

Clinical characteristics of induced estrus with hormones, and its relation with gestation percentage in nulliparous female water buffaloes

Características clínicas del estro inducido con hormonas y su relación con el porcentaje de gestación en búfalas de río nulíparas

C. Gallego¹, Eunice Oba⁴, J.C. Alonso², L.M. Fraga¹, R. García López¹, Mildred Méndez¹, and E. Padrón³

¹Instituto de Ciencia Animal, Apartado Postal 24, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba

²Universidad Agraria de La Habana "Fructuoso Rodríguez Pérez", Carretera de Tapaste y Autopista Nacional, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba

³Empresa Genética Pecuaria "El Cangre", Mayabeque, Cuba

⁴Universidad Estatal Paulista, Campo de Botucatu, San Paulo, Brasil
email:cgallego@ica.co.cu

An amount of 82 nulliparous female water buffaloes were studied to compare the signs of induced estrus with hormone protocols (P). Treatments PI (n=29), PII (n=28) and PIII (n=25) received 2.0 mg of estradiol benzoate and intravaginal device of progesterone for nine days. After removing the device, 0.5 mg of prostaglandin F_{2α}, 500 IU of equine chorionic gonadotropin and 0.5 mg of estradiol cypionate (PI and PII) were applied. In PIII, cypionate was replaced by 1000 IU of human chorionic gonadotropin after 48 h. Inseminations were carried out between 48-50 (PI), 56-58 (PII) and 14-16 h (PIII) after the last hormone. A generalized linear mixed model was applied, which considered the protocol as fixed effect, and the animal nested in the protocol as random effect. Tukey-Kramer test was applied for the multiple comparisons. The animals of PI showed higher swollen vulva (77.5 %) and higher pink coloration of the vaginal vestibule (75.2 %) than those from PII (16.7 and 16.26 %) and PIII (15.4 and 13.26%). Female buffaloes of PI (61.6 %) and PII (81.2 %) showed higher secretions than those of PIII (22.8 %). Uterine excitement, tone cervical passage and insemination time showed no differences among protocols. Cervical passage showed a positive and high correlation with the gestation percentage. This last was negatively related to excitement and time during the insemination. It can be concluded that differences in the expression of signs had no influence on the percentage of gestation among protocols.

Key words: female buffaloes, clinical signs, estrus, hormonal protocol

Introduction

The use of artificial insemination (AI) in genetic programs of Bufalipso in Cuba is not in the same proportion than bovine cattle, which leads to a delay in the genetic process and the desired productive levels (Fraga *et al.* 2013). The main causes that limit the extensive use of AI in female buffaloes is the heat detection and the most appropriate moment to carry it out, because the clinical signs of estrus are less evident (Rossi *et al.* 2014).

Several therapies of estrus synchronization are developed for the increase of fertility (Mohan and Prakash 2010). The most practiced ones are those that synchronize the wave of follicular development, estrus and ovulation, so animals can be inseminated at fixed

Se estudiaron 82 búfalas nulíparas para comparar los signos del estro inducido con tres protocolos hormonales (P). Los P I (n=29), P II (n=28) y P III (n=25) recibieron 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 F_{2α}, 500 UI de gonadotropina coriónica equina y 0.5 mg de cipionato de estradiol (PI y PII). En el PIII se sustituyó el cipionato por 1000 UI de gonadotropina coriónica humana 48 h posteriores. Las inseminaciones se realizaron entre 48-50 (PI), 56-58 (PII) y 14-16 h (PIII) después de la última hormona. Se aplicó un modelo lineal generalizado mixto, que consideró al protocolo como efecto fijo y como aleatorio, al animal anidado en el protocolo. Se aplicó dódica de Tukey-Kramer para la comparación múltiple de medias. Los animales del PI mostraron mayor edema vulvar (77.5 %) y coloración rosada del vestíbulo vaginal (75.2 %) que los del PII (16.7 y 16.26 %) y PIII (15.4 y 13.26%). Las búfalas de los PI (61.6 %) y PII (81.2 %) mostraron mayores secreciones que en el PIII (22.8 %). La turgencia uterina, excitamento, permeabilidad cervical y tiempo de inseminación no mostraron diferencias entre los protocolos. La permeabilidad cervical mostró correlación positiva y alta con el porcentaje de gestación. Este último se relacionó negativamente con el excitamento y tiempo durante la inseminación. Se concluye que las diferencias en la expresión de los signos no influyeron en el porcentaje de gestación entre los protocolos.

Palabras clave: búfalas, signos clínicos, estro, protocolo hormonal

Introducción

El uso de la inseminación artificial (IA) en los programas genéticos del Bufalipso en Cuba no tiene lugar con la misma proporción que en el ganado vacuno, lo que conlleva al atraso en el progreso genético y en los niveles productivos deseados (Fraga *et al.* 2013). Las causas fundamentales que limitan el uso extensivo de la IA en la búfala es la detección del celo y el momento más adecuado para realizarla, debido a que los signos clínicos del estro son poco evidentes (Rossi *et al.* 2014).

Varias terapias de sincronización del estro se desarrollan para incrementar la fertilidad (Mohan y Prakash 2010). Las que más se practican son las que sincronizan la onda de desarrollo folicular, el estro y la ovulación, por lo que se puede inseminar a tiempo

time (FTAI). Nevertheless, it is necessary to contribute to the knowledge of endocrine and ethologic factors that take part in the period of sexual behaviour, in order to develop strategies to improve fertility of species (Porto Filho *et al.* 2014).

