



*Universidad Nacional de Córdoba  
Facultad de Ciencias Agropecuarias  
Escuela para Graduados*

---



# **SUPEROVULACIÓN EN LA PRIMERA ONDA FOLICULAR**

**Daniel M. Carballo Guerrero**

Tesis  
Para obtener el Grado Académico de  
Magíster en Ciencias Agropecuarias

Universidad Nacional de Córdoba  
Facultad de Ciencias Agropecuarias  
Escuela para Graduados

*Córdoba, 2012*



## **SUPEROVULACIÓN EN LA PRIMERA ONDA FOLICULAR**

**Daniel M. Carballo Guerrero**

### **Comisión Asesora de Tesis**

#### **Director:**

Med. Vet. (M.V.Sc., Ph.D.) Gabriel Bó

\_\_\_\_\_

#### **Asesores:**

Biol. (Dra.) Mariana Caccia

\_\_\_\_\_

Dr. Humberto Tríbulo

\_\_\_\_\_

### **Tribunal Examinador de Tesis**

Biol. (Dra.) Mariana Caccia

\_\_\_\_\_

Med. Vet., MS. Jorge A. Carcedo

\_\_\_\_\_

Dr. Santiago S. Callejas

\_\_\_\_\_

### **Presentación formal académica**

2012

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Universidad Nacional de Córdoba

## **AGRADECIMIENTOS**

A todos los integrantes del Instituto de Reproducción Animal Córdoba (IRAC) por todo lo que me ayudaron en mi formación tanto profesional como personal y por hacerme sentir parte de su institución haciendo con eso que mi estadía en Argentina fuera grata y de enorme provecho.

A mi director de tesis Gabriel A. Bó por todo el apoyo en la realización de mi tesis y hacer que dirigiera mi mirada hacia la constante actualización y al igual que a Ricardo y Humberto Tríbulo por ser en mi una guía personal y grandes maestros en situaciones diarias y de trabajo, por su apoyo en todo momento y por depositar su confianza en mí desde el principio con apenas conocerme.

A Mariana Caccia por ser mi asesora y por toda su ayuda en la redacción de este documento.

A Andrés Tríbulo, por ser mi compañero y amigo en todo momento, ayudándome siempre que lo necesite tanto en la tesis como en situaciones personales.

A Pablo Chesta, Esteban Balla y Lucas Cutaia por todo lo que me enseñaron en temas de reproducción bovina durante mi estadía en Argentina y su ayuda para la realización de esta tesis.

A Paula Tríbulo, Martín Ramos, Gastón Cuestas, Ignacio Reano, José María Oviedo, Jahir Vicente Garzón, Paula Rodríguez, Luis Delgado, Mónica Piccardi, José Silva, y a todos los pasantes del IRAC y todas las personas que en algún momento me ayudaron en los trabajos de mi tesis.

A la Estancia El Mangrullo por prestarme sus animales para la realizar el primer experimento y por su hospitalidad durante el mismo.

Nuevamente al IRAC por prestarme sus animales para realizar los restantes 4 experimentos y por todos los materiales que me proporcionaron durante toda la tesis, tanto de parte de ellos como de parte de Bioniche Animal Health, Canadá.

Al Ministerio de Ciencia y Tecnología de Costa Rica (MICIT) por otorgarme una beca para mi permanencia en Argentina durante casi la totalidad del periodo de mi maestría.

A mis padres, Guido Carballo y Flora Guerrero por darme el apoyo incondicional en todas las situaciones de mi vida y dentro de ellas la realización de mi especialidad y mi maestría, y por ser para mí un ejemplo importante de constante superación y mejoramiento personal.

A mi esposa Fernanda Vasconez León por apoyarme e impulsarme a terminar mi tesis, y por entender y soportar mis retiros repetitivos de casa para la realización de trabajos.

## RESUMEN

El objetivo de la tesis fue desarrollar un protocolo de superovulación durante la primera onda folicular, sin el uso de estradiol. En el primer experimento se comparó la respuesta superovulatoria de vacas tratadas durante la primera onda folicular con vacas superovuladas 4 días después de la aplicación de estrógenos y progesterona. Las vacas del grupo experimental recibieron un dispositivo intravaginal con progesterona por 10 días, aplicando prostaglandina al día de inserción y de retiro, con el fin de formar un folículo persistente. A las 36 h de la remoción del dispositivo se aplicó GnRH y se inicio la superovulación 36 h después. A las vacas del grupo control se les inicio la superovulación 4 días después de la aplicación de progesterona y estradiol. No hubo diferencias significativas en la respuesta superovulatoria. En el segundo experimento se evaluó el efecto de la duración del pretratamiento con dispositivos liberadores de progesterona. Se concluyó que la reducción del pretratamiento no afectó la respuesta superovulatoria. En el tercer experimento se comparó la respuesta superovulatoria de donantes en las cuales el dispositivo liberador de progesterona fue removido o no previo a la inducción de la ovulación con GnRH. No hubo diferencias significativas en el porcentaje de vacas que ovularon después de la primera GnRH y la respuesta superovulatoria entre los grupos fue similar sin diferir significativamente. El experimento 4 tuvo como objetivo evaluar el efecto de la duración del tratamiento superovulatorio, haciendo un grupo con 5 días (10 aplicaciones cada 12h) y otro con 4 días de FSH (8 aplicaciones cada 12h). No hubo diferencias significativas entre los grupos. En el quinto y último experimento se evaluó si era necesaria la administración de prostaglandina previa a la aplicación de GnRH. Además se volvió a comparar la respuesta del tratamiento de primera onda con GnRH con el tratamiento tradicional con estradiol y progesterona. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos. Los resultados obtenidos en los experimentos soportan la hipótesis de que los tratamientos superovulatorios iniciados en la onda folicular desarrollada al momento de la ovulación de un folículo persistente, resultan en una respuesta similar a los iniciados 4 días después de la aplicación de estrógenos y progesterona.

