2000)

Intervalo entre la aplicación PGF / pico de LH	45,6±10,8 h
Intervalo entre el inicio del estro al pico de LH	3,6 ±3,4 h
Intervalo entre pico de LH / ovulación	25,6±2,6 h
Pico de LH	45,8±11,9 ng / ml
Pico de estradiol	8,9±1,7 pg / ml

Las ovulaciones dobles son inusuales, al observarse solamente un caso en material del matadero en una búfala no gestante. (Vale et al., 1982). En Italia, también hay informes de ovulaciones dobles durante la fase estrógenica del ciclo (Zicarelli, 1997).

Momento de la ovulación

La ovulación de la hembra bufalina ocurre después del celo, siendo este aspecto muy importante para definir el momento de la inseminación artificial. Los estudios indican que la búfalas ovulan en promedio unas 17 horas después del final de aceptación de la monta (Vale et al. Baruselli 1988 y 1992). Por lo tanto, se recomienda suspender la inseminación artificial cuando cesan todos los síntomas del celo calor, o sea, cuando la hembra no acepta más la montada.

Celo débil o silente

En la literatura internacional, corroborando los reportes en Brasil por Vale et al. (1984) y Baruselli et al. (1999), la incidencia del celo silente y anovulatorio es frecuente en las búfalas, especialmente en animales en déficit de alimentos o sometidos a situaciones de estrés térmico (Arora y Kaur, 1981, Vale et al., 1987), así como en hatos sometidos a manejo inadecuado, como la desnutrición. Pandey (1979) enfatizó que el problema del celo débil o silente en esta especie, parece estar relacionada con la acción sinérgica entre la progesterona y el estradiol antes de la aparición del pico de LH.

Inseminación artificial con detección del celo

Por los datos sobre la duración del celo y el momento de la ovulación en la búfala, se puede proponer un cuadro para esquematizar un sistema de inseminación artificial. Como existe una gran variación en la duración del celo en las búfalas, se recomienda inseminar en el momento más próximo, posible del final de manifestaciones del celo cuando las hembras ya no aceptan más la monta. En un estudio realizado durante un programa de inseminación en búfalas en el Valle de Ribera, se observaron duraciones variables en las manifestaciones del celo (6-108 horas). Sin embargo, la tasa de gestación se mantuvo relativamente constante y no sufrió la interferencia por la duración de celo (Baruselli, 1998).

La duración del celo fue estimada calculando el intervalo de tiempo entre la primera aceptación a la monta y su rechazo. Las búfalas que presentaron celo de 12 horas (62,2%) fueron inseminadas conforme la propuesta por Trimberger para bovinos, en la cual las vacas observadas en celo por la mañana se inseminan en la tarde del mismo día y vacas observadas en celo por la tarde deben ser inseminadas en la mañana siguiente, bien temprano. Sin embargo, las búfalas que presentaron celo con una duración diferente (38,8%) son inseminadas cuando no acepten más la monta. Este tipo de manejo tiende a proporcionar un horario de inseminación al final de la manifestación del celo, cuando la posibilidad de la concepción es más elevada. De esta forma, se pretende eliminar la gran variación observada en la duración del celo en las búfalas. Se recomienda hacer una observación del celo al mediodía hasta aproximadamente el momento de la inseminación al final del celo y mejorar la eficiencia de la detección.

1. Las búfalas en celo durante el periodo de observación (mañana o tarde) que no aceptan más la monta en el periodo siguiente deben ser inseminadas inmediatamente. Estos animales son inseminados 12 horas después de la detección de celo. Esta situación es encontrada en aproximadamente 60% de las inseminaciones de las búfalas.
2. Las búfalas en celo durante el periodo de observación (mañana o tarde)

y continúen en celo en el periodo siguiente no debe ser inseminadas y deben ser observadas en el siguiente periodo de celo. Si no aceptan más la monta, deben ser inseminadas 24 horas después de la detección de celo situación el 25% de las inseminaciones de las búfalas.

3. En el caso de celos de mayor duración (más de 24 horas) hay que inseminar cuando las hembras no aceptan la monta. Esta situación se encuentra en aproximadamente el 5% de las inseminaciones de las búfalas.