Occurrence, intensity and duration of provoked estrus may vary according to the different hormonal therapies. Mohan and Prakash (2010) stated that this performance may contribute to efficiency of hormonal treatments from the response of reproductive organs, as consequences of hormonal action. Quirino *et al.* (2013) and Mirmahmoudi *et al.* (2014) studied the expression of several clinical symptoms and signs of natural and induced estrus. However, there are no studies that refer the performance of estrus during the FTAI with the use of different hormonal protocols.

The objective of this study was to compare the percentage of expression of clinical signs of estrus and other aspects during the FTAI, and its relation to gestation percentage, with the use of different hormonal protocols that contain steroidal hormones (progesterone and estrogens) prostaglandins $F_{2\alpha}$, human (hCG) and equine chorionic gonadotropin (eCG) during the period of low breeding season.

Materials and Methods

Stage of study, localization and selection of animals. This research was carried out in July, in a development unit belonging to Empresa Pecuaria Genética “El Cangre” (Latitude 23° 5.35’ North; Longitude 82° 30.5’ West), located in Güines, Mayabeque province, Cuba.

An amount of 82 nulliparous female water buffaloes with 23 months old, 378.62 ± 23.78 kg of liveweight and 3.0 points of body condition. These animals showed no gynecological anomalies at transrectal palpitation and were free of infect-contagious diseases (brucellosis and tuberculosis).

Management and feeding. During daytime, animals had access to a continuous grazing (06:00 am up to 07:00 pm), with ponds and natural shadow. At night, they remained stabulated and water at will. Star grass (*Cynodon nlemfuensis*) prevailed as base feed, without fertilization or irrigation, and, in lower proportion, some varieties like hurricane grass (*Botriochloa pertusa*) and bahia grass (*Paspalum notatum*). Grasses under those conditions showed an availability of 37.0 kg of DM. female buffalo⁻¹ during rainy season, which allowed to cover the requirements on a dry basis.

Experimental procedure. Three groups of female buffaloes were created, which represented the evaluated protocols (P). The animals of PI (n=29), PII (n=28) and PIII (n=25) received 2.0 mg of estradiol benzoate (BE₂, Ourofino®) intramuscularly (IM) and a progesterone-releasing intravaginal device (PRID of P₄, Tecnopec®) for nine days. Female buffaloes of PI

fijo (IATF). No obstante, es necesario contribuir al conocimiento de los factores endocrinos y etológicos que intervienen en el período de receptividad sexual, con el objetivo de desarrollar estrategias que mejoren la fertilidad en la especie (Porto Filho *et al.* 2014).

La ocurrencia, intensidad y duración del estro provocado puede variar según las diferentes terapias hormonales. Mohan y Prakash (2010) consideran que este comportamiento puede contribuir a la eficacia de los tratamientos hormonales a partir de la respuesta de los órganos reproductivos, como consecuencias de la acción hormonal. Quirino *et al.* (2013) y Mirmahmoudi *et al.* (2014) estudiaron la expresión de varios signos y síntomas clínicos del estro natural e inducido. Sin embargo, no existen trabajos que refieren el comportamiento del estro durante la IATF, con la utilización de diferentes protocolos hormonales.

El objetivo de este estudio fue comparar el porcentaje de expresión de signos clínicos del estro y otros aspectos durante la IATF, y su relación con el porcentaje de gestación, con el empleo de diferentes protocolos hormonales que contienen hormonas esteroidales (progesterona y estrógenos), prostaglandinas $F_{2\alpha}$ y gonadotropina coriónica equina (eCG) y humana (hCG) durante la época de menor ciclicidad estral.

Materiales y Métodos

Etapas de estudio, localización y selección de los animales. La investigación se realizó durante julio, en una unidad de desarrollo perteneciente a la Empresa Pecuaria Genética “El Cangre” (Latitud 23° 5.35’ norte; Longitud 82° 30.5’ oeste), ubicada en el municipio Güines, provincia Mayabeque, Cuba. Se seleccionaron al azar 82 búfalas de río nulíparas, con edad, peso vivo y condición corporal promedio de 23 meses, 378.62 ± 23.78 kg y 3.0 puntos, respectivamente. Los animales no mostraron anomalías ginecológicas a la palpación transrectal y estaban libres de enfermedades infectocontagiosas (brucelosis y tuberculosis).

Manejo y alimentación. Durante el horario diurno, los animales tenían acceso a un pastoreo continuo (06:00 am hasta las 07:00 pm), con lagunas y sombra natural. En la noche, permanecieron estabulados y con agua a voluntad. Prevaleció como alimento base el pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*), sin fertilización ni riego y, en menor proporción, variedades como la pitilla (*Botriochloa pertusa*) y sacasebo (*Paspalum notatum*). Los pastos en esas condiciones presentaron disponibilidad durante la época de lluvia de 37.0 kg de MS. búfala⁻¹, lo que permitió cubrir los requerimientos en base seca.