Palabras clave: Superovulación, estradiol, progesterona, GnRH, primera onda folicular.

## **ABSTRACT**

The objective of the thesis was to develop a protocol for superovulation during the first follicular wave, without the use of estradiol. In the first experiment, we compare the superovulatory response in donor cows treated during the first wave of follicular development with that of cows superovulated 4 days after the application of estradiol and progesterone. Cows from the experimental group received an intravaginal progesterone device for 10 days, using prostaglandin at the day of insertion and removal of the device, to form a persistent follicle. GnRH was administered 36 h after device removal and superovulation was initiated at 36 h after GnRH. Cows in the control group received the superovulation 4 days later received progesterone and estradiol. There were no significant differences in superovulatory response. In the second experiment we evaluated the effect of duration of the pretreatment with progesterone releasing devices on the superovulatory response. It was concluded that the duration of pretreatment can be reduced from 10 to 5 days, without affecting the superovulatory response. In the third experiment we compared the superovulatory response of cows in which the progesterone releasing device was removed prior to the GnRH for induction of ovulation. There were no significant differences in the percentage of cows that ovulated after the first GnRH and superovulatory response was similar without significant differences. Experiment 4 evaluated the effect of duration of the superovulatory treatment, comparing the treatment with FSH for 5 days and the treatment with FSH for 4 days. There were no significant differences between the groups. In the fifth and final experiment we evaluated whether it was necessary or not to administer prostaglandin prior to the application of the first GnRH. Furthermore, we compared again the response to treatment during the first wave with the traditional treatment with estradiol and progesterone. There were no significant differences between groups. The results obtained in experiments support the hypothesis that superovulatory treatments started in the first follicular wave developed at the time of ovulation of a persistent follicle, resulted in a similar response to the superovulatory treatment initiated 4 days after application of estradiol and progesterone.

Keywords: Superovulation, estradiol, progesterone, GnRH, first follicular wave.

# TABLA DE CONTENIDOS

	Página
<b>CAPITULO 1</b>	
INTRODUCCIÓN.....	1
Ciclo estral y fisiología reproductiva de la hembra bovina.....	3
Superovulación en el bovino.....	11
Alternativas para mejorar la respuesta superovulatoria .....	21
Alternativas de tratamientos superestimulatorios sin el uso de estrógenos.	23
HIPÓTESIS .....	27
OBJETIVO GENERAL.....	27
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
<b>CAPITULO 2</b>	
MATERIAL Y MÉTODOS.....	28
Animales y tratamientos utilizados .....	28
EXPERIMENTO 1.....	28
EXPERIMENTO 2.....	30
EXPERIMENTO 3.....	32
EXPERIMENTO 4.....	33
EXPERIMENTO 5.....	35
ULTRASONOGRAFIA.....	37
COLECTA Y CLASIFICACION DE LOS EMBRIONES.....	38
ANALISIS ESTADÍSTICO.....	40
<b>CAPITULO 3</b>	
RESULTADOS.....	41
EXPERIMENTO 1.....	41
EXPERIMENTO 2.....	42
EXPERIMENTO 3.....	44
EXPERIMENTO 4.....	46
EXPERIMENTO 5.....	47
<b>CAPITULO 4</b>	
DISCUSIÓN.....	48
<b>CAPITULO 5</b>	
CONCLUSIONES.....	55
<b>CAPITULO 6</b>	
BIBLIOGRAFÍA.....	57