En los cuadros 4 y 5 se presentan los resultados del programa de inseminación artificial en bufalinos en el Valle de Ribeira, Estado de San Pablo. Entre 1993 y 1997 participaron 12 fincas, para un total de 1,551 inseminaciones. La tasa de concepción de la primera inseminación fue del 51,8% en promedio, de la segunda de 57,9% y la tercera de 56,8% (cuadro 4). El número promedio de dosis por concepción fue de 1,86 (cuadro 5).

De las 1125 búfalas inseminadas, 832 (74,0%) quedaron preñadas con un máximo de tres servicios. Este índice varió de 53,3 a 82,2% entre las fincas o haciendas ganaderas.

Existe una gran variación de los resultados según las propiedades (1,67 a 2,50 dosis por concepción, 60,0 a 40,0% en la tasa de concepción y de 53,3 a 82,2% tasa de preñez). Estas variaciones se deben, principalmente, a diferencias en el manejo general de las fincas, en la calidad del semen y en la habilidad del inseminador. Es importante destacar que en esta investigación, cuando fueron detectados problemas en las fincas, los datos no fueron eliminados y constan en los cuadros.

De acuerdo con el cuadro 6, es posible observar que los índices de fertilidad fueron más altos en función de las mejoras del manejo reproductivo, en especial la alimentación. No tiene sentido cumplir con todos los requisitos mencionados anteriormente si la calidad del semen utilizado no está dentro de los estándares recomendados. Los donantes de semen deben estar libres de enfermedades infectocontagiosas que puedan ser transmitidas a través del semen y causar infecciones uterinas, así como una

Cuadro 4. Tasa de concepción de búfalas sometidas a inseminación artificial según las propiedades y orden de inseminación. Vale do Ribeira, SP, 1993 a 1997.

Fincas	Nº de IA (1ª)	Nº de Preñeces	Tasa de Concep. (%)	Nº de IA (2ª)	Nº de Preñeces	Tasa de Concep. (%)	Nº de IA (3ª)	Nº de Preñeces	Tasa de Concep. (%)
A	171	93	54,4	79	47	59,1	19	11	57,9
B	11	5	45,4	4	4	100,0	-	-	-
C	64	32	50,0	18	13	72,2	3	3	100,0
D	28	15	53,6	1	1	100,0	-	-	-
E	290	150	51,7	93	56	60,2	10	9	90,0
F	42	22	52,3	15	11	73,3	-	-	-
G	179	92	51,4	48	30	62,5	1	1	100,0
H	79	44	55,7	31	12	38,7	2	1	50,0
I	76	41	53,9	11	6	54,5	1	0	0,00
J	62	32	51,6	18	12	66,7	-	-	-
L	15	6	40,0	-	-	-	-	-	-
M	108	51	47,2	53	23	43,4	24	9	37,5
Total	1125	583	51,8	371	215	57,9	60	34	56,8

Fuente: Baruselli, 1998.

Cuadro 5. Tasa de concepción (1ª, 2ª y 3ª IA), de búfalas sometidas a inseminación artificial (IA) según las propiedades. Vale do Ribeira, SP. de 1993 a 1997

Fincas	Número de I. A.	Número de gestantes	Tasa de concepción (%)	Dosis/ concepción
A	264	151	57,2	1,75
B	15	9	60,0	1,67
C	85	48	56,5	1,89
D	29	16	55,2	1,81
E	393	215	54,7	1,83
F	57	33	57,9	1,73
G	228	123	53,9	1,85
H	112	57	50,9	1,96
I	88	47	53,4	1,87
J	80	44	55,0	1,82
L	15	6	40,0	2,50
M	185	83	44,7	2,23
Total	1551	832	53,6	1,86

Fuente: Baruselli. 1998.

Cuadro 6. Fertilidad en un programa de inseminación artificial en un hato bufalino criado en la región de Amazonas, Estado de Pará, usando celos naturales y con semen congelado con el diluyente TES/TRIS entre el periodo 1986-1995.