Procedimiento experimental. Se formaron tres grupos de búfalas, que representaron los protocolos evaluados (P). Los animales de los PI (n=29), PII (n=28) y PIII (n=25) recibieron 2.0 mg de benzoato de estradiol (BE₂, Ourofino®) por vía intramuscular (IM) y un dispositivo intravaginal de liberación lenta de progesterona (DIV de P₄, Tecnopec®) durante nueve días. A las búfalas de

and PII received 0.5 mg of prostaglandin $F_{2\alpha}$ (PGF $_{2\alpha}$, Ciosin®), 500 international units (IU) of equine chorionic gonadotropin (eCG, Novormon®) and 0.5 mg estradiol cypionate (EC $_2$, E.C.P®) (IM), after withdrawing the ID of P $_4$. Animals of PIII received the same hormonal treatment, except the CE $_2$. At 48 h after the treatment, 1000 IU of human chorionic gonadotropin (hCG, Chorulon®) were applied (Figure 1).

FTAI was conducted between 48-50 h in PI (08:00 am), 56-58 h in PII (04:00 pm) and 14-16 h in PIII (08:00 am), after the last hormonal application. At the time of the FTAI, signs of estrus (swollen vulva, vaginal vestibule coloration, mucus discharge cervico-uterine tone, and color of uterine horns) and other aspects during insemination (excitement, cervical passage and time of FTAI ≤ 60 s) were evaluated, with the purpose of comparing the expression percentage among hormonal protocols. Pregnancy diagnosis was performed at 45 d through the rectum (manual and ultrasound).

los PI y PII, se les aplicó 0.5 mg de prostaglandina $F_{2\alpha}$ (PGF $_{2\alpha}$, Ciosin®), 500 unidades internacionales (UI) de gonadotropina coriónica equina (eCG, Novormon®) y 0.5 mg de cipionato de estradiol (CE $_2$, E.C.P®) (IM), al retirarse el DIV de P $_4$. Los animales del P III recibieron igual tratamiento hormonal, excepto que no recibieron CE $_2$. A las 48 h posteriores al tratamiento, se les aplicó 1000 UI de gonadotropina coriónica humana (hCG, Chorulon®) (figura 1).

La IATF se realizó entre 48-50 h en el PI (08:00 am), 56-58 h en PII (04:00 pm) y 14-16 h en PIII (08:00 am), posteriores a la última aplicación hormonal. En el momento de realizar la IATF se evaluaron los signos del estro (edema vulvar, coloración del vestíbulo vaginal, secreciones cérvico-uterino y tonicidad de los cuernos uterinos) y otros aspectos durante la inseminación (excitamento, permeabilidad cervical y el tiempo de IATF ≤ 60 s), con el propósito de comparar el porcentaje de expresión entre los protocolos hormonales. El diagnóstico de gestación se realizó a los 45 d por vía rectal (manual y ecografía).

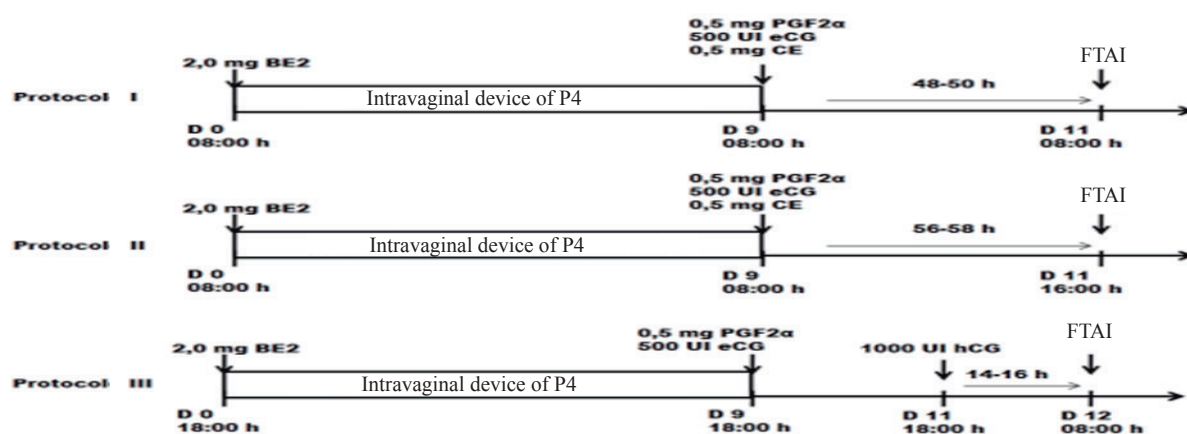


Figure 1. Graphs of hormonal protocols for FTAI

Statistical analysis. Data were processed using a generalized linear mixed model (Wolfinger and O'Connell 1993), using the PROC GLIMMIX of SAS (2010) version 9.3. All variables were considered as binomial (1 presence and absence 0) and the model took into account a binomial distribution and the logit was considered as bond function, offering the retransformed values. The treatment (hormonal protocol: three levels) was considered as fixed effect and the animals (25-29) nested in this treatment were used as random effect. Covariables of liveweight (LW) and age at the moment of FTAI were evaluated, which were not considered in the final model because they were not significant.

The test of Tukey, modified by Kramer (1956) for multiple comparison of means, with significance level of $P < 0.05$, was applied. By means of PROC MEANS of SAS (2010), position and dispersion statistics (mean, standard deviation, coefficient of variation, minimum and maximum values) were determined to binomial

Análisis estadístico. Los datos se procesaron mediante un modelo lineal generalizado mixto (Wolfinger y O'Connell 1993), con ayuda del PROC GLIMMIX del SAS 2010), versión 9.3. Se consideraron todas las variables como binomial (1 presencia y 0 ausencia) y el modelo tuvo en cuenta una distribución binomial y como función de enlace la logit, ofreciendo los valores retransformados. Como efecto fijo, se consideró el tratamiento (protocolo hormonal: tres niveles) y como aleatorio, el animal (25-29) anidado en el tratamiento en cuestión. Se evaluaron las covariables peso vivo (PV) y edad al momento de la IATF, que al resultar no significativas no se consideraron en el modelo final.

