

ORIGINAL

## Comparison between two fixed-time artificial insemination protocols in Brahman cows

### Comparación de dos protocolos de inseminación artificial a tiempo fijo en vacas Brahman

Diego Riveros-Pinilla<sup>1\*</sup> M.Sc; Laura Marin-Cossio<sup>1</sup> MVZ; Jorge Parra-Arango<sup>1</sup> M.Sc; Miguel Peña-Joya<sup>1</sup> M.Sc; Liliana Chacón-Jaramillo<sup>2</sup> Ph.D; Agustín Góngora O<sup>1</sup> Ph.D.

<sup>1</sup>Universidad de los Llanos, School of Agricultural and Livestock Sciences and Natural Resources, Reproduction and Animal Genetics Research Group GIRGA, Km 12 vía Puerto López, Vereda Barcelona, Villavicencio, Colombia. <sup>2</sup>Universidad de la Salle, School of Agricultural and Livestock Sciences, Reproduction and Animal Improvement Research Group REMEAT, Cra. 7 N° 175, Bogotá, Colombia.\* Correspondence: [diego.riveros@unillanos.edu.co](mailto:diego.riveros@unillanos.edu.co)

Received: Octubre 2017; Accepted: June 2018.

#### ABSTRACT

**Objective.** To compare two fixed-time artificial insemination protocols (FTAI) according to the pregnancy percentage in Brahman cattle. **Materials and methods.** 60 cows between days 90 and 360 postpartum were selected and randomly divided into two groups. For Treatment 1 (T1; n=30), an intravaginal device (IVD) containing 0.5 g of progesterone and 2.0 mg of estradiol benzoate were inserted on Day 0. At the time of IVD withdrawal (Day 8), 150 mg of PGF<sub>2α</sub>, im and 300 UI of eCG, im and 0.5 mg of estradiol cypionate, im were administered. FTAI was performed on Day 10, 48 – 50 h after IVD withdrawal. For Treatment 2 (T2; n= 30) an IVD was inserted on Day 0 and 0.01 mg GnRH, im were administered. At the time of the IVD withdrawal (Day 5), two doses of 0.150 mg of PGF<sub>2α</sub> were administered at midnight and noon. FTAI was performed on Day 8, 72h after IVD withdrawal, and 0.01 mg of GnRH, im was administered. FTAI was performed using semen of proven fertility. **Results.** Pregnancy diagnosis by rectal palpation occurred 45 days after the FTAI. T2 and T1 presented pregnancy percentages of 46.7% (14/30) and 33.3% (10/30), respectively. **Conclusions.** Treatment 2 is preferred in terms of results and public health.

**Keywords:** Estrus synchronization; GnRH; postpartum period; reproduction; Zebu (*Source: DeCs*).

#### RESUMEN

**Objetivo.** Comparar dos protocolos de inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) sobre el porcentaje de preñez en vacas Brahman. **Materiales y métodos.** Se seleccionaron 60 vacas entre 90 y 360 días posparto y asignadas aleatoriamente en dos grupos. El tratamiento 1 (T1; n=30) consistió en la aplicación el día 0 de un dispositivo intravaginal (DIV) que contenía 0.5 g de progesterona y 2.0 mg de benzoato de estradiol im. El día 8 se retiró el DIV y se aplicaron 0.150 mg de PGF<sub>2α</sub>, im y 300 UI de eCG, im y 0.5 mg de cipionato de estradiol, im. El día 10 se realizó la IATF a las 48 – 50 h posterior al retiro del DIV. El tratamiento 2 (T2; n= 30) consistió en la inserción del DIV el día 0 y 0.01 mg GnRH, im. El día 5 se retiró el DIV y se aplicaron dos dosis de 0.150 mg de PGF<sub>2α</sub>, a las 0 y 12 horas. El día 8 se realizó la IATF a las 72 h posterior al retiro del DIV y 0.01 mg de GnRH, im. La IATF se realizó con un semen de fertilidad comprobada. **Resultados.** El diagnóstico de preñez se realizó a los 45 días luego de la IATF por palpación rectal. El T2 y T1 presentaron porcentajes de preñez de (46.7%; 14/30) y (33.3%; 10/30), respectivamente. **Conclusiones.** Se justifica la aplicación del tratamiento 2 en función de los resultados y la salud pública.

**Palabras clave:** Cebú; GnRH; período posparto; reproducción; sincronización del estro (*Fuente:DeCs*).

## INTRODUCTION

Artificial insemination (AI) is a powerful tool for genetic improvement of cattle in the tropics. Despite this, the average of cows that are artificially inseminated in developing countries is low (1). The massive use of AI in beef cattle in grazing systems is impractical due to the difficulty in heat detection, and even more so if the characteristics of the sexual behavior exhibited by Zebu cattle are taken into account (associated with a shorter and less intense estrus) (2).

In Colombia, 70% of cattle is dedicated to the production of meat. Beef cattle breeds are mainly *Bos indicus* and crosses, and in other areas, *Bos taurus* specialized in meat production. These are located mainly in low tropical regions (3). In the Colombian cattle system, *Bos indicus* cows graze with the calf until weaning. During this period, ovarian resumption is low. In contrast, once the visual stimulus is eliminated, whether by weaning or by restricted nursing, cows resume ovarian activity and henceforth may become pregnant again. Postpartum anestrus in breeding production systems and, to a lesser extent, in dual-purpose, increase the birth-conception interval, which reduces the birth rate and the number of calves weaned per cow per year.

An important alternative to increase the proportion of pregnant cows in a short postpartum period and reduce the interval between birth and conception is based on the application of fixed-time artificial insemination (FTAI) protocols. This biotechnology allows artificial insemination of multiple cows without needing to detect females in estrus. It consists of manipulating the estrous cycle by means of a hormonal treatment that recreates the physiological conditions that allow AI in a given interval. By means of FTAI, services and calving seasons can be set. Genetic improvement is possible by using semen of outstanding breeding males and specialized meat or milk breeds. This biotechnology was initially applied to *Bos taurus* cattle, and has progressively been used for *Bos indicus* cattle (4).