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 3.1.</b> Respuesta superovulatoria y producción de embriones de donantes superestimuladas 4 días después de la aplicación de progesterona y estradiol ó en la primera onda de desarrollo folicular después de la aplicación de GnRH (Medias $\pm$ E.E.).....	41
<b>Tabla 3.2.</b> Efecto de la duración del tratamiento con un dispositivo intravaginal con progesterona (10 vs 5 días) y de la concentración de progesterona en el dispositivo (1,56 g vs 0,78 g) sobre la respuesta ovulatoria a la GnRH (Medias $\pm$ E.E.) .....	42
<b>Tabla 3.3.</b> Respuesta superovulatoria y producción de embriones de donantes superestimuladas 4 días después de la aplicación de progesterona y estradiol ó en la primera onda de desarrollo folicular después de un pretratamiento con un dispositivo con progesterona y la aplicación de GnRH (Medias $\pm$ E.E.) .....	43
<b>Tabla 3.4.</b> Tasa ovulatoria y momento de la ovulación después de un pretratamiento con un dispositivo con progesterona y la aplicación de GnRH. Efecto de la remoción o no remoción del dispositivo 36 h antes de la GnRH (Medias $\pm$ E.E.) .....	44
<b>Tabla 3.5.</b> Respuesta superovulatoria y producción de embriones de donantes superestimuladas en la primera onda de desarrollo folicular después de un pretratamiento con un dispositivo con progesterona y la aplicación de GnRH. Efecto de la remoción o no remoción del dispositivo 36 h antes de la GnRH (Medias $\pm$ E.E.) .....	45
<b>Tabla 3.6.</b> Respuesta superovulatoria y producción de embriones de donantes superestimuladas en la primera onda de desarrollo folicular después de un pretratamiento con un dispositivo con progesterona y la aplicación de GnRH. Efecto del tratamiento con FSH por 4 o 5 días (Medias $\pm$ E.E.) .....	46
<b>Tabla 3.7.</b> Respuesta superovulatoria y producción de embriones de donantes superestimuladas 4 días después de la aplicación de progesterona y estradiol ó en la primera onda de desarrollo folicular después de un pretratamiento con un dispositivo con progesterona y GnRH. Efecto de la administración de una segunda dosis de PGF 5 días después de la inserción del dispositivo con progesterona (equivalente al Día -3 del tratamiento superovulatorio) en las vacas superovuladas en la primera onda (Medias $\pm$ E.E.) .....	47



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 2.1.</b> Esquema de tratamiento del Grupo EB + P4 del Experimento 1..	29
<b>Figura 2.2.</b> Esquema de tratamiento del Grupo Primera Onda – Pretratamiento por 10 d del Experimento 1 .....	29
<b>Figura 2.3.</b> Esquema de tratamiento del Grupo EB + P4 del Experimento 2	30
<b>Figura 2.4.</b> Esquema de tratamiento del Grupo Primera Onda – Pretratamiento por 10 d del Experimento 2 .....	31
<b>Figura 2.5.</b> Esquema de tratamiento del Grupo Primera Onda – Pretratamiento por 5 d del Experimento 2 .....	31
<b>Figura 2.6.</b> Esquema de tratamiento del Grupo Primera Onda – Pretratamiento por 5 d, Cue-Mate con 0,78g de P4 del Experimento 2	32
<b>Figura 2.7.</b> Esquema de tratamiento del Grupo Primera Onda – Pretratamiento por 5 d del Experimento 3 .....	33
<b>Figura 2.8.</b> Esquema de tratamiento del Grupo Primera Onda – Pretratamiento sin remoción del dispositivo del Experimento 3 .....	33
<b>Figura 2.9.</b> Esquema de tratamiento del Grupo Primera Onda – Pretratamiento sin remoción del dispositivo y con FSH por 5 días del Experimento 4 .....	34
<b>Figura 2.10.</b> Esquema de tratamiento del Grupo Primera Onda, Pretratamiento sin remoción del dispositivo y con FSH por 4 días del Experimento 4 .....	35
<b>Figura 2.11.</b> Esquema de tratamiento del Grupo Primera Onda – Pretratamiento sin remoción del dispositivo y con FSH por 4 días del Experimento 5 (abreviado Primera onda con PGF en el Día -3) .....	36
<b>Figura 2.12.</b> Esquema de tratamiento del Grupo Primera Onda - Pretratamiento sin remoción del dispositivo, sin PGF en el Día -3 y con FSH por 4 días del Experimento 5 (nombre abreviado Primera Onda, sin PGF en el Día -3) .....	36
<b>Figura 2.13.</b> Esquema de tratamiento del Grupo EB + P4 del Experimento 5	37
<b>Figura 2.14.</b> Ecógrafo Falco 100, Pie Medical .....	37
<b>Figura 2.15.</b> Imagen ultrasonográfica de un ovario de una vaca ciclando (con CL).....	38

<b>Figura 2.16.</b> Imagen ultrasonográfica de un ovario de una vaca con un folículo preovulatorio .....	38
<b>Figura 2.17.</b> Imagen ultrasonográfica de un ovario de una vaca con folículos pequeños, sin folículo dominante evidente. ....	38
<b>Figura 2.18.</b> Fotos de ovocitos y embriones.....	39
<b>Figura 2.19.</b> Clasificación de embriones en el estadio de Mórula de acuerdo a la integridad de las blastómeras .....	40

## LISTA DE ABREVIATURAS

am.....ante merídiem, después de la medianoche hasta antes del mediodía

ANAVA.....análisis de la varianza

Br.....brahman

bST.....somatotropina bovina

CIDR.....nombre comercial de dispositivo intravaginal con Progesterona de Pfizer

CL.....cuerpo luteo

d.....día

EB.....benzoato de estradiol

eCG.....gonadotropina coriónica equina

E.E.....error estándar

FSH.....hormona folículo estimulante

g.....gramo

GnRH.....hormona liberadora de gonadotropinas

h.....hora

hMG.....gonadotropina menopausica humana

Ho.....holstein

IA.....inseminación artificial

IATF.....inseminación artificial a tiempo fijo

IETS.....sociedad internacional de transferencia de embriones

IGF.....factor del crecimiento relacionado con la insulina

i.m.....intramuscular

LH.....hormona luteinizante

mg.....miligramos

mHZ.....megahercio

mL.....mililitro

mm.....milímetros

mRNA.....RNA mensajero (ácido ribonucleico que contiene la información genética  
procedente del ADN para utilizarse en la síntesis de proteínas)