Se aplicó la dócima de Tukey, modificada por Kramer (1956) para la comparación múltiple de las medias, con nivel de significación para $P < 0.05$. Se determinaron, mediante el PROC MEANS del SAS (2010), los estadígrafos de posición y dispersión (media, desviación estándar, coeficiente de variación, valores

variables that showed no differences among hormonal protocols, in order to know their general performance. The CORR procedure of SAS (2013) program were used to estimate Pearson correlations among the variables studied for each hormonal protocol.

The following model was used:

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

Where:

Y_{jk} = $f(\mu)$ expected phenotypic value of studied variables, according to the function of specific bond

μ = mean or intercept

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

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

e_{jk} = random error due to each observation $NID \sim (0, s^2_e)$

Results and Discussion

Swollen vulva, dark pink coloration of vaginal vestibule and the presence of mucus discharge cervico-uterine at transrectal palpation were signs that showed differences among hormonal protocols (Table 1), while the uterine tone, nervous excitement, time of FTAI ≤ 60 s and cervical passage showed no significant effect.

Percentages and differences between treatments

mínimos y máximos) a las variables binomiales que no mostraron diferencias entre los protocolos hormonales, para conocer su comportamiento general. Se empleó el procedimiento CORR, también del programa SAS (2013), para estimar las correlaciones de Pearson entre las variables estudiadas para cada protocolo hormonal.

A continuación se presenta el modelo utilizado:

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

Donde:

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

μ = media o intercepto

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

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

e_{jk} = error aleatorio debido a cada observación $NID \sim (0, s^2_e)$

Resultados y Discusión

El edema vulvar, la coloración rosada oscura del vestíbulo vaginal y la presencia de secreciones cérvico-uterinas a la palpación transrectal fueron los signos que presentaron diferencias entre los protocolos hormonales (tabla 1), mientras que el tono uterino, excitamento nervioso, tiempo de IATF ≤ 60 s y permeabilidad cervical no mostraron efecto significativo.

Table 1. Analysis of variance according to GLIMMIX (F value) for clinical signs of estrus and other aspects during FTAI

Variables	Treatment (Fix)		
	DF	F Value	P value
Swollen vulva	2	10.37	0.003
Dark pink coloration of the vaginal vestibule	2	8.91	0.008
Cervical and uterine secretions at trans-rectal palpation	2	7.44	0.004
Uterine tone	2	0.30	0.867
Nervous excitement	2	0.89	0.905
Time of FTAI (≤ 60 seg.)	2	0.57	0.460
Cervical passage	2	0.80	0.318

suggest that heat of animals from protocol I had better expression, although it had no influence on pregnancy percentage (figure 2). Results could be related to an increase of estrogen concentration in blood of animals and, consequently, a superior expression of heat performance during the period of the observation. In general, during other hours after the application or not of CE₂ (II and III), the signs occurred in a reduced percentage of animals. This performance could be caused by the time since the implementation of CE₂ until the observation during the FTAI. This period of time was shorter (PI = 48-50 h) with respect to the other hormonal protocols (PII = 56-58 h and PIII = 62-64 h).

These results are based on evidence from studies

Los porcentajes y las diferencias entre los tratamientos indican que el celo de los animales del protocolo I tuvo mejor expresión, aunque no influyó en el porcentaje de gestación (figura 2). Los resultados se pudieran relacionar con aumento de la concentración en sangre de estrógeno en los animales y, como consecuencia, mayor expresión de la conducta de celo en el período en que se realizó la observación. En general, en otras horas posteriores a la aplicación o no del CE₂ (II y III), los signos se presentaron en un porcentaje reducido de animales. La causa de este comportamiento pudo estar dada por el tiempo desde la aplicación del CE₂ hasta que se realizó la observación durante la IATF, intervalo que fue más corto (PI= 48-50 h) con respecto al resto de los

of Mohan *et al.* (2009), but in lactating animals. These authors found that 100% of female buffaloes showed the highest concentrations of estradiol in the blood during the first 24 h (range 12-26 h) after application of BE₂, with a tendency to gradually decrease.

Similar results reported Mohan and Prakash (2010), who also observed that, in 60% of animals of the same productive category, there was a period of time from the treatment at the beginning of swollen vulva with a range between 18.2 ± 1.01 and 40.0 ± 1.85 h, using the Heatsynch® protocol. Hiremath (2013) reported that 67.8% of female buffaloes in milk production showed equal clinical signs between 36 and 48 h, after using BE₂, 24 h after the removal of PRIDP₄.

Research conducted by Kajaysri *et al.* (2015) also demonstrated increased expression of clinical signs of estrus between 32 and 36 h after removal of the release device of P₄ (CIDR®).

Similar performances were reported by Pancarci *et al.* (2002) and Mohan and Prakash (2010), who found 86 and 60 % of female buffaloes with visible secretions,

protocolos hormonales (PII= 56-58 h) (PIII= 62-64 h).