The first FTAI protocols were based on the use of prostaglandin F2a (PGF2a) and the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) were known as the Ovsynch protocol, which consists in the synchronization of the estrous cycle and ovulation (5), subsequently, a series of variants emerged with the inclusion of a slow-release progesterone device.

The progesterone combination is also used from 7 to 8 days as an ear implant or intravaginal device (IVD.) Estradiol combined with progesterone is administered to initiate follicle wave development and for inducing ovulation at the end of the protocol (6). This is the most commonly used

## INTRODUCCIÓN

La inseminación artificial (IA) es una herramienta poderosa para el mejoramiento genético de la ganadería bovina en el trópico, a pesar de esto, el porcentaje de vacas inseminadas en los países en desarrollo es bajo (1). El uso masivo de la IA en ganado de carne en sistemas de pastoreo es impráctico, por la laboriosa detección de los celos, lo cual se agrava con las características propias del comportamiento sexual del Cebú, asociadas con una menor duración e intensidad del celo (2).

En Colombia el 70% de la ganadería está dedicada para la producción de carne, los hatos destinados para la producción de carne están conformados principalmente por razas *Bos indicus* y mestizaje, y en algunas zonas por razas *Bos taurus* especializadas en la producción de carne. Estas ganaderías están ubicadas principalmente en regiones del trópico bajo (3). En el sistema ganadero en Colombia, las vacas *Bos indicus* permanecen en pastoreo con el ternero hasta el destete, durante este período la reactivación ovárica es pobre. En contraste, una vez suprimido el estímulo visual del ternero, por el destete o por restricciones en el amamantamiento las vacas reinician la actividad ovárica y por ende la posibilidad de una nueva preñez. El anestro posparto, en sistemas de producción de cría y en menor cuantía en doble propósito, incrementan el intervalo parto concepción, disminuyendo la tasa de natalidad y los destetos por vaca al año.

Una alternativa importante para aumentar la proporción de vacas preñadas, en un corto período de tiempo posparto y disminuir el intervalo parto a la concepción es la aplicación de los protocolos de inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) en estas ganaderías. Esta biotecnología permite hacer inseminación artificial de un amplio número de vientres sin necesidad de la detección de las hembras en estrus. Consiste en la manipulación del ciclo estral, mediante un tratamiento hormonal para reproducir las condiciones fisiológicas que permitan realizar la IA en un periodo de tiempo establecido. Con la IATF se logran establecer temporadas de servicios y partos, y se favorece el mejoramiento genético al usar semen de reproductores sobresalientes y razas especializadas en producción de carne o leche. El desarrollo de esta biotecnología se aplicó inicialmente en ganado *Bos taurus* pero progresivamente se ha venido utilizando en ganado *Bos indicus* (4).

Los primeros protocolos de IATF se basaron en el uso de prostaglandina F2a (PGF2a) y la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) que fue conocido como Ovsynch, que consiste en la sincronización del ciclo estral y la ovulación (5), posteriormente surgieron una serie de variantes con la inclusión de un dispositivo de liberación lenta de progesterona.

protocol in breeding systems in Latin America (7, 8). It allows simultaneous insemination of a group of females without having to detect heat between 52 to 56 hours after IVD withdrawal.

The most employed FTAI protocols in Zebu females were generally based on the placement of an IVD and administration of estradiol benzoate (EB) at the beginning of the process (Day 0), and at the end (Day 7 or 8), use of PGF2 $\alpha$  and an estrogen such as cypionate (CPE) or valerate (VE) for ovulation synchronization (9). Additionally, the use of equine chorionic gonadotropin (eCG) has been incorporated into the system to improve follicle growth in postpartum cows (7, 10).

Progesterone metabolism in *Bos indicus* and *Bos taurus* is different, probably because hepatic metabolism in *Bos indicus* females is lower, which maintains higher serum concentrations of progesterone during FTAI protocols. This could compromise the ovulation processes (11). Therefore, it is possible that Zebu females would need to begin reducing exogenous progesterone and corpus luteum concentrations prior to implant removal. The first strategy to reduce progesterone concentrations in FTAI protocols for female Zebu consists in using devices with less progesterone. These aim to reduce more rapidly serum concentrations, which could lead to an increase in ovulation rates and female bovine pregnancy (12). The second strategy consists of the use of PGF2 $\alpha$  when removing the implant in order to reduce the serum concentration of progesterone due to its luteolytic activity (6).

Co-Synch is another synchronization program. Cows receive a second GnRH injection at the same time they are inseminated. The Cosynch-5 + IVD protocol suggested by Bridges et al (13), is created based on this, and is considered a strategy for avoiding estrogens and negative impacts on public health. With this protocol, pregnancy percentages higher than 50% can be obtained (13). Cosynch-5 + IVD reduces the time the dominant follicle is under the influence of the circulating progesterone, which could stimulate follicular steroidogenesis, and, henceforth, increase AI pregnancy. Younger follicles have a greater steroidogenic capacity than older follicles. This system also allows a longer proestrus. For example, Bridges et al (13) employed a short system (P4 for 5 days), a 12 hour luteolytic increase (PGF2 treatment and P4 elimination), and the rate of pregnancy by insemination increased 15% when compared to a more extensive system (P4 for 7 days).

Knowledge on follicular dynamics has enabled the development of FTAI programs and contributed to genetic improvement and productive and reproductive efficiency in bovine production systems. However, results in pregnancy rates of Zebu cattle present differences which range from 21% to 55% (7, 14, 15), depending on factors

También se utiliza la combinación de progesterona por 7 a 8 días como implante en la oreja o dispositivo intravaginal (DIV) y la aplicación de estradiol junto con la progesterona para iniciar el desarrollo de una onda folicular y al final del protocolo para inducir la ovulación (6). Este protocolo es el más utilizado en sistemas de producción de cría en América Latina (7,8) y permite inseminar de manera simultánea un grupo de hembras sin necesidad de detectar el celo entre las 52 a 56 h después de retirar el DIV.

En general los protocolos de IATF más usados en hembras Cebú se basan en la aplicación al inicio del proceso (día 0) de un DIV y benzoato de estradiol (BE), y al final (día 7 u 8), la aplicación de PGF2 $\alpha$  y un estrógeno como el cipionato (CPE) o el valerato (VE) para sincronizar la ovulación (9). Adicional a esto, se ha incorporado al sistema la aplicación de gonadotropina coriónica equina (eCG) para mejorar el crecimiento de los folículos en vacas en posparto (7,10).