Año	N° de hembras	Nº IA realizadas				Dosis por concepción	Fertilidad	
		1.	2.	3.	Total		n.	%
1986-87	42	42	27	10	79	1,88	25	59,0
1987-88	64	64	47	37	148	2,31	29	43,3
1988-89	70	70	21	6	97	1,38	47	67,1
1990-91	95	95	44	15	154	2,44	64	67,3
1991-92	105	105	58	21	184	1,44	73	69,3
1992-93	98	98	24	11	133	1,92	69	70,4
1993-94	94	94	35	07	136	1,97	69	73,4
1994-95	156	156	78	24	258	2,03	127	81,4
Total	724	724	334	131	1189	1,92	503	64,4

disminución de la tasa de concepción. La calidad del semen, después de la descongelación, es fundamental para obtener buenos resultados. Con la tecnología existente actualmente es posible congelar semen de búfalo con resultados satisfactorios de fertilidad. Antes de iniciar un programa de inseminación artificial el semen debe ser evaluado y solamente los lotes aprobados deben ser utilizados, para evitar trastornos futuros.

Inseminación artificial con inducción del celo

Regulación artificial del ciclo estral

La inseminación artificial (IA) en bufalinos se consagró mundialmente y ha demostrado viabilidad técnica y económica para acelerar el progreso genético y el rendimiento económico de la especie. Sin embargo, para obtener altos índices reproductivos con el uso

de la IA es necesario comprender las limitaciones del uso de esta biotecnología. Existen informes que indican la baja tasa de servicio debido a problemas de eficiencia en la detección de celo, como uno de los principales impedimentos de la expansión de la IA. Esta dificultad es mayor en los hatos de bufalinos, debido a las particularidades del comportamiento reproductivo (baja incidencia de comportamiento homosexual).

De esta forma, los programas que sincronicen el celo y la ovulación para emplear la inseminación artificial a tiempo fijo, sin necesidad de la detección de celo, contribuyen en gran medida al aumento del uso de la aplicación de esta biotecnología. Estos protocolos permiten sincronizar la fase luteal, folicular y el momento de la ovulación, para realizar la IA a tiempo.

Sincronización del celo con prostaglandinas

Las prostaglandinas y sus análogos fueron ampliamente empleados con la finalidad de sincronizar las manifestaciones de celo, con el objetivo de la utilización de las biotecnologías. La prostaglandina causa la regresión del cuerpo lúteo durante el diestro del ciclo estral, en el cual el cuerpo luteo es lisado, con el consiguiente descenso de los niveles de progesterona y las manifestaciones de celo seguidas de la ovulación después de 2-5 días de aplicación (Nebel y Jobst, 1998). La capacidad de respuesta se inicia al quinto día del ciclo estral, aumenta hasta el día doce y permanece en fase de crecimiento hasta el día diecisiete cuando se inicia la regresión espontánea causada por la liberación de prostaglandinas endógenas (Odde, 1990, y Larios Ball, 1992).

En el momento que ocurre la regresión del cuerpo lúteo el folículo dominante presente, que no inició la fase de regresión y de atresia, será el folículo ovulatorio (Kastelic et al. 1990). Se encontró que cuando el tratamiento con prostaglandina es realizado en el 5° día del ciclo estral, en el momento que el folículo dominante de la primera onda esta tasa de crecimiento, el intervalo entre la aplicación y la ovulación es de tres días. En el tratamiento que se inicia en el día doce del ciclo estral, el folículo dominante de la segunda onda se encuentra en el inicio de la fase de crecimiento y la ovulación se ocurrirá cuatro días y medio después de la aplicación.

En hembras bovinas tratadas en el octavo día del ciclo estral, ocurre frecuentemente la ovulación del folículo dominante de la primera onda folicular cuatro días después de la aplicación de la prostaglandina, sin embargo, ocasionalmente puede ocurrir la ovulación del folículo dominante de la segunda onda, seis días después del tratamiento.