Estos resultados se sustentan a partir de las evidencias de los estudios de Mohan *et al.* (2009), pero en animales en lactación. Estos autores hallaron que 100 % de las búfalas mostraron las mayores concentraciones de estradiol en sangre durante las primeras 24 h (rango 12-26 h) posteriores a la aplicación del BE₂, con tendencia a disminuir paulatinamente.

Resultados similares informaron Mohan y Prakash (2010), quienes observaron también en 60 % de los animales de esta misma categoría productiva, intervalo desde el tratamiento al inicio del edema vulvar una fluctuación entre 18.2 ± 1.01 y 40.0 ± 1.85 h, al utilizar el protocolo Heatsynch®. Hiremath (2013) refirió que 67.8 % de las búfalas en producción láctea mostraron igual signo clínico durante un período entre 36 y 48 h, al utilizar BE₂ 24 h después de la remoción del DIVP₄.

Investigaciones realizadas por Kajaysri *et al.* (2015) también constataron mayor expresión de los signos clínicos del estro entre 32 y 36 h posteriores a la retirada del dispositivo de liberación de P₄ (CIDR®).

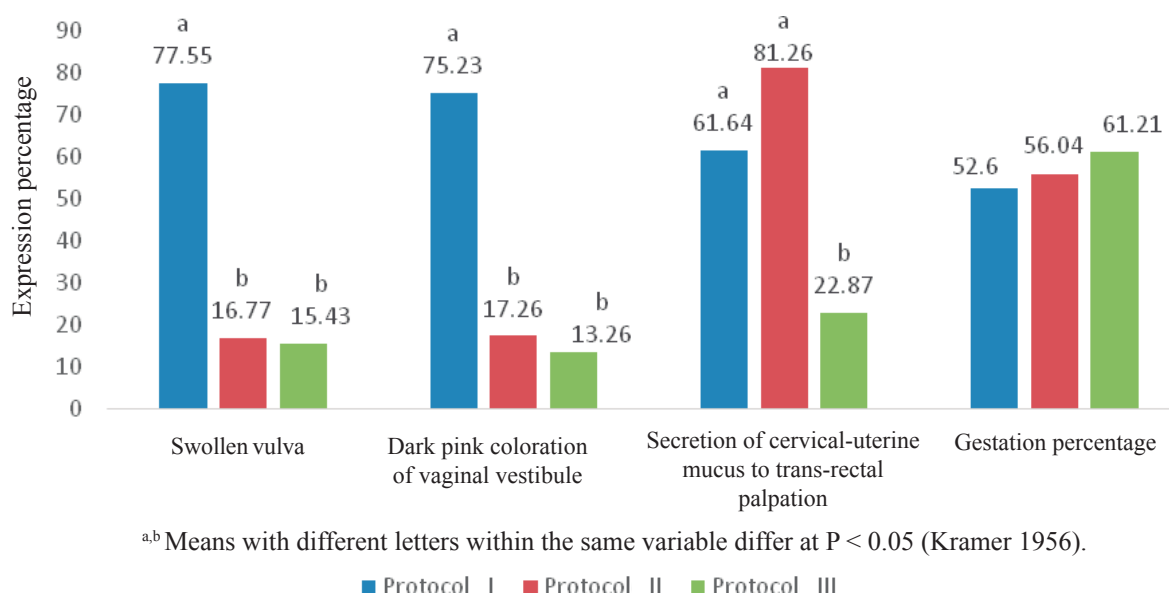


Figure 2. Percentage of expression of clinical signs of estrus at the moment of FTAI and of gestation

when using CE₂ and BE₂ as ovulation synchronizer, respectively. These authors described a range of appearance between 22 and 44 h.

This study showed that swollen vulva and secretions remained during a slightly superior period, which could be caused by the frequency and experience of estrus detection, by the nutritional state of animals, dosage and type of hormone. CE₂, the estradiol ester used in PI and PII, has an average life in blood superior to BE₂. This effect could explain most of the permanence of signs observed in this research. The study method of heat also influenced on the results because the observation was only performed during the FTAI. Manipulation and stimulation of the insemination catheter in genital organs could

Comportamientos similares informaron Pancarci *et al.* (2002) y Mohan y Prakash (2010), quienes hallaron 86 y 60 % de búfalas con secreciones visibles, al utilizar el CE₂ y BE₂ como sincronizante de la ovulación, respectivamente. Estos autores describieron un rango de presentación que osciló entre 22y 44 h.

En este trabajo se observó que edema vulvar y las secreciones permanecieron por un período ligeramente superior, lo que se pudo deber a la frecuencia y experiencia en la detección del estro, al estado nutricional de los animales, la dosis y el tipo de hormona. El CE₂, éster de estradiol que se utilizó en los PI y PII, posee una vida media en sangre superior al BE₂, efecto que podría explicar la mayor permanencia de los signos observados en esta investigación. El método de estudio del celo

increase uterine contractions that stimulate the fluid evacuation.

Other possible differences may be related to productive and reproductive category because most of the previous studies were performed in milk-producer multiparous female buffaloes. Sartori and Mendes (2010) stated that cows, during lactation, show a period of lower estrus, due to a decrease of estradiol concentrations circulating in blood, as a consequence of a more accelerated hepatic metabolism.