El metabolismo de la progesterona entre animales *Bos indicus* y *Bos taurus* es diferente, debido, posiblemente, a la menor tasa en el metabolismo hepático que presentan las hembras *Bos indicus*, las cuales mantienen mayores concentraciones séricas de progesterona durante los protocolos IATF, situación que podría comprometer los procesos de la ovulación (11). Por lo tanto es posible que las hembras bovinas cebú necesiten empezar a reducir las concentraciones de progesterona exógena y la del cuerpo lúteo presente, con anterioridad al retiro del implante. La primera estrategia para disminuir estas concentraciones de progesterona en los protocolos de IATF en las hembras cebú ha consistido en utilizar dispositivos que contengan menor cantidad de progesterona, los cuales buscan disminuir en menor tiempo las concentraciones séricas, lo que puede representar un incremento en las tasas de ovulación y preñez en las hembras bovinas (12). La segunda estrategia es el uso de la PGF2 $\alpha$  al momento de retirar el implante para reducir la concentración sérica de progesterona por su actividad luteolítica (6).

Otro programa de sincronización es el Co-Synch, cuando las vacas son inseminadas al mismo tiempo en que reciben la segunda inyección de GnRH; surgiendo con base a esto el protocolo Cosynch-5 + DIV propuesto por Bridges et al (13), viéndose como una estrategia para no utilizar estrógenos y así evitar impactos negativos sobre la salud pública y obtener con este protocolo porcentajes de preñez superiores al 50 % (13). El Cosynch-5 + DIV disminuye el tiempo que el folículo dominante está bajo la influencia de la progesterona circulante, lo que podría aumentar la esteroidogénesis del folículo y, por lo tanto, la preñez por IA. Los folículos más jóvenes tienen más capacidad esteroidogénica en comparación con los folículos más antiguos. Además, este sistema permite un proestro más largo. Por ejemplo, Bridges et al (13) utilizaron un sistema corto (P4 durante 5 días), un aumento

such as the productive state (16), body condition (10), and age (17). With these factors in mind, optimal protocols should be researched by means of a program of cow reproductive management. The specific temperature, humidity, and nutrition conditions of the grassland ecosystem should be taken into account.

The aim of this study was to compare pregnancy rates with two FTAI protocols. The first protocol is progesterone and estrogen-based and the second is known as Cosynch-5 + IVD and is based on nursing and dry Brahman cows.

## MATERIAL AND METHODS

**Study site.** The study took place from September to November of 2015 in a commercial Brahman cattle ranch in the town of Cabuyaro, Meta, Colombia (latitude 4°19'3.43" north, longitude 72°51'33.80" west), altitude of 164 MASL, average annual relative temperature and humidity of 27°C and 75% respectively and annual precipitation of 2,200 mm.

**Animal selection and management.** 200 cows were submitted to a reproductive evaluation by rectal palpation in the ranch. 60 commercial Brahman cows with normal reproductive organs, body condition ranging from 3 to 3.5 (scale 1 - 5), body weight between 450 and 510 kg and between 2 to 5 births were selected. 30 of the 60 selected cows were nursing (between 90 to 240 days) and 30 were dry (between 240 - 360 days.) Nursing cows and dry cows in anestrus were randomly assigned to two experimental treatments: 30 cows per treatment (15 nursing cows and 15 dry cows per treatment). Calves were separated of the cows, once IVD withdrawal occurred, up to the FTAI and were moved to a distant paddock to avoid visual and auditory observation. The artificial insemination was performed between 5 and 6 pm by a veterinarian doctor trained in AI and commercial semen of a same Nelore bull of proven fertility was used. Pregnancy diagnosis was conducted 45 days after the FTAI by transrectal palpation, having as reference the positive signs of pregnancy: presence of amniotic vesicle and sliding of membranes. Cows were kept in a rotational grazing system in grasslands of the species *Brachiaria decumbens*, *Brachiaria dictyoneura*, and *Brachiaria humidicola* together with water supply and mineralized salt *Ad libitum*.

**Treatments.** Treatment 1 was performed as follows: On Day 0, an intravaginal device (IVD) that promotes slow release containing 0.5 g of natural progesterone and 2 mg of estradiol benzoate, im was inserted; on Day 8, IVD withdrawal was performed and 0.150 mg of PGF2 $\alpha$  was administered intramuscularly, as well as 0.5 mg of estradiol cypionate and 300 UI of eCG; on Day 10, the FTAI was performed between 48 and 50 hours after IVD withdrawal (Figure 1).

en 12 horas entre la luteólisis (PGF2 $\alpha$  tratamiento y eliminación de P4) se logró un incremento de la tasa de preñez por inseminación en 15 puntos porcentuales en comparación con un sistema más largo (P4 Durante 7 días).

Los conocimientos sobre dinámica folicular han permitido desarrollar programas de IATF y contribuir al mejoramiento genético, la eficiencia productiva y reproductiva en los sistemas de producción bovino. Sin embargo los resultados en tasas de preñez en ganado Cebú presentan diferencias que oscilan desde el 21 % hasta un 55 % (7, 14, 15), dependiendo de factores como el estado productivo (16), la condición corporal (10) y la edad (17). Debido a estos factores, se debe investigar en un programa de manejo reproductivo en vacas los protocolos óptimos bajo las condiciones propias de temperatura, humedad y nutrición específicas del ecosistema llanero.

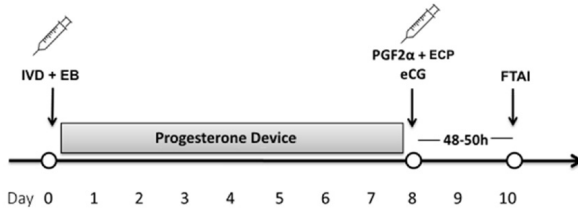
El objetivo de este estudio, fue comparar los porcentajes de preñez con dos protocolos de IATF, el primero basado en progestágenos y estrógenos y el segundo conocido como Cosynch-5 + DIV en vacas Brahman lactantes y secas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Condiciones de estudio.** Se realizó durante los meses de septiembre a noviembre del año 2015, en un predio de ganadería Brahman comercial, en el municipio de Cabuyaro, Meta, Colombia (latitud 4°19 '3.43" norte, longitud 72°51 '33.80" oeste), altitud de 164 msnm, temperatura y humedad relativa media anual de 27°C y 75% respectivamente y precipitación anual de 2200 mm.