P.....valor P, valor estadístico calculado

P4.....progesterona

PBS.....tampón fosfato salino

PGF.....prostaglandina

pLH.....hormona Luteinizante porcina

pm.....post merídiem, después del mediodía hasta antes de la medianoche

SPO.....superovulación

UI.....unidades internacional

UNC.....Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

vs.....versus (Contra)

µg.....microgramo

# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN

En los últimos años, el crecimiento de la población mundial ha ido obligando a los productores a ser más eficientes y productivos, al demandar más cantidad y mejor calidad de carne y leche. Esto ha hecho que los sistemas y programas vinculados con el mejoramiento genético ganen peso e interés por parte de científicos y productores.

En la ganadería de las últimas décadas han tomado importancia las biotecnologías que favorecen el avance rápido de los programas de mejoramiento genético, dentro de las cuales se destaca la transferencia de embriones (Bó y Mapletoft, 2003; Thibier, 2006). De acuerdo con Land y Hill (1975) la superovulación y transferencia de embriones aumentan en casi dos veces la tasa de ganancia genética obtenida con respecto a las estrategias de reproducción tradicional en un rebaño. Esto es debido al incremento del potencial de producción de una hembra con genética superior, ya que cuando una vaca es mantenida en condiciones naturales favorables, tiene el potencial de producir una cría por año, con un intervalo entre partos de 12 meses, y con la superovulación, puede multiplicarse mucho más su descendencia por año y producir 25 o más terneros en un año (Bó y Mapletoft, 2003).

Fue a principio de los años 70 que comenzó el gran interés comercial en la transferencia de embriones bovinos. Razas europeas de doble propósito eran importadas a Norte América y por su escasez eran extremadamente valiosas. A raíz de que los criadores querían un método que aumentara el porcentaje reproductivo de sus hembras para una provechosa venta de su descendencia, había mucho incentivo económico para la aplicación de la transferencia de embriones. Como consecuencia, la técnica de transferencia embrionaria en animales domésticos fue desarrollada con dinero de los criadores mas que con fondos para investigación como es tradicional (Bó y Mapletoft, 2009).

En las últimas décadas se han realizado muchos estudios sobre los tratamientos superovulatorios en bovinos y se llegaron a varias conclusiones sobre la respuesta superovulatoria. Una de ellas es que la variabilidad de respuesta individual entre cada

animal es muy grande. En un análisis de 2048 colecciones de donantes bovinas de carne, se obtuvo en promedio 11,5 ovocitos/embriones y 6,2 embriones transferibles por vaca, pero lo más importante es que el 24% de las colecciones no produjeron embriones viables, 64% produjeron menos embriones transferibles que el número promedio y 30% de las colecciones produjeron el 70% de los embriones (Looney, 1986). En otro estudio que incluyó 987 vacas lecheras, se produjo un promedio ligeramente menor, pero la variación entre las respuestas de los distintos animales fue similar (Hahn, 1992). Un análisis más reciente en donde se tomaron datos de 831 colectas realizadas de Mayo del 2008 a Mayo del 2009 en el centro IRAC-BIOGEN, ubicado en la provincia de Córdoba, mostró que el número promedio de embriones transferibles fue de 6,8 y con porcentajes de producción similares a los dos trabajos anteriormente mencionados (Ochoa *et al.*, 2009). Con esto podemos concluir que con los avances en el conocimiento de los últimos años no se ha podido aumentar significativamente el número de embriones transferibles que se producen en promedio por tratamiento superovulatorio. No obstante, sí se han simplificado considerablemente los tratamientos y trabajos, llevando a aplicar la técnica más cómodamente y a gran escala.

El desarrollo de protocolos que controlan la emergencia de la onda folicular (Bó *et al.*, 1995a, 1995b; 2002a) y la ovulación (Baruselli *et al.*, 2006; Bó *et al.*, 2006) han permitido la superovulación de grupos de donantes independientemente del momento del ciclo estral en que se encontraban y la inseminación artificial a tiempo fijo (IATF), y lo más importante, sin comprometer las respuestas superovulatorias. Estos tratamientos han tenido un impacto positivo en la aplicación comercial de programas de transferencias embrionarias, porque han facilitado la programación de los protocolos de trabajo, sin ser dependientes del conocimiento, habilidad o disponibilidad del personal en la detección de celos. Sin lugar a duda, un gran avance en la simplificación de los tratamientos se dio en la década de los 90's, cuando se desarrollaron tratamientos con progestágenos y ésteres de estradiol, que inducen la atresia de todos los folículos y el comienzo de una nueva onda de crecimiento folicular 4 días después (Bó *et al.*, 1994; 1995a; 1995b; 1996). Estos tratamientos son utilizados por muchos profesionales alrededor del mundo (Beal, 1999; Mapletoft *et al.*, 2000; Baruselli *et al.*, 2006; Bó *et al.*, 2006), pero su uso ha sido restringido en países de la Unión Europea desde octubre del 2006 debido a preocupaciones en los efectos que podrían producir los estrógenos en los humanos al ser utilizados en animales que se encuentren en su cadena alimenticia