En bufalinos también fue detectada la variación en la duración del estro (36 a 96 horas) después de la aplicación de la prostaglandina (Baruselli, 1994). Con el objetivo de estudiar detalladamente las variaciones del celo y de la ovulación, después de la aplicación de prostaglandinas en esta especie, nuestro equipo realizó recientemente un experimento con monitoreo de la dinámica folicular de los animales tratados en diferentes fases del ciclo estral (Porto Filho et al., 1999). Los animales fueron divididos en dos grupos: el grupo 1 recibió la prostaglandina antes del día 10 y el grupo 2 recibió la prostaglandina después del día 10 del ciclo estral.

Las búfalas fueron colocadas en la presencia de dos hembras androgenizadas para ayudar la detección del celo, realizado por medio del sistema de radiotelemetría (HeatWatch). Las ovulaciones fueron seguidas por medio de ultrasonografía, de 6 a 6 horas después del inicio del calor. Los resultados se muestran en el cuadro 7. Se verificó que la fase del ciclo estral, en la cual fue suministrada la prostaglandina interfirió en el intervalo entre el tratamiento

Cuadro 7. Intervalo entre la aplicación de prostaglandina y el inicio del celo y la ovulación, de acuerdo con la fase del ciclo (<D-10 y > D-10) en el cual fue realizado el tratamiento. São Paulo, 1999.

Fase del ciclo estral	Número de tratamientos	PG- inicio del celo (h)	PG-ovulación (h)
< día 10	31	40,4 ± 2,1 [a]	70,0 ± 11,3[a]
> día 10	14	56,3 ± 3,2 [b]	87,2 ± 12,9[b]

Fuente: Porto-Fliho et al., 1999. (a≠b; p< 0,01)

y el inicio de las manifestaciones del celo y la ovulación (P <0,01). Las búfalas tratadas antes del día diez presentaron menor intervalo de tiempo para manifestar el celo y la ovulación, comparadas con animales tratados después de diez días del ciclo estral. Los resultados demuestran que en este grupo ocurrió, probablemente, una ovulación del folículo dominante de la primera onda presente en el momento de aplicación de la prostaglandina.

Estos resultados demuestran que el éxito de la aplicación de prostaglandina depende de la presencia del cuerpo lúteo funcional en la fase diestro del ciclo estral. Obsérvese también que el estro y la ovulación no son precisamente sincronizados, debido a la variación de la población folicular en el momento de la regresión del cuerpo lúteo; algunos animales presentan demora en la maduración del folículo dominante ovulatorio. Debido a esta variación, es necesario detectar los signos generales del celo, después del tratamiento con prostaglandinas para identificar el momento apropiado para llevar a cabo la inseminación artificial. Así, los protocolos que pretendan utilizar la inseminación a tiempo fijo, solo con el uso de prostaglandinas, no presentaron buenos resultados.

Sincronización con GnRH/PGF2/ GnRH para la IA a tiempo fijo

La inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) tiene como objetivo la sincronización de la ovulación, permitiendo que la inseminación artificial sea programada para un día y hora específica (tiempo fijo), sin la necesidad de la detección de celo.

Esta técnica fue desarrollada en función del hecho de que los programas de IA presentan baja tasa de servicios debido principalmente a las dificultades en la detección de celo al ser que uno de los principales impedimentos para la expansión de la IA. Este compromiso es aún mayor en los hatos bufalinos, debido a las particularidades del comportamiento reproductivo como fue descrito anteriormente. De esta forma, los programas que pretenden emplear la inseminación artificial a tiempo fijo (IATF), sin la necesidad de detectar de celo, colaboran de sobremanera para aumentar el uso de esta biotecnología.

Estos protocolos recomiendan la sincronización de la onda de crecimiento folicular, la fase luteínica y su regresión, hasta el momento de la ovulación, permitiendo el uso de la IA en el día y la hora predeterminados. Así, se realizaron experimentos para determinar la eficiencia del método de sincronización de la ovulación para la inseminación artificial de tiempo fijo (Ovsynch) en bufalinos durante el periodo posparto (media 60 días), cuya metodología básica consiste en la aplicación de 10 µg de GnRH (acetato de buserelina) durante el periodo posparto, al aplicar prostaglandinas (PGF2α) 7 días más tarde. Dos días después de la aplicación de la PGF2α los animales recibieron 10µg de GnRH y serán inseminadas 16 horas más tarde (Baruselli et al. 1999 y 2000).