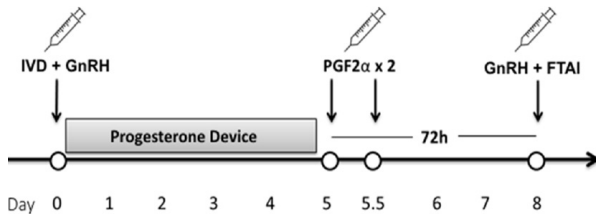
**Selección y manejo de animales.** Se realizó evaluación reproductiva en el predio a 200 vacas mediante palpación rectal y se seleccionaron 60 vacas Brahman comerciales, con órganos reproductivos normales, condición corporal entre 3 y 3.5 (escala 1 - 5), peso corporal entre 450 y 510 Kg y entre 2 y 5 partos. De las 60 vacas seleccionadas, 30 se encontraban lactando (entre 90 y 240 días) y 30 estaban secas (entre 240 - 360 días). Las vacas lactantes y las vacas secas en anestro, se asignaron en forma aleatoria a dos tratamientos experimentales, 30 vacas por tratamiento, 15 vacas lactantes y 15 vacas secas en cada tratamiento. Los terneros se separaron de las vacas, desde el retiro del DIV hasta efectuada la IATF y trasladados a un potrero distante para evitar observación visual y auditiva. La inseminación artificial se realizó en horas de la tarde (5 - 6 pm) por un Médico Veterinario entrenado en IA y se utilizó el semen comercial de un mismo toro de raza nelore de fertilidad probada. El diagnóstico de preñez se determinó a los 45 días posteriores a la IATF por palpación transrectal, teniendo como referencia los signos positivos de preñez:





**Figure 1.** FTAI progesterone and estradiol based protocol. IVD: Intravaginal device with 0.5 of progesterone; EB: Estradiol benzoate; PGF2 $\alpha$ : Prostaglandin F2 $\alpha$  alpha; ECP: Estradiol cypionate; eCG: Equine chorionic gonadotropin; FTAI: Fixed-Time Artificial Insemination.

Treatment 2 was performed as follows: On Day 0, an IVD that promotes slow release containing 0.5 g of natural progesterone and 0.01 mg of GnRH, im was inserted; on Day 5, IVD withdrawal occurred and 0.150 mg of PGF2 $\alpha$ , im were administered twice with an interval of 12 hours. On Day 8, 0.01 mg of GnRH were administered intramuscularly and the FTAI was performed 72 hours after IVD withdrawal (Figure 2).



**Figure 2.** FTAI Cosynch-5 + IVD protocol. IVD: Intravaginal device with 0.5 of progesterone; GnRH: Gonadotropin-releasing hormone; PGF2 $\alpha$ : Prostaglandin F2 $\alpha$  alpha; FTAI: Fixed-Time Artificial Insemination.

**Statistical analysis.** The study corresponded to a clinical experimental design of two random treatments, with factorial arrangement. The treatments corresponded to the two FTAI protocols. The factor was the productive state of the cows: nursing and dry. A comparison of independent proportions was carried out between treatments, by means of a bilateral Z test, between all the pairs of treatments using the software Epidat 4.1. The confidence interval of the proportions was calculated using the Wilson Method recommended by Newcombe and Merino (18).

Sample size was determined with sampling formula for two independent proportions, in clinical trials, with software Epidat 4.1, with a proportion of 1 experimental unit per treatment:

$$n = \frac{(Z_{\alpha} \sqrt{2p(1-p)} + Z_{\beta} \sqrt{p_1(1-p_1) + p_2(1-p_2)})^2}{p_1 - p_2}$$

presencia de vesícula amniótica y deslizamiento de membranas. Las vacas se mantuvieron en un sistema de pastoreo rotacional en praderas de las especies *Brachiaria decumbens*, *Brachiaria dictyoneura* y *Brachiaria humidicola* junto con suministro de agua y sal mineralizada *Ad libitum*.

**Tratamientos.** El tratamiento 1 se realizó de la siguiente manera: El día cero 0, se insertó el dispositivo intravaginal de liberación (DIV) lenta con 0.5 g de progesterona natural y 2 mg de benzoato de estradiol, im; el día 8 se retiró el DIV y se aplicaron 0.150 mg de PGF2 $\alpha$  por vía intramuscular y 0.5 mg de cipionato de estradiol y 300 UI de eCG; el día 10 se realizó la IATF entre las 48 a 50 horas después del retiro del DIV (Figura 1).

El tratamiento 2 consistió en: El día cero (0) se aplicó un DIV de liberación lenta con 0.5 g de progesterona natural y 0.01 mg de GnRH, im; el día 5 se retiró el DIV y se realizaron 2 aplicaciones de 0.150 mg de PGF2 $\alpha$ , im con 12 horas de intervalo entre ellas. El día 8 se aplicó 0.01 mg de GnRH vía i.m y se realizó la IATF a las 72 horas de retirar el DIV (Figura 2).

**Análisis estadístico.** El estudio correspondió a un diseño experimental clínico, de dos tratamientos al azar, con arreglo factorial, donde los tratamientos fueron los dos protocolos para IATF condicionado por el factor el estado productivo de las vacas: lactando y seca. Se efectuó comparación de proporciones independientes, entre tratamientos, mediante prueba de Z bilateral, entre todos los pares de tratamientos con el programa Epidat 4.1. El intervalo de confianza de las proporciones, se calculó siguiendo el Método de Wilson recomendado por Newcombe y Merino (18).