The uterine tone and cervical passage showed a high percentage (75-79 and 80-86 %, respectively) in all hormonal protocols (table 2). Mohan *et al.* (2009) pointed out, as a distinct characteristic, the strong increase of uterine tone and cervical dilatation during natural or induced estrus, apart from the used hormones. However, Atanasov *et al.* (2011) found no differences in uterine tone when the animals presented follicles with lower or higher diameter than 10.0 mm⁻¹. Studies conducted by Martin *et al.* (2009) and Lima *et al.* (2011) confirm the high sensitivity of the uterus to the effect of estradiol, due to the high number of estrogen receptors, more than in other segments of the genital tract.

The action of the eCG stimulating follicle could be the cause of not having differences in the turgidity of uterine horns and cervical passage among protocols because this hormone provokes an increase in the

también influyó en los resultados, ya que la observación solamente se realizó durante la IATF. La manipulación y el estímulo del catéter de inseminación en los órganos genitales pudieron aumentar las contracciones uterinas que estimulan la evacuación de los fluidos

Otras posibles diferencias se deben relacionar con la categoría reproductiva y productiva, pues la mayoría de los trabajos anteriores se realizaron con búfalas multiparas en producción de leche. Sartori y Mendes (2010) plantearon que las vacas, cuando están lactando, presentan un período de estro menor, debido a la disminución de las concentraciones de estradiol circulantes en sangre, como consecuencia de un metabolismo hepático más acelerado.

El tono uterino y la permeabilidad cervical presentaron un porcentaje alto (75-79 y 80-86 %, respectivamente) en todos los protocolos hormonales (tabla 2). Mohan *et al.* (2009) señalaron como una característica distinguible el fuerte aumento del tono uterino y la dilatación cervical durante el estro natural e inducido, independiente de las hormonas utilizadas. Sin embargo, Atanasov *et al.* (2011) no hallaron diferencias en el tono uterino, cuando los animales presentaron folículos con diámetro mayor y menor a 10.0 mm⁻¹. Los trabajos realizados por Martin *et al.* (2009) y Lima *et al.* (2011) confirman la alta sensibilidad del útero al efecto del estradiol, debido a la mayor cantidad de receptores de estrógeno que en otros segmentos del tracto genital.

Table 2. Statistics of variables that were not affected by hormonal protocols

Variables	n	Mean	SD	CV	Min	Max
Turgency in uterine horns	82	77	1.6	1.9	75	79
Nervous excitement	82	65	0.6	0.7	63	66
Time of FTAI (≤ 60 seg)	82	35	3.9	4.7	30	37
Cervical penetration	82	83	3.6	4.4	80	86

development of dominating follicles and, consequently, an increase of estrogen concentration in blood of follicular origin. The nervous excitement of animals showed a similar performance in all protocols, which could justify the insemination of only between 30 and 37 % of female buffaloes during a time ≤ 60 s (table 2).

The time during the AI and excitement showed a negative and mean correlation with gestation in all hormonal protocols (table 3), which could have an influence on the act of insemination technique and, consequently, on fertility of animals. Nervous excitement of animals could be related to management and scarce daily contact with humans (without milking). This performance was similar to that reported by Tito *et al.* (2010), who stated that young animals may be stressed faster. According to these authors, frequent moving, attempts to go back, muscular contractions, defecation and jumps, at the moment of FTAI, may have a negative influence on the skills of the technician and,

La acción folículo estimulante de la eCG pudo ser la causa de que no se presentaran diferencias en la turgencia de los cuernos uterinos y la permeabilidad cervical entre los protocolos, ya que esta hormona provoca incremento en el desarrollo de los folículos dominantes y, en consecuencia, aumento de las concentraciones de estrógeno en sangre de origen folicular. Similar comportamiento mostró el excitemento nervioso de los animales en todos los protocolos, situación que podría justificar que se inseminaran solamente entre 30 y 37 % de las búfalas durante un tiempo ≤ 60 s (tabla 2).

El tiempo durante la IA y el excitemento nervioso mostraron una correlación media y negativa con la gestación en todos los protocolos hormonales (tabla 3), lo que pudo influir en el acto de la inseminación y consecuentemente, en la fertilidad de los animales. El excitemento nervioso de los animales se pudiera relacionar con el manejo y el escaso contacto que establecen con el hombre diariamente (ausencia de ordeño). Este comportamiento fue similar a

consequently, on the insemination time.

Vendruscolo *et al.* (2005) demonstrated that the speed of FTAI has a significant influence on gestation percentage, and it is related to cervical passage and excitement of animals. The statistical analysis of that study evidenced that probability of animals to gestate, from the AI performed before two minutes, was 3.45 times higher than when the time was superior.

Cervical passage and gestation also showed high and positive relation (table 3). Not exposing the spermatozooids to defense cells (neutrophils and lymphocytes) located in the cervix, advancing the sperm route and locating the semen in areas of the uterine area, which contain higher concentration of

lo informado por Tito *et al.* (2010), quienes señalaron que los animales jóvenes se estresan con mayor rapidez. Según los autores, los desplazamientos frecuentes, intentos de retroceder, contracción muscular, defecación y saltos, al momento de la IATF, pueden influir de manera negativa en la habilidad del técnico y, como consecuencia, en el tiempo de inseminación.

Vendruscolo *et al.* (2005) demostraron que la velocidad con que se realiza la IATF influye de manera significativa en el porcentaje de gestación, y que se relaciona con la permeabilidad cervical y el excitemento de los animales. El análisis estadístico en su estudio evidenció que la probabilidad de los animales para gestarse, a partir de una IA realizada antes de dos minutos, fue 3.45 veces mayor que cuando se realizó en un tiempo superior.