El primer estudio tuvo como objetivo evaluar la dinámica folicular de 33 búfalas tratadas con este protocolo para verificar la respuesta de la especie a esta secuencia de tratamientos (Baruselli et al. 1999). Por medio de ultrasonido se observó que el 60,6% de los animales ovularon después de la primera inyección de GnRH. Nótese que las búfalas que ovularon presentaban un folículo más desarrollado al momento del tratamiento (0,95± 0,17a vs. 0,67 ± 0,24 b cm; P<0,01).

El intervalo entre la primera inyección de GnRH y la ovulación fue de 33,0 ± 8,3 h (n = 20) y el intervalo entre la segunda inyección de GnRH y la ovulación fue de 32,0 ± 5,7 h, con la mayoría de las ovulaciones (92%) que ocurrieron en un intervalo de apenas doce horas. Se observó que el 100% de los animales presentaron una concentración plasmática de P4, por debajo de 1 ng/ml 48 horas después de la aplicación de PGF2α, demostrando así un efecto eficaz luteolítico.

Los datos son indicativos de que los bufalinos responden satisfactoriamente al tratamiento con GnRH/ PGF2α / GnRH, al presentar sincronización del crecimiento folicular y la ovulación, lo cual permite el uso de la inseminación artificial a tiempo fijo.

En la segunda fase del estudio (Baruselli et al. 2000) fueron inseminadas artificialmente a tiempo fijo 1,053 búfalas lecheras, sincronizadas con el protocolo Ovsynch. En esta fase, se evaluó el efecto de la condición corporal al inicio del estudio (escala de 1 a 5), el número de partos, el periodo posparto que se inició en el tratamiento, numero de inseminaciones, y el periodo de inseminación (estación reproductiva favorable de marzo a agosto n = 967; época reproductiva desfavorable de septiembre a diciembre n = 86), sobre la tasa de concepción. Las 967 búfalas tratadas durante la estación reproductiva favorable presentaron una tasa de concepción promedio de 48,8%. Se observó la influencia (P <0,05) de la condición corporal sobre la tasa concepción (≤3,0 =31,4%a, n = 223; 3,5 = 52,9% b, n = 546; ≥ 4 = 57,1%b, n = 198).

Este resultado sugiere que las búfalas deben presentar una condición corporal ≥3,5 para obtener una buena eficiencia de la inseminación artificial a tiempo fijo. El número de partos también influyó sobre los resultados (P <0,05). Las hembras primíparas presentaron menor eficiencia que las pluríparas (35,5%; n=138 vs. 51,0%; n=829). Por lo tanto, se debe sincronizar preferiblemente las búfalas multíparas para mejorar la eficacia de este tratamiento.

El periodo post-parto en el cual se inició el tratamiento y el número de inseminaciones no afectaron estadísticamente los resultados (P> 0,05). Estos datos muestran que la sincronización se puede iniciar entre los 40 y 60 días posparto y que las hembras que no quedan preñadas en la primera inseminación pueden ser tratadas nuevamente. De esta manera, se puede alcanzar una tasa de preñez de 75% aproximadamente, con dos inseminaciones sincronizadas en un periodo de servicio inferior a cien días.

El grupo de animales inseminados fuera de la estación reproductiva (primavera) presentó una menor tasa de concepción (6,9%, n = 86) en relación con el grupo inseminado durante la estación reproductiva favorable (otoño / invierno, el 48,8%; n = 967; P <0,05). Este dato demuestra que el protocolo que emplea la GnRH / $PGF_{2\alpha}$ / GnRH (Ovsynch) para la inseminación a tiempo fijo en bufalinos no presenta resultados satisfactorios fuera de la estación reproductiva favorable.

Debido a la baja eficiencia del protocolo Ovsynch para IATF fuera de la estación reproductiva y la marcada estacionalidad de los partos que dificulta la producción de leche durante el año, se realizaron estudios con la finalidad de sincronizar

el crecimiento folicular y la ovulación con diferentes protocolos. Para ello, se utilizaron tratamientos que asocian dispositivos intravaginales o implantes auriculares conteniendo progesterona y progestágenos con $PGF_{2\alpha}$ y estrógenos con la finalidad de hacer viable la IATF en búfalas durante todo el año.