El tamaño de muestra se determinó con la fórmula de muestreo para dos proporciones independientes, en estudios clínicos, con el Software Epidat 4.1, con una razón de 1 unidad experimental por tratamiento:

$$n = \frac{(Z_{\alpha} \sqrt{2p(1-p)} + Z_{\beta} \sqrt{p_1(1-p_1) + p_2(1-p_2)})^2}{p_1 - p_2}$$

Z $\alpha$ : 0.05; Confianza 95%, Valor Z= 1.96

Z $\beta$ : 0.20; Potencia 80%, Valor Z = 0.842

p1: probabilidad de preñez en tratamiento IATF Convencional= 0.10

p2: probabilidad de preñez en tratamiento IATF Cosynch-5 + DIV = 0.42

p:(p1+p2)/2

## RESULTADOS

Las 60 vacas presentaron un (40%; 24/60) de preñez, el porcentaje de preñez para los tratamientos 1 y 2 fueron del 33.3% (10/30) y 46.7% (14/30), respectivamente. Los porcentajes de preñez para el

$Z_{\alpha}$ : 0.05; Confidence 95%, Z-value = 1.96  
 $Z_{\beta}$ : 0.20; Power 80%, Z-value=0.842  
 p1: pregnancy probability in Conventional IATF treatment= 0.10  
 p2: pregnancy probability in IATF Cosynch-5 treatment + DIV = 0.42  
 $p:(p1+p2)/2$

## RESULTS

The 60 cows showed 40% (24/60) pregnancy rate. Pregnancy rate for treatments 1 and 2 was 33.3% (10/30) and 46.7% (14/30), respectively. Pregnancy rate for treatment 1 in nursing and dry cows was 40% and 26.7% ( $p=0.439$ ), respectively. Regarding treatment 2 pregnancy rates for nursing and dry cows were 53.3% and 40.0% ( $p=0.464$ ) (Table 1).

Proportion analysis (Z test) did not show significant differences, between the proportions of Brahman cows pregnant with T1 and T2, nor in the proportions of dry and nursing cows pregnant within each treatment, neither differences for nursing and dry condition among treatments (Table 2).

**Table 1.** Percentage and pregnancy confidence intervals, per FTAI protocol in nursing and dry Brahman cattle.

Treatment and productive state	Pregnancy rate (%)	Pregnancy %, (CI: 95%)		
		Lower limit	Higher limit	
Treatment 1	Nursing cows	40.0	19.8	64.3
	Dry cows	26.7	10.9	52.0
Treatment 2	Nursing cows	53.3	30.1	75.2
	Dry cows	40.0	19.8	64.3
Nursing cows	Treatment 1	40.0	19.8	64.3
	Treatment 2	53.3	30.1	75.2
Dry cows	Treatment 1	26.7	10.9	52.0
	Treatment 2	40.0	19.8	64.3
Nursing and dry cows	Treatment 1	33.3	19.2	51.2
	Treatment 2	46.7	30.2	63.9

T1: FTAI progesterone and estradiol based protocol. T2: FTAI Cosynch 5 + IVD protocol. CI: confidence interval.

tratamiento 1 en vacas lactantes y secas fue de 40% y 26.7% ( $p=0.439$ ), respectivamente. En cuanto al tratamiento 2 los porcentajes de preñez para vacas lactantes y secas fueron de 53.3% y 40.0% ( $p=0.464$ ) (Tabla 1).

Los análisis de proporciones (prueba Z) no demostraron diferencias significativas, entre las proporciones de vacas Brahman preñadas con el T1 y T2, ni en las proporciones de vacas secas y lactando preñadas dentro de cada tratamiento y tampoco diferencias para la condición lactando o seca entre tratamientos (Tabla 2).

**Table 2.** Proportion of cows in postpartum anestrus submitted to two FTAI protocols.

Treatment and productive state		WPREG	WIP	SZ	BS
Treatment 1	Nursing cows	6	9	0.775	0.439
	Dry cows	4	11		
Treatment 2	Nursing cows	8	7	0.732	-0.464
	Dry cows	6	9		
Nursing cows	Treatment 1	6	9	-0.732	-0.464
	Treatment 2	8	7		
Dry cows	Treatment 1	4	11	-0.775	0.439
	Treatment 2	6	9		
Nursing and dry cows	Treatment 1	10	20	-1.054	0.292
	Treatment 2	14	16		

T1: FTAI progesterone and estradiol based protocol. T2: FTAI Cosynch 5 + IVD protocol. Z tests for independent proportions, between pairs of treatments.  
 Wpreg=With pregnancy; Wip= Without pregnancy; SZ= Statistics Z; BS= Bilateral significance

## DISCUSIÓN

Los resultados de los porcentajes de preñez en ganado *Bos indicus* presentan diferencias que oscilan desde el 21% hasta un 55% (7, 15, 19), asociado al estado fisiológico y productivo (11, 14) y la condición corporal (10). En este estudio el protocolo Cosynch-5 + DIV (tratamiento 2) obtuvo un porcentaje de preñez en promedio entre los grupos de vacas lactantes y secas del (46.7%; 14/30) y el porcentaje de preñez promedio del protocolo basado en progestágenos y estradiol (tratamiento 1) fue del (33.3%; 10/30), teniendo en cuenta que estos porcentajes se obtuvieron en una sola inseminación por vaca. A nivel de campo la diferencia del 13.4% entre los dos porcentajes puede ser representativa debido al manejo de costos y tiempo que son aspectos de gran importancia para el sistema de producción bovino.

## DISCUSSION

Results of pregnancy rates of *Bos indicus* show differences that range from 21% to 55% (7,15,19), associated to the physiological and productive state (11,14) and bodily condition (10). In this study, protocol Cosynch-5 + IVD (treatment 2) obtained an average pregnancy rate between groups of nursing and dry cows of 46.7% (14/30). The protocol's average pregnancy rate based on progesterone and estradiol (treatment 1) was 33.3% (10/30), taking into account that these percentages were obtained on a single insemination per cow. At the field level, the difference of 13.4% between the two percentages may be representative due to the management of costs and time which are of great relevance for the bovine production system.

A statistical comparison of pregnancy rates obtained in this study within experimental groups reveals that while no significant difference occurred among them, it is remarkable to see the percentage of 53.3% (8/15) obtained in the treatment 2 was applied to nursing cows. However, pregnancy rates of the present study are found among the factors mentioned by other researchers (20, 21), which indicates that these pregnancy rates are quite varied, especially in IATF programs which range from 33% to 68%.