(Lane *et al.*, 2008). Actualmente ya se han unido otros países a la prohibición del uso de estrógenos como Estados Unidos de Norteamérica y Nueva Zelandia. Esta prohibición de ésteres de estradiol deja a muchos profesionales que realizan transferencia de embriones en un serio dilema, al no poder utilizar el tratamiento que hasta el momento era el más simple con que se contaba. Por lo tanto, es necesario desarrollar tratamientos alternativos que no necesitan el uso de estradiol para sincronizar el desarrollo folicular, con el objetivo de realizar superovulaciones programadas de grupos de donantes, sin importar la etapa del ciclo estral donde se encuentran.

A continuación se mencionarán aspectos teóricos de los procesos de foliculogénesis, dinámica folicular y ondas foliculares que nos permitirán entender como se puede manipular hormonalmente el ciclo estral en relación con los tratamientos superovulatorios. Así mismo, se hará referencia a la superovulación, sus principios, factores que la afectan, tratamientos y por último a la prohibición de los ésteres de estradiol y alternativas para superovulación de donantes de embriones bovinos sin la necesidad del uso del estradiol.

## **CICLO ESTRAL Y FISIOLÓGÍA REPRODUCTIVA DE LA HEMBRA BOVINA**

El ciclo estral se define como el periodo de tiempo comprendido entre la aparición del estro y el comienzo del siguiente. El estro o celo es la manifestación de receptividad sexual, por períodos limitados, por parte de las hembras; estro viene del griego, significa "frenesí o pasión".

La vaca es un animal poliéstrico anual (cicla todo el año) y cada ciclo dura entre 17 y 25 días. El celo dura entre 6 y 18 h y la ovulación se produce aproximadamente 30 h después de comenzado el celo. Subsecuentemente se desarrolla el cuerpo lúteo (CL), aumentando la concentración plasmática de progesterona (P4) entre el día 4 y 12 del ciclo para permanecer constante hasta la luteólisis, que ocurre entre los días 16 a 20.

El perfeccionamiento de técnicas para monitorear la concentración de las hormonas y sus receptores y de la ultrasonografía para evaluar los cambios

morfológicos que ocurren en el ovario en forma dinámica, han permitido un mayor entendimiento del desarrollo folicular en el bovino (Bó *et al.*, 1995b).

### **Foliculogénesis en el ganado bovino**

La foliculogénesis es el proceso por el cual un folículo primordial activado se desarrolla hasta folículo pre-ovulatorio acompañando el crecimiento y la diferenciación del ovocito y de las capas de células de la granulosa que lo rodean (Gougeon, 1996; Senger, 1997; Knight y Glister, 2001). Basados en varias características morfológicas, incluyendo el número de capas de células de la granulosa que rodean al ovocito, las características morfológicas de estas células, el diámetro del ovocito, y la presencia o ausencia del antro lleno de líquido, los folículos son clasificados de varias maneras. Generalmente se denominan primordiales, primarios, secundarios, terciarios o antrales y de Graaf o Pre-ovulatorios (Lussier *et al.*, 1987; Braw-Tal y Yossefi, 1997; Lundy *et al.*, 1999).

El crecimiento folicular se inicia con la transformación de las células planas de la pre-granulosa del folículo primordial en una única capa de células cúbicas de la granulosa (células foliculares), y el folículo pasa a ser denominado folículo primario (Braw-Tal y Yossefi, 1997; Eppig, 2001). La proliferación de células de la granulosa resulta en un aumento de capas alrededor del ovocito; un folículo con 2 a 6 capas de células de la granulosa es llamado folículo secundario, y un folículo con más de 6 capas de células y con un antro lleno de líquido es denominado folículo terciario o antral (Lussier *et al.*, 1987; Braw-Tal y Yossefi, 1997). El diámetro de un folículo primordial es de aproximadamente 0,04 mm y el diámetro del folículo antral más pequeño es 0,25 mm (Lussier *et al.*, 1987). El folículo de Graaf o pre-ovulatorio pasa a ser llamado folículo ovulatorio después del pico pre-ovulatorio de gonadotropinas (Braw-Tal y Yossefi, 1997). En bovinos, los folículos primordiales, primarios, secundarios y terciarios aparecen por primera vez en los días 90, 140, 210 y 250 de gestación, respectivamente (Russe, 1983). El tiempo necesario para que un folículo crezca del estadio pre-antral más grande (folículo secundario) hasta el tamaño de folículo ovulatorio maduro es estimado en cerca de 42 días (Lussier *et al.*, 1987).