Así, fue estudiada la dinámica folicular durante los tratamientos con dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR®) y con implantes auriculares de Norgestomet (CRESTAR®) en el periodo reproductivo favorable (otoño e invierno) y desfavorable (primavera y verano; Bartolomé. 2003). Se encontró una tasa de ovulación baja de 40% para las búfalas sincronizadas CON CIDR® y el 20% de las búfalas sincronizadas con CRESTAR®.

En ese mismo experimento, el intervalo transcurrido para el inicio de una nueva onda de crecimiento folicular fue inferior en las búfalas tratadas con CIDR® (3,5 ± 0,4 días) que las tratadas con CRESTAR® (6,3 ± 0,2 días), probablemente a la mayor permanencia en la circulación de valerato de estradiol, aplicado juntamente con la colocación del implante (día cero) en los animales sincronizados con CRESTAR®. El intervalo entre la extracción del dispositivo y la ovulación fue de 62,0 ± 5,6 horas para el grupo CIDR® y 64,0 ± 0,0 horas para el grupo CRESTAR®.

En otra investigación, llevada a cabo también en la estación reproductiva desfavorable (Moura, 2003), se verificó que las búfalas que recibieron 1,0 mg de Benzoato de estradiol (BE) asociado al momento de la inserción de CIDR no ovularon al final del tratamiento y aquellas que recibieron 2,5 mg y 5,0 mg de BE presentaron bajas tasas de ovulación (20%).

Cuando las búfalas fueron inseminadas a tiempo fijo después de la administración de 0,5 mg (G1) y 1,0 mg (G2) de BE, 24 horas después de retirado el CIDR , las tasas de preñez fueron del 6,7% (G1; 2/30) y de 10,0% (G2; 3/30). El grupo de control (Ovsynch) tampoco presentó resultados satisfactorios (10,3%; 03/29).

Los resultados obtenidos permiten concluir que el uso de esos protocolos no muestra resultados satisfactorios en la tasa de ovulación y concepción de búfalas sincronizadas e inseminadas a tiempo fijo, durante la estación de cría desfavorable.

Con el objetivo de mejorar la respuesta a los tratamientos con progesterona, se llevó a cabo otro experimento administrando Gonadotropina Corionica Equina (eCG) en el momento de la extracción del dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR), en un intento de dar soporte gonadotrófico al folículo dominante presente al final del tratamiento (acción FSH y LH de la eCG) y aumentar las tasas de crecimiento folicular y de la ovulación.

Para sincronizar la ovulación se optó por la aplicación de Gonadotropina Corionica humana (hCG), dos días después de la administración de eCG (Baruselli et al. 2002), los animales se inseminaron 16 horas después. Con ese protocolo, se observaron tasas de concepción satisfactorias (55%) a la IATF, aún durante la testación de reproducción desfavorable.

En otra investigación, fue estudiada la dinámica folicular durante los tratamientos con eCG asociada a dispositivos intravaginales con progesterona (Porto Filho, 2004). La tasa de ovulación fue mayor en el grupo tratado con eCG (G2, 70,0%) que aquellos que no la recibieron (G1; 44,4%). En bovinos, se observaron resultados similares con respecto a la asociación o no de eCG a los dispositivos intravaginales o implantes subcutáneos de liberación de Progesterona ($P_{4)}$.

Por su parte, Cutaia et al. (2003) encontraron diferencias significativas con la utilización de eCG sobre la tasa de preñez de las vacas que se encontraban en anestro: 30,6% versus 54,2%. (Baruselli

et al. 2004) verificaron diferencias significativas en las tasas de concepción, cuando compararon el uso (51,9%) o no (38,8%) de eCG en el vacas de carne, siendo este efecto más evidente en las vacas en anestro. Por lo tanto, los resultados presentados sugieren que el tratamiento con eCG en el momento de la extracción de los dispositivos de P_4 aumenta las tasas de ovulación y preñez en hembras bufalinas en la estación desfavorable. De esta forma, se recomienda la utilización del protocolo Ovsynch durante la estación reproductiva favorable (alta tasa de ciclicidad y reducción de costo; figura 1) y el protocolo con los dispositivos con progesterona asociados con eCG durante la época desfavorable (baja ciclicidad, figura 2).