The pregnancy percentage of 22% (4/15), obtained in the group of dry cows which received treatment 1 is similar to the percentages obtained by Salgado et al (22) of 29.6 and 22.2% when using FTAI protocols based in progesterone and estradiol in cows nursing for less than 110 days and more than 110 days respectively. Pregnancy percentage of 40% (6/15) obtained in the group of nursing cows which received treatment 1 is similar to the percentages obtained by Prada et al (14) of 32.14% and 41.6% when using FTAI estrogen-based and progesterone and estradiol protocols in heifers in the Municipality of Barranca de Upía, which is geographically close to the Municipality of Cabuyaro, Meta.

Besides, treatment 2 is effective in first-calf and multiple-calf cows, also in anestrus and cyclic cows. This protocol proposes FTAI 72 hours after IVD withdrawal to increase bovine fertility, because the ovulatory follicle benefits from further support of gonadotropins and additional time to grow and develop (13). With regard to management, the disadvantage of this protocol is that it requires two PGF2 $\alpha$  injections with an interval of 8 to 12 hours, which are necessary to induce complete regression of the corpus luteum induced by initial GnRH. This is caused by a shorter interval between the first GnRH and luteolysis induction that in standard 7-day Ovsynch protocol (23). A 5-day Cosynch plus a CIDR application with one or two PGF2 $\alpha$  treatments in nursing heifers produced 53 and 59% pregnancy to FTAI, similar to group 4 pregnancy rates (53.3%) in which FTAI Cosynch-5 + IVD was

Al comparar estadísticamente los porcentajes de preñez obtenidos en este estudio dentro de los grupos experimentales y aunque no se presentó una diferencia significativa entre ellos, se destaca el porcentaje del (53.3%; 8/15) obtenido en el tratamiento 2 a vacas lactantes. Sin embargo los porcentajes de preñez del presente estudio se encuentran entre los rangos mencionados por otros investigadores (20, 21) lo que indica que estas tasas de preñez son muy variadas, especialmente en los programas de IATF los cuales están entre los rangos de 33% a 68%.

El porcentaje de gestación (22%; 4/15) obtenido en el grupo de vacas secas que se les aplicó el tratamiento 1, es similar a los porcentajes obtenidos por Salgado et al (22) de 29.6 y 22.2% al trabajar IATF basado en progestágeno y estradiol en vacas con lactancias menores de 110 días y mayores de 110 días respectivamente. El porcentaje de gestación (40%; 6/15) obtenido en el grupo de vacas lactantes al que se les aplicó el tratamiento 1, es similar a los porcentajes obtenidos por Prada et al (14) de 32.14% y 41.6% al trabajar IATF basado en progestágeno y estradiol en novillas en el municipio de Barranca de Upía un municipio muy cercano geográficamente al municipio de Cabuyaro, Meta.

Además, el tratamiento 2 es efectivo en vacas primíparas y múltiparas, también en hembras en anestro y cíclicas. Este protocolo plantea la IATF a las 72 horas posterior al retiro del DIV para aumentar la fertilidad del ganado debido a que el folículo ovulatorio se beneficia por el soporte adicional de gonadotropinas y el tiempo extra para crecer y desarrollarse (13). La desventaja de este protocolo con respecto al manejo es que requiere dos inyecciones de PGF2 $\alpha$  separadas de 8 a 12 horas que son necesarias para inducir la regresión completa del cuerpo lúteo inducido por la GnRH inicial, debido a un intervalo más corto entre la primera GnRH y la inducción de la luteolisis que en el Ovsynch estándar de 7 días, (23) aplicando Cosynch de 5 días más un CIDR con uno o dos tratamientos de PGF2 $\alpha$  en novillas lecheras alcanzaron 53 y 59% de preñez a la IATF, similares al porcentaje de preñez (53.3%) del grupo 4 en el que se aplicó la IATF Cosynch-5 + DIV a vacas lactantes. Otro aspecto favorable de la eficacia del tratamiento 2 versus al tratamiento 1, es empezar a descartar masivamente el uso de protocolos de sincronización que incluyan sales de estradiol, las cuales no se emplean en protocolos en países como Canadá y Estados Unidos por cuestiones de salud pública (24).

El porcentaje de preñez promedio en este estudio del (33.3%; 10/30) al aplicar el tratamiento 1 a vacas lactantes y secas está cercano con los reportados por Díaz et al (25) quienes encontraron porcentajes alrededor del 35% de preñez en hembras bovinas Brahman. También se encuentran similitudes a lo reportado por otros estudios

applied to nursing cows. Another favorable aspect of the efficacy of treatment 2 versus treatment 1 has to do with massively discarding synchronization protocols that include estradiol salts, which are not used in protocols in countries such as Canada and the United States because of public health reasons (24).

Average pregnancy percentage in this study (33.3%; 10/30) when applying treatment 1 to nursing and dry cows is close to the reports of Díaz et al (25) who found percentages around 35% of postpartum ovarian reactivation in Brahman cattle. There are also similarities in comparison to other studies that assessed different protocols and obtained percentages of 31.4%, 33.6% and 35% (26, 27). Fanning et al (28) and Dadarwal et al (29) reported pregnancy percentage of 39.8% and 40.0% which are quite similar to the pregnancy percentage (40%) found in the group of nursing cows which were received treatment 1.

The main advantage of hormonal treatments is postpartum ovarian reactivation, as has been acknowledged by other authors (20, 21). However, it offers low pregnancy percentages when applying FTAI protocols. This biotechnology contributes to improve reproductive and productive parameters of cattle, which strengthens genetic improvement programs. Last, it is necessary to analyze plasmatic progesterone concentrations and other hormones associated to fertility, which are present in different stages of the synchronization protocol. Also, it is necessary to carry out a follow-up of the follicular dynamics and of the diameter of the dominant follicle which may allow to improve pregnancy percentage.

*Bos indicus* cows show a lower metabolic rate to progesterone of *Bos taurus* cows. According to Carvalho et al (9), the fertility of a cow submitted to a FTAI protocol can be affected by keeping exogenous progesterone concentrations, mainly caused by intravaginal devices with a concentration higher than one gram. These concentrations induce a negative feedback on the hypophysis, thus inhibiting LH secretion, which in turn compromises the growth of the dominant follicle. Based on the above information, in the present study intravaginal devices of half a gram were used.