## Dinámica Folicular

Antiguamente se tenían dos hipótesis acerca del crecimiento folicular: 1) el crecimiento y regresión folicular es un proceso continuo e independiente de la fase del ciclo reproductivo; o 2) una reserva de folículos permanecen en una fase de reposo y en un momento dado para cada especie, uno o varios de esos folículos comienzan a crecer y alcanzan la maduración durante el estro subsecuente (Rajakoski, 1960). Eso implica que las fases de crecimiento de un folículo son intercaladas con fases estáticas o de reposo. Basado en una evaluación histológica general de los ovarios obtenidos de vacas sacrificadas en días conocidos del ciclo estral, Rajakoski concluyó que ocurrían dos ondas de crecimiento de folículos antrales (>5 mm) durante el ciclo estral. Según Rajakoski la primera onda se iniciaba entre los días día 3 y 4 y la segunda entre los días 12 y 14 del ciclo estral. Los folículos que no ovulan en cada onda regresan y entran en atresia. Después del trabajo de Rajakoski, muchos estudios fueron realizados utilizando básicamente tres abordajes experimentales: 1) conteo de los folículos de ovarios colectados con o sin evaluación histológica u hormonal, 2) marcación individual de folículos con tinta china para posterior identificación, y 3) destrucción de los folículos y estudio de recuperación de crecimiento. Contrariamente a las conclusiones de Rajakoski, resultados de estudios histológicos sustentaron la noción de que el crecimiento folicular es continuo e independiente de las fases del ciclo (Choudary *et al*, 1968; Donaldson y Hansel, 1968; Marion *et al*, 1968). Sin embargo, estudios de marcación y eliminación folicular indicaron que el crecimiento y la sustitución de los folículos más grandes fueron influenciados por el estadio del ciclo; la tasa de renovación fue mayor al final del ciclo y el folículo ovulatorio no fue más grande hasta 3 días antes del estro (Dufour *et al*, 1972; Matton *et al*, 1981). Posteriormente fue propuesta la existencia de tres ondas de crecimiento folicular basados en la presencia de un folículo estrogénicamente activo durante tres periodos del ciclo estral (Ireland y Roche, 1983a; 1983b) y en aumentos de los niveles sanguíneos de estradiol en las venas útero-ovaricas durante aproximadamente los mismos periodos (Ireland *et al*, 1985).

Luego hubo controversias y se rechazó lo descrito por Rajakoski con base al hecho que “las conclusiones fueron basadas en estimaciones cualitativas de los datos sin el actual conocimiento del perfil de las gonadotropinas y esteroides ováricos” (Adams *et al*., 2008). Hay evidencias que sustentan que los folículos son reclutados continuamente

durante todo el ciclo y los folículos destinados a ovular son resultado de una coincidencia de su estado de maduración (disponibilidad) y la ocurrencia del pico de gonadotropina pre-ovulatoria (Adams *et al.*, 2008).

Con la introducción de la ultrasonografía como una nueva herramienta de investigación a fines de los años 80, se clarificó más el proceso dinámico de desarrollo folicular. La técnica de detección y monitoreo de estructuras ováricas por ultrasonografía transrectal fue inicialmente descrita en 1984 (Pierson y Ginther, 1984). Comparando los resultados de ultrasonografía con los de cortes ováricos, la técnica fue validada como herramienta para detección de folículos con diámetro  $>2$  mm y para monitorear cuerpos lúteos (CL) (Pierson y Ginther, 1987a). Estudios subsecuentes que usaron la imagen ultrasonográfica para monitorear poblaciones de folículos en diferentes categorías de tamaños (Pierson y Ginther, 1987b) o para monitorear folículos individualmente identificados (Savio *et al.*, 1988; Sirios y Fortune, 1988; Knopf *et al.*, 1989) demostraron convincentemente que el crecimiento folicular en el bovino ocurre en forma de ondas y que la mayoría de los ciclos estrales en esos animales son formados por 2 o 3 ondas. En decir, durante el ciclo estral de los bovinos, hay un proceso continuo de crecimiento y regresión de los folículos ováricos, conocido como dinámica folicular, el cual es caracterizado por ondas de crecimiento folicular (Adams *et al.*, 2008).

### **Ondas foliculares durante el ciclo estral**

El crecimiento folicular en padrón de ondas ocurre en todos los estadios fisiológicos de la hembra, como en el periodo prepuber, el periodo cíclico propiamente dicho, durante la gestación y en el postparto (Murphy *et al.*, 1990; Savio *et al.*, 1990; Adams *et al.*, 1992a, 1992b; Ginter *et al.*, 1996b). La mayoría de los ciclos estrales en los bovinos ( $>95\%$ ) son de 2 o 3 ondas foliculares (Adams, 1999).

La emergencia de las ondas foliculares en bovinos es caracterizada por el crecimiento de 8 a 41 folículos pequeños, que son inicialmente detectados por ultrasonografía con un diámetro de 3 a 4 mm (Pierson y Ginther 1987a; Savio *et al.*, 1988; Sirios y Fortune, 1988; Ginther *et al.*, 1989a, 1989b). Por aproximadamente dos días, la tasa de crecimiento es similar entre los folículos de la onda, sin embargo un