Conclusiones

Los conocimientos existentes sobre el manejo reproductivo y el uso de biotecnologías de la reproducción en los bufalinos permiten a los técnicos y criadores evaluar e indicar cuáles de los procedimientos pueden ser empleados con éxito. Al disponer de esos conocimientos, el sector productivo tiene las herramientas idóneas para incrementar la aplicación de la inseminación artificial a tiempo fijo durante todo el año con el objetivo de una mejora genética y de la productividad de los hatos bufalinos.

Bibliografía

Avenell, J.A; Saepudin, Y; Fletcher, I.C. (1995) *Concentrations of LH, oestradiol-17β and progesterone in the peripheral plasma of swamp buffalo cows (Bubalus bubalis) around the time of oestrus*. Journal of Reproduction and Fertility. 74(2):419-424.

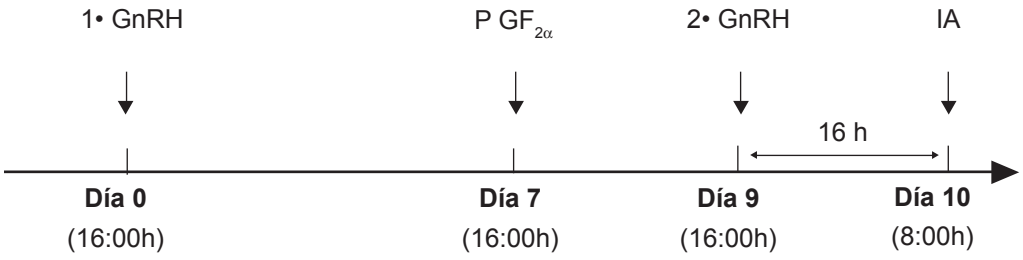


Figura 1. Protocolo de inseminación artificial a tiempo fijo con sincronización de la ovulación en bufalinos durante la estación reproductiva favorable.

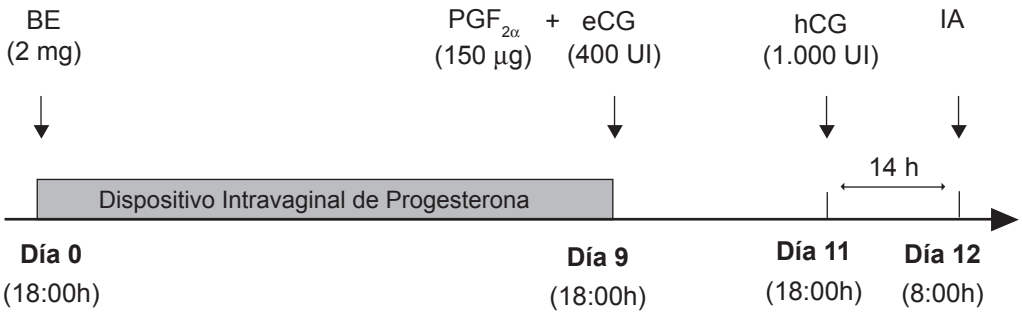


Figura 2. Protocolo de inseminación a tiempo fijo con sincronización de la ovulación en bufalinos durante la estación reproductiva desfavorable.

Baruselli, P.S. (1993) *Manejo reproductivo de bubalinos*. SAA/Cordenadoria da Pesquisa Agropecuária/Instituto de Zootecnia/EEZ-Vale do Ribeira, 46p.

Baruselli, P.S. (1998) *Novos avanços na reprodução bubalina*. *In*: Baruselli, P.S. (ed). A bubalinocultura brasileira: situação atual e perspectivas. ABCB: São Paulo. p.77-138.