Table 3. Correlation among clinical signs of estrus and other aspects related to the moment of FTAI with the gestation percentage

Gestation	TURG	SECRE	CP	VC	TEMP	VE	TAI
GEST (Protocol I)	0.133	0.149	0.782 (**)	0.240	-0.625 (*)	0.048	-0.647 (**)
GEST (Protocol II)	0.164	0.280	0.682 (*)	0.100	-0.515 (*)	-0.355	-0.521 (*)
GEST (Protocol III)	0.093	0.073	0.848 (**)	0.080	-0.615 (*)	-0.055	-0.644 (**)

*, ** significant correlation level for $P < 0.05$ and $P < 0.01$ respectively

TURG: uterine turgency

SECRE: cervical-uterine secretions,

CP: cervical passage,

VC: vulva coloration,

TEMP: Excitement,

VE: swollen vulva,

TAI: Time during artificial insemination

substances that stimulate the acrosome reaction and neutralize handicapping factors of seminal plasma, could avoid the decrease of its concentration, the energy waste and increase of fertilizing ability (Vecchio *et al.* 2013).

It can be concluded that there are differences in the expression of clinical signs of estrus (swollen vulva, dark pink coloration of the vaginal vestibule and cervical and uterine secretions), according to the used hormonal protocols, although they had no influence on gestation percentage. Fertility of animals is favored by cervical passage. However, it is affected with the increase of excitement and the time of FTAI is extended, which are practical aspects to be considered in order to improve reproductive indexes for future insemination programs.

Acknowledgements

Thanks to the Coordinación de Perfeccionamiento para la Educación Superior de la República de Brasil (CAPES) for the financing (Project 96/2010) and to the

La permeabilidad cervical y la gestación también presentaron relación alta y positiva (tabla 3). No exponer los espermatozoides a las células de defensa (neutrófilos y linfocitos) localizadas en el cérvix, adelantar el recorrido espermático y depositar el semen en zonas del cuerpo uterino que poseen mayor concentración de sustancias que estimulan la reacción acrosómica y neutralizan factores descapacitantes del plasma seminal, podría evitar que disminuyera su concentración, el desgaste energético y el aumento de la capacidad fecundante en el lugar de la fertilización (Vecchio *et al.* 2013).

Se concluye que existen diferencias en la expresión de los signos clínicos del estro (edema vulvar, coloración rosada oscuro del vestíbulo vaginal y secreciones cérvico-uterinas) según los protocolos hormonales utilizados, aunque estos no influyeron en el porcentaje de gestación. La fertilidad de los animales se favorece con la permeabilidad cervical. Sin embargo, se afecta cuando se incrementa el excitemento y se extiende el tiempo de IATF, aspectos prácticos que se deben considerar para mejorar los índices reproductivos en futuros programas de inseminación.

Empresa Genética Pecuaria “El Cangre” for facilitating the implementation of this study.

Agradecimientos

Se agradece a la Coordinación de Perfeccionamiento para la Educación Superior de la República de Brasil (CAPES) por el financiamiento recibido (Proyecto 96/2010) y a la Empresa Genética Pecuaria “El Cangre” por facilitar la ejecución del trabajo.