folículo es seleccionado para continuar creciendo (folículo dominante) mientras que el resto se atresia y regresa (folículos subordinados). La emergencia de la primera onda folicular se da el día de la ovulación, tanto para ciclos de 2 o 3 ondas. La emergencia de la segunda onda ocurre en el noveno o décimo día para los ciclos de 2 ondas, y en el octavo o noveno días en los ciclos de 3 ondas. En los ciclos de 3 ondas, una tercera onda surge en el día 15 o 16 del ciclo. Bajo influencia de P4, el folículo dominante de las ondas anovulatorias sufre atresia (Bergfelt *et al*, 1991). El folículo dominante en el inicio de la luteólisis se vuelve ovulatorio, y la emergencia de la próxima onda se retrasa hasta el día de la ovulación subsecuente. El CL comienza a regresar más temprano en los ciclos de 2 ondas (16° día) que en los ciclos de 3 ondas (19° día), resultando en un ciclo estral más corto en las vacas con ciclos de 2 ondas (20 días) que en vacas de 3 ondas (23 días) (Adams *et al.*, 2008). Por lo tanto, el ciclo estral de 21 días en el bovino existe solamente como una media entre los ciclos de 2 o 3 ondas (Adams *et al.*, 2008).

### **Dinámica de los folículos pequeños**

Mientras que el desarrollo de los folículos mayores o iguales a 1 mm ha sido bien caracterizado, la dinámica de los folículos más pequeños aún no se conoce completamente. Un estudio demostró la unión de FSH con las células de la granulosa de folículos con apenas una capa de células (Richards y Midgley, 1976), pero ha sido discutido que en estos casos pueden no estar asociados al sistema de segundo mensajero de adenil-ciclasa durante la fases iniciales de la foliculogénesis, y por esto puede ser no funcional (Wandji *et al.*, 1992). Sin embargo, el efecto promotor de crecimiento de la FSH en los folículos preantrales y antrales pequeños de bovinos *in vitro* (Itoh *et al.*, 2002) e *in vivo* (Fricke *et al.*, 1997; Tanaka *et al.*, 2001), sugieren un papel de la FSH en el desarrollo de los estadios iniciales de los folículos preantrales y antrales.

Si los folículos pequeños responden a la FSH, es lógico postular que la dinámica del desarrollo de ellos sigue un padrón de onda en respuesta a los picos periódicos de FSH endocrino. Hasta hace muy poco tiempo, la referencia a una onda folicular fue limitada a folículos  $\geq 4$  mm, basados simplemente a la limitación de la resolución de los equipos de ultrasonidos existentes. A nivel microscópico no se habían podido encontrar diferencias entre los estadios medios y finales de folículos antrales  $< 4$  mm y aquellos  $\geq 4$  mm (Lussier *et al.*, 1987; Braw-Tal y Yossefi, 1997). A nivel celular, ambas categorías

de tamaño folicular no solamente expresan receptores de FSH, sino que también tienen un nivel similar de expresión sobre células basales de la granulosa (Bao y Garverick, 1998). La emergencia periódica de los folículos de 4 mm en respuesta a los picos periódicos en la concentración de FSH (Adams *et al.*, 1992a), y a la consistencia en el número de los folículos  $\geq 2$  mm (Singh *et al.*, 2004), o  $\geq 3$  mm (Burns *et al.*, 2005) reclutados en sucesivas ondas indican que los folículos pueden formar parte de ondas desde las primeras fases de desarrollo.

### **Selección de folículo dominante**

La selección del folículo dominante está asociada a la disminución de los niveles de FSH durante los tres primeros días de la onda (Adams *et al.*, 1992a, 1993). Folículos pequeños de la onda emergente ( $< 6$ mm) dependen de concentraciones elevadas de FSH circulante para continuar desenvolviéndose; posterior al pico de FSH, hay una pequeña meseta de folículos que empiezan a regresar entre los 2 a 5 días después de su emergencia. De manera contraria, el folículo que está destinado a ser dominante puede mantener la proliferación celular y la producción de estradiol a pesar de la disminución en la concentración de FSH, una habilidad aparentemente producida por la permanencia de una alta expresión de mRNA de receptores de FSH y de la afinidad de ligación de FSH (Ireland y Roche 1983a, 1983b; Evans y Fortune, 1997; Bao y Garverick, 1998).

El desarrollo del folículo dominante, después de los 8 mm (punto en que la divergencia en la tasa de crecimiento de los 2 folículos más grandes se vuelve evidente) está asociada con una transición de la dependencia de FSH a LH (Ginther *et al.*, 2000a; 2001). Las células de la granulosa del folículo dominante adquieren una habilidad aumentada para unirse a la LH comparada con los folículos subordinados, y tienen una mayor expresión del mRNA de los receptores de LH (Ireland y Roche, 1983b; Evans y Fortune, 1997; Bao y Garverick, 1998; Evans *et al.*, 2004; Mihm *et al.*, 2006). Un pequeño aumento en la expresión del mRNA del receptor de LH fue detectado en las células de la granulosa del folículo de mayor tamaño pocas horas antes del inicio del desvío (divergencia en la tasa de crecimiento de los dos folículos más grandes) (Beg *et al.*, 2001). La expresión del receptor de LH en el folículo dominante aparentemente es una consecuencia del proceso de selección de dominancia. Quizás la expresión

aumentada de receptores de LH sea simplemente un reflejo del mayor crecimiento de un folículo antes de que tal ventaja se torne evidente en las imágenes ultrasonográficas.