Baruselli, P.S; Madureira, E.H; Visintin, J.A; Barnabe, V.H; Barnabe, R.C; Amaral, R. (1999) *Inseminação artificial em tempo fixo com sincronização da ovulação em bubalinos*. Revista Brasileira de Reprodução Animal. 23:360-362.

Baruselli, P.S; Madureira, E.H; Barnebe, V.H; Barnebe, R.C; Berber, R.C.A; Amaral, R. 2000. Timed insemination using synchronization of ovulation in buffalo. Proc 14th International Congress on Animal Reproduction, Estocolmo. 2:14-18.

Baruselli, P.S; Carvalho, N.A.T; Nichi, M; Reichert, R.H. (2003) *Reduction of hCG dosage in a protocol for synchronization of ovulation for timed artificial insemination during the off breeding season in buffalo*. Proc. 2nd Congresso Nazionale Sull'Allevamento Del Buffalo, Roma. 1:261-264.

Baruselli, P.S; Reis, E.L; Marques, M.O; Nasser, L.F; Bó, G.A. 2004. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anaestrous beef cattle in tropical climates. Animal Reproduction Science. 82-83:479-486.

Cutaia, L; Veneranda, G; Tribulo, R; Baruselli, P.S; Bó, G.A. (2003) *Programas de inseminación artificial a tiempo fijo en rodeos de cría: factores que lo afectan y resultados productivos*. *In*: V Simposio Internacional de Reproducción, 2003, Cordoba. Proccedings… p. 119-132.

Dransfield, M.B.G; Nebel, R.L; Pearson, R.E; Warnick, L.D. (1998) *Timing of insemination for dairy cows identified in estrus by radiotelemetric estrus detection system*. Journal of Dairy Science. 81(7):1874-1882.

Kanal, Y; Shimizu, H. (1986) *Changes in plasma concentrations of luteinizing hormone, progesterone and oestradiol-17β during the periovulatory period in cyclic swamp buffaloes*. Animal Reproduction Science. 11(1):17-24.

Kastelic, J.P; Knopf, L; Ginther, O.J. (1990) *Effect of day postanglandin F2α treatment on selection and development of the ovulatory follicle in heifers*. Animal Reproduction Science. 23: 169-180.

Larison, L.L; Ball, P.J.H. (1992) *Regulation of estrus cycle in dairy cattle: a review*. Theriogenology. 38:255-267.

Moura, A.J.D.R. (2003) *Sincronização da ovulação com dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR-B®) associado a estrógeno e prostaglandina F2α em búfalas (Bubalus bubalis) tratadas em estações reprodutivas distintas*. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2003, 129p.

Nebel, R.L; Jobst, S.M. (1998) *Evaluation of a systematic breeding programs for lactating dairy cows: a review*. Journal of Dairy Science. 81:1169-1174.

Odde, K.G. (1990) *A review of sinchronization of estrus in postpartum cattle*. Journal of Animal Science. 68:817-830.

Odde, K.G. (1990) *A review of synchronization of estrus in postpartum cattle*. Journal of Animal Science, v.68, p.817-830, 1990.

Porto-Filho, R.M; Baruselli, P.S; Madureira, E.H; Mucciolo, R.G. (1999) *Detecção de cio em búfalas através do sistema de radiotelemetria*. Rev. Bras. Reprod. Anim. 23:356-358.

Porto-Filho, R.M. (2000) *Emprego da radiotelemetria na detecção do estro em fêmeas bubalinas: luteólise durante duas fases do ciclo estral, ultra-sonografia da ovulação e perfis hormonais*. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. São Paulo. 112p.

Porto-Filho R.M. (2004) *Sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo (IATF) durante estação reprodutiva desfavorável em fêmeas bubalinas*. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. São Paulo. 100p.

Seren, E; Parmeggiani, A. (1997) *Oestrous cycle inn italian buffalo*. *Bubalus bubalis* suplement. 4:21-28.

Vale, W.G. (1988) *Bubalinos: fisiologia e patologia da reprodução*. Campinas, Fundação Cargil. 86p.

Zicarelli, L. (1997) *News on buffalo cow reproduction*. Proc. 5th World Buffalo Congress, Caserta1:124-141.