In cows exposed to treatment 1, estrus incidence was grouped between 48 and 52 hours after the extraction of the P4 insert. These results are similar to the protocol in which a P4 insert was used for 8 days (30). In this type of protocol, LH peak is produced around 50 hours after CE administration and ovulation occurs around 72 hours after P4 elimination (30). In cows exposed to treatment 2, estrus incidence was concentrated around 76 hours after the extraction of the P4 insert. This result with Brahman cattle differed from the one reported by Bridges et al (13) who described a high estrus concentration between 48 and 60 hours in Angus cattle.

que evaluaron diferentes protocolos obteniendo porcentajes de 31.4%, 33.6% y 35% (26,27). Fanning et al (28) y Dadarwal et al (29) reportaron porcentajes de preñez de 39.8% y 40.0% que son muy similares al porcentaje de preñez (40%) encontrado en el grupo de vacas lactantes que se les aplicó el tratamiento 1.

Como se ha reconocido por otros autores (20, 21), la principal ventaja de los tratamientos hormonales fue la reactivación ovárica posparto, aunque son bajos porcentajes de preñez al aplicar los protocolos de IATF esta biotecnología contribuye a mejorar parámetros reproductivos y productivos de la ganadería bovina, fortaleciendo programas de mejoramiento genético. Por último se requiere analizar las concentraciones plasmáticas de progesterona y otras hormonas asociadas a fertilidad presentes en diferentes momentos del protocolo de sincronización y efectuar un seguimiento de la dinámica folicular y al diámetro del folículo dominante que puedan permitir mejorar los porcentajes de preñez.

Las hembras *Bos indicus* presentan una tasa metabólica menor a la progesterona que las hembras *Bos taurus*, según Carvalho et al (9) la fertilidad de la hembra bovina sometida a un protocolo de IATF se puede ver afectada por el mantenimiento de las concentraciones de progesterona exógena, ocasionadas principalmente por los dispositivos intravaginales con una concentración mayor a un gramo. Los cuales inducen una retroalimentación negativa sobre la hipófisis, inhibiendo la secreción de LH; razón por la que se ve comprometido el crecimiento del folículo dominante. Basados en esta información en el presente estudio se utilizaron dispositivos intravaginales de medio gramo.

En vacas expuestas al tratamiento 1, la incidencia de estro se agrupó entre 48 y 52 horas después de la extracción del inserto de P4. Estos resultados son similares al protocolo en que utilizaron un inserto de P4 durante 8 días (30). En este tipo de protocolo, el pico de LH se produce aproximadamente a las 50 horas después de la administración de CE y la ovulación ocurre aproximadamente 72 horas después de la eliminación de P4 (30). En vacas expuestas al tratamiento 2, la incidencia de estro estuvo más concentrada cerca de 76 horas después de la extracción del inserto de P4. Este resultado con vacas Brahman no fue similar a lo reportado por Bridges et al (13) quien describió una alta concentración de estro entre 48 y 60 horas en vacas Angus.

A pesar de las diferencias económicas entre tratamientos (\$9 USD para el tratamiento 1 vs \$11 USD para el tratamiento 2) se justifica la aplicación del tratamiento 2 en función de los resultados y la salud pública, los cuales indican que el tratamiento



Despite economic differences between treatments (USD 9 for treatment 1 vs USD 11 for treatment 2), the application of treatment 2 is justified due to the results and for public health reasons, which indicate that the treatment with GnRH was more effective in pregnancy rates both for nursing and dry cows than estradiol-based FTAI.

Last, it can be inferred that FTAI programs should be applied carefully, to avoid false expectations among producers, where the effects of body condition and nursing are taken into account with the aim of achieving better results, thus allowing a better use of artificial insemination.

### Acknowledgements

To the members of the GIRGA research group of the Universidad de los Llanos and to the REMEAT research group of Universidad de la Salle.

### Conflict of interest

The authors declare they do not have any conflict of interest.

con GnRH fue más eficaz en los porcentajes de preñez tanto para vacas lactantes y vacas secas que la IATF basada en estradiol.

Por último se infiere que los programas de IATF deben ser objeto de una aplicación cuidadosa, para no generar falsas expectativas en los productores, en donde los efectos de condición corporal y amamantamiento sean tenidos en cuenta con el objeto de alcanzar mejores resultados, permitiendo así un mejor uso de la inseminación artificial.

### Agradecimientos

A los miembros del grupo de investigación GIRGA de la Universidad de los Llanos y al grupo de investigación REMEAT de la Universidad de la Salle.

### Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

## REFERENCES

- Sartori R, Barros CM. Reproductive cycles in *Bos indicus* cattle. *Anim Reprod Sci* 2011; 124(3):244–250.
- Gimenes LU, Sá Filho MF, Carvalho NA, Torres-Júnior JR, Souza AH, Madureira EH, et al. Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. *Theriogenology* 2008; 69(7):852–858.
- Uribe F, Zuluaga AF, Valencia L, Murgueitio E, Ochoa L. Buenas Prácticas Ganaderas. Proyecto Ganadería Colombiana Sostenible GEF, BANCO MUNDIAL, FEDEGAN, CIPAV, FONDO ACCION, TNC. Bogotá, Colombia 2011; Man (3):82.
- García-Ispuerto I, López-Gatius F. A three-day PGF2 $\alpha$  plus eCG based fixed-time AI protocol improves fertility compared with spontaneous estrus in dairy cows with silent ovulation. *J Reprod Dev* 2013; 59(4):393-397.
- Odde K G. A review of synchronization of estrus in postpartum cattle. *J Anim Sci* 1990; 68(3):817-830.
- Bicalho RC, Galvao KN, Guard CL, Santos JEP. Optimizing the accuracy of detecting a functional corpus luteum in dairy cows. *Theriogenology* 2008; 70(2):199–207.
- Bó GA, Cutaia L, Peres LC, Pincinato D, Maraña D, Baruselli PS. Technologies for fixed-time artificial insemination and their influence on reproductive performance of *Bos indicus* cattle. *Soc Reprod Fertil* 2007; 64(Supl):223–236.
- Figueira PM, Ereno RL, Satrapa RA, Pinheiro PG, Trinca LA, Barros CM. Neither plasma progesterone concentrations nor exogenous eCG affects rates of ovulation or pregnancy in fixed-time artificial insemination (FTAI) protocols for puberal Nellore heifers. *Theriogenology* 2011; 75(1):17-23.
- Carvalho JBP, Carvalho NAT, Reis EL, Nichi M, Souza AH, Baruselli PS. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. *Theriogenology* 2008; 69(2):167-175.
- Sá-Filho MF, Crespilho AM, Santos JEP, Perry GA, Baruselli PS. Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous response influence likelihood of ovulation and pregnancy after estrous synchronization with progesterone or progestin-based protocols in suckled *Bos indicus* cows. *Anim Reprod Sci* 2010; 120(1):23-30.
- Meneghetti M, Sá-Filho OG, Peres RFG, Lamb GC, Vasconcelos JLM. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows I: Basis for development of protocols. *Theriogenology* 2009; 72(2):179-189.