References

- Atanasov, A., Yotov, S., Antonov, A. & Kolev P. 2011. “Induction of oestrus and conception rates in Bulgarian Murrah buffaloes after fixed-time artificial insemination (A preliminary study)”. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 14 (3): 165–170, ISSN: 1311-1477, 1313-3543.
- Fraga, B. L. M., Cino, N. D. M., Guzman, M. G., Garcia, O. Y., Dulzaide, M., Fernandez, G. D. & Rodriguez, L. A. 2013. “An integrated study on milk and beef production conducted at Macun Buffalo Enterprise in Cuba. Some results and recommendations”. *Buffalo Bulletin*, 32 (2): 1174–1174, ISSN: 0125-6726.
- Hiremath, S. S. 2013. “Controlled breeding and reproductive management in buffaloes-using EAZI breed CIDR”. *Buffalo Bulletin*, 32 (2): 418–422, ISSN: 0125-6726.
- Kajaysri, J., Chumchoung, C. & Photikanit, G. 2015. “Estrus and ovulation responses in anestrus postpartum swamp buffaloes following synchronization with a controlled internal drug release device and prostaglandin F2 α based protocols”. *Buffalo Bulletin*, 34 (3), ISSN: 0125-6726, Available: <https://www.researchgate.net/profile/Jatuporn_Kajaysri/publication/282641248_ESTRUS_AND_OVULATION_RESPONSES_IN_ANESTRUS_POSTPARTUM_SWAMP_BUFFALOES_FOLLOWING_SYNCHRONIZATION_WITH_A_CONTROLLED_INTERNAL_DRUG_RELEASE_DEVICE_AND_PROSTAGLANDIN_F2_BASED_PROTOCOLS/links/5614bff508ae983c1b40bc91.pdf>, [Consulted: February 28, 2016].
- Kramer, C. Y. 1956. “Extension of Multiple Range Tests to Group Means with Unequal Numbers of Replications”. *Biometrics*, 12 (3): 307–310, ISSN: 0006-341X, DOI: 10.2307/3001469.
- Lima, R. S., Martin, I., Marques Filho, W. C., Rodrigues, M. M. P., Laufer-Amorim, R. & Ferreira, J. C. P. 2011. “Detecção imunoistoquímica de receptores de estrógeno e progesterona no endométrio de vacas Nelore (*Bos taurus indicus*) durante o anestro pós-parto”. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 63 (4): 791–798, ISSN: 0102-0935, DOI: 10.1590/S0102-09352011000400001.
- Martin, I., Torres, Neto R., Oba, E., Buratini Jr., J., Binelli, M., Laufer-Amorim, R. & Ferreira, J. 2008. “Immunohistochemical Detection of Receptors for Oestrogen and Progesterone in Endometrial Glands and Stroma during the Oestrous Cycle in Nelore (*Bostaurus indicus*) Cows”. *Reproduction in Domestic Animals*, 43 (4): 415–421, ISSN: 1439-0531, DOI: 10.1111/j.1439-0531.2007.00928.x.
- Mirmahmoudi, R., Souri, M. & Prakash, B. S. 2014. “Endocrine changes, timing of ovulation, ovarian follicular growth and efficacy of a novel protocol (Estradoublesynch) for synchronization of ovulation and timed artificial insemination in Murrah buffaloes (*Bubalus bubalis*)”. *Theriogenology*, 81 (2): 237–242, ISSN: 0093-691X, DOI: 10.1016/j.theriogenology.2013.09.016.
- 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*)”. *Tropical Animal Health and Production*, 42 (5): 947–952, ISSN: 0049-4747, 1573-7438, DOI: 10.1007/s11250-009-9512-7.
- Mohan, K., Sarkar, M. & Prakash, B. S. 2009. “Efficiency of Heatsynch protocol in estrus synchronization, ovulation and conception of dairy buffaloes (*Bubalus bubalis*)”. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 22 (6): 774–780, ISSN: 1011-2367.
- Pancarci, S. M., Jordan, E. R., Risco, C. A., Schouten, M. J., Lopes, F. L., Moreira, F. & Thatcher, W. W. 2002. “Use of Estradiol Cypionate in a Presynchronized Timed Artificial Insemination Program for Lactating Dairy Cattle”. *Journal of Dairy Science*, 85 (1): 122–131, ISSN: 0022-0302, DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(02)74060-5.
- Porto-Filho, R. M., Gimenes, L. U., Monteiro, B. M., Carvalho, N. A. T., Ghuman, S. P. S., Madureira, E. H. & Baruselli, P. S. 2014. “Detection of estrous behavior in buffalo heifers by radiotelemetry following PGF2 α administration during the early or late luteal phase”. *Animal Reproduction Science*, 144 (3–4): 90–94, ISSN: 0378-4320, DOI: 10.1016/j.anireprosci.2013.12.006.
- Quirino, C., Madella, O. A., Pacheco, A., Almaguer, Y., Font, H. & Montes, I. 2013. “Comportamento sexual em búfalas da região norte do estado de Rio de Janeiro-Brasil”. In: IV Congreso de Producción Animal Tropical, La Habana, Cuba: EDICA, ISBN: 978-959-7171-49-2.
- Rossi, P., Vecchio, D., Neglia, G., Di Palo, R., Gasparrini, B., D’Occhio, M. J. & Campanile, G. 2014. “Seasonal fluctuations in the response of Italian Mediterranean buffaloes to synchronization of ovulation and timed artificial insemination”. *Theriogenology*, 82 (1): 132–137, ISSN: 0093-691X, DOI: 10.1016/j.theriogenology.2014.03.005.
- Sartori, R. & Guardieiro, M. M. 2010. “Nutritional factors associated with reproduction in heifers and cows”. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 39: 422–432, ISSN: 1516-3598, DOI: 10.1590/S1516-35982010001300047.
- SAS Institute. 2010. Statistical Analysis Software SAS/STAT®. version 9.0.2, Cary, N.C., USA: SAS Institute Inc, ISBN: 978-1-60764-599-3, Available: <http://www.sas.com/en_us/software/analytics/stat.html#>.
- Titto, E. A. L., Titto, C. G., Gatto, E. G., Noronha, C. M. S., Mourão, G. B., Filho, J. C. M. N. & Pereira, A. M. F. 2010.

- “Reactivity of Nellore steers in two feedlot housing systems and its relationship with plasmatic cortisol”. *Livestock Science*, 129 (1–3): 146–150, ISSN: 1871-1413, DOI: 10.1016/j.livsci.2010.01.017.
- Vecchio, D., Rossi P., Neglia, G., Longobardi, V., Salzano, A., Bifulco, G. & Campanile, G. 2013. “Comparison of two synchronization protocols for timed artificial insemination in acyclic Italian Mediterranean buffalo cows out of the breeding season”. *Buffalo Bulletin*, 32 (2): 479–479, ISSN: 0125-6726.
- Vendruscolo, M., Kozicki, L. E., Segui, M. S., Weiss, R. R. & Santos, I. V. 2005. “Relação entre a duração do ato da inseminação artificial em bovinos e a fertilidade”. *Archives of Veterinary Science*, 10 (2), ISSN: 1517-784X, DOI: 10.5380/avs.v10i2.4421.
- Wolfinger, R. & O’Connell, M. 1993. “Generalized linear mixed models a pseudo-likelihood approach”. *Journal of Statistical Computation and Simulation*, 48 (3-4): 233–243, ISSN: 0094-9655, DOI: 10.1080/00949659308811554.

Received: April 14, 2015