12. Uribe-Velásquez L, Correa-Orozco A, Cuartas-Betancurth L, Villamizar-Ramirez D, Ángel-Botero S. Evaluation of reused norgestomet implants in estrus synchronization protocols in Brahman cows. *Rev MVZ Córdoba* 2013; 18(1):3336-3345.
13. Bridges GA, Helser LA, Grum DE, Mussard ML, Gasser CL, Day ML. Decreasing the interval between GnRH and PGF2 $\alpha$  from 7 to 5 days and lengthening proestrus increases timed-AI pregnancy rates beef cows. *Theriogenology* 2008; 69(7):843-851.
14. Prada JA, Castro JA, Ardila A, Chacón J. Evaluación de un protocolo de inseminación artificial a tiempo fijo con variaciones en los días de aplicada la dosis de prostaglandina en novillas Brahman puras y cruzadas. *Rev Cien Anim* 2013; 6:161-175.
15. Dorneles TR, Ferreira R, Tonello DSJ, Silveira O, Barreta MH, Oliveira JF. The effect of equine chorionic gonadotropin on follicular size, luteal volume, circulating progesterone concentrations, and pregnancy rates in anestrus beef cows treated with a novel fixed-time artificial insemination protocol. *Theriogenology* 2013; 79(8):1204-1209.
16. Meneghetti M, Vasconcelos JML. Calving date, body condition score, and response to a timed artificial insemination protocol in first calving beef cows. *Arq Bras Met Vet Zootec* 2008; 60(4):786-793.
17. Ribeiro ES, Bisinotto RS, Lima FS, Greco LF, Morrison A, Kumar A, et al. Plasma anti-Müllerian hormone in adult dairy cows and associations with fertility. *J dairy sci* 2014; 97(11): 6888-6900.
18. Newcombe R, Merino S. Intervalos de confianza para las estimaciones de proporciones y las diferencias entre ellas. *Interdisciplinaria* 2006; 23(2):141-154.
19. Villa N, Morales C, Granada J, Mesa H, Gomez G, Molina J. Evaluación de cuatro protocolos de sincronización para inseminación a tiempo fijo en vacas *Bos taurus indicus* lactantes. *Rev Cien* 2007; 17(5): 501-507.
20. Pugliesi G, Santos FB, Lopes E, Nogueira É, Maio JRG, Binelli M. Improved fertility in suckled beef cows ovulating large follicles or supplemented with long-acting progesterone after timed-AI. *Theriogenology* 2016; 85(7):1239-1248.
21. Peralta-Torres J, Aké-López J, Centurión-Castro F, Magana-Monforte J. Comparison of estradiol cypionate and estradiol benzoate effects on ovarian activity, estrus and ovulation on anestrus *Bos indicus* cows. *J Anim Vet Adv* 2010; 9(3):466-470.
22. Salgado R, Gonzalez M, Simanca J. Inseminación artificial a tiempo fijo en vacas brahman lactantes. *Rev MVZ Córdoba* 2007; 12(2):1050-1053.
23. Rabaglino MB, Risco CA, Thatcher MJ, Lima F, Santos JEP, Thatcher WW. Use of a five-day progesterone-based timed AI protocol to determine if flunixinmeoglumine improves pregnancy per timed AI in dairy heifers. *Theriogenology* 2010; 73(9):1311-1318.
24. Modric D, Momcilovic WE, Gwin AT, Peter. Hormonal and antimicrobial therapy in theriogenology practice: Currently approved drugs in the USA and possible future directions. *Theriogenology* 2011; 76(3):393-408.
25. Díaz GS, Galina CS, Basurto CH. Efecto de la progesterona natural con o sin la adición de benzoato de estradiol sobre la presentación de celo, ovulación y gestación en animales tipo *Bos indicus* en el trópico mexicano. *Arch Med Vet* 2002; 34(2):283-286.
26. Uribe-Velásquez L, Correa-Orozco A, Cuartas-Betancurth L, Villamizar-Ramirez D, Ángel-Botero S. Evaluation of reused norgestomet implants in estrus synchronization protocols in Brahman cows. *Rev MVZ Córdoba* 2013; 18(1):3336-3345.
27. Pinheiro V, Souza A, Pegorer M, Ereno R, Barros C. Do temporary calf removal (TCR) and/or eCG administration increase pregnancy rates in lactating Nelore cows treated with progesterone release intravaginal device. *Acta Scien Vet* 2005; 33(Supl):280.
28. Fanning M, Lunt D, Sprott L, Forrest D. Reproductive performance of synchronized beef cows as affected by inhibition of suckling with nose tags or temporary calf removal. *Theriogenology* 1995; 44(5):715-723.
29. Dadarwal D, Mapletoft RJ, Adams GP, Pfeifer LF, Creelman C, Singh J. Effect of progesterone concentration and duration of proestrus on fertility in beef cattle after fixed-time artificial insemination. *Theriogenology* 2013; 79(5):859-866.
30. Sales JN, Carvalho JB, Crepaldi GA, Cipriano RS, Jacomini JO, Maio JR, et al. Effects of two estradiol esters (benzoate and cypionate) on the induction of synchronized ovulations in *Bos indicus* cows submitted to a timed artificial insemination protocol. *Theriogenology* 2012; 78(3):510-516.