Al respecto, la disponibilidad de los nuevos exámenes ultrasonográficos capaces de escanear estructuras de tan solo 1 mm permitió un estudio destinado a caracterizar el patrón de desarrollo de los folículos de 1 a 3 mm en bovinos, y a determinar el estadio en que el futuro folículo dominante llegue primero a un mayor tamaño con respecto a sus vecinos (Jaiswal *et al.*, 2004). Hay resultados que revelan un cambio a lo largo de 2 días en el número de folículos de 1 a 3 mm, con un máximo de 1 o 2 días antes de la emergencia de la onda convencionalmente definida (folículo dominante detectado a las 4 mm), seguido de 3 a 4 días después de la emergencias de la onda, por un máximo en el número de folículos  $\geq 4$  mm. El futuro folículo dominante fue primeramente identificado con un milímetro de diámetro y surgió de 6 a 12 horas antes que el primer folículo subordinado. Además de la detección del folículo dominante de 1 mm (0 h), su diámetro fue de mayor tamaño que el primer y el segundo folículo subordinados a las 24 h y 12 h respectivamente cuando el folículo dominante tenía  $2,4 \pm 0,17$  mm y  $1,7 \pm 0,14$  mm. La tasa de crecimiento del folículo dominante fue mayor que la del 1<sup>er</sup> y 2<sup>do</sup> folículo subordinados después de 120 h y 108 h, respectivamente, cuando el folículo dominante tenía  $9,5 \pm 0,30$  mm y  $8,8 \pm 0,49$  mm. Los autores concluyeron que: 1) los folículos de 1 a 3 mm se desarrollan en forma de onda asociados a los picos en la concentración plasmática de FSH, 2) folículos de 1 a 3 mm son responsables por la elevación transitorias de FSH (o sea, dentro de 6 h), y 3) la selección del folículo dominante es manifiesta antes que lo previamente documentado y es caracterizado por una progresión jerárquica durante un periodo que engloba el pico de FSH.

### **Control hormonal y dinámica folicular**

Los dos ovarios actúan como una unidad única, o sea, cada onda folicular incluye folículos de ambos ovarios, que responden en armonía. En un estudio de la regulación intraovárica entre los folículos y el CL (Ginther *et al.*, 1989c), se concluyó que el folículo dominante suprime los subordinados y la emergencia de la nueva onda a través de un canal sistémico y no a través de un canal local. Las observaciones anteriores son similares a los estudios donde se realizó ovariectomía unilateral. La remoción del ovario con el folículo de mayor tamaño resultó en un aumento del

desarrollo folicular en el ovario restante, y la remoción del ovario sin el folículo de mayor tamaño no resultó con tal efecto compensatorio (Ginther *et al*, 1989a). Aunque los factores intrafoliculares (autocrinos y paracrinos) son importantes para el crecimiento, salud y muerte de un folículo individual, no existe ningún registro convincente *in vivo* de que un folículo sea afectado en cuanto a su salud y regresión o crecimiento directamente por sus vecinos.

La emergencia de una onda folicular y la selección del folículo dominante son temporalmente asociados al aumento y caída en la concentración circulante de FSH (Adams *et al*, 1992a). La emergencia de la onda folicular es precedida por un pico de la concentración plasmática de FSH en ondas espontáneas y ondas inducidas (Adams *et al*, 1992a; Bo *et al*, 1994; Ginther *et al*, 1996). Los picos de FSH que preceden cada onda son similares en magnitud, o sea, los picos en el medio del ciclo son similares en amplitud y frecuencia a el pico pre-ovulatorio de gonadotropinas (Adams *et al*, 1992a). Los productos foliculares, especialmente aquellos de los folículos dominantes, son responsables de suprimir la liberación de FSH y, consecuentemente, la emergencia de la próxima onda folicular. Una relación directa entre el número de folículos que surgen en respuesta al pico de FSH y el subsecuente grado de supresión de FSH muestra que todos los folículos de la nueva onda contribuyen para la supresión (Gibbons *et al*, 1997; Burns *et al*, 2005).

Estradiol e inhibina-A y B son los principales productos foliculares responsables de la supresión de FSH (Sunderland *et al*, 1996; Mihm *et al*, 1997; Bleach *et al*, 2001; Beg *et al*, 2002; Laven y Fauser, 2004). La inhibina-A producida por todos los folículos pequeños en crecimiento de la onda parece ser el supresor más importante de la FSH durante los dos primeros días posteriores a la emergencia de la onda, de ahí en adelante el estradiol secretado por el folículo dominante es el más importante supresor de FSH (Ginther *et al*, 2000b; Mihm y Bleach, 2003). El punto más bajo de FSH es alcanzado 4 días después de la emergencia de la onda y los niveles permanecen bajos por los próximos 2 o 3 días. Al final del periodo de dominancia (o sea, en la ovulación o a la mitad de la fase estática de un folículo dominante anovulatorio), la concentración circulante de FSH comienza a aumentar en los próximos dos días y alcanza el pico cerca de 12 a 24 h antes de la emergencia de la próxima onda folicular, cuando el futuro folículo dominante tiene 4 a 5 mm de diámetro. Si un folículo dominante existente es

removido (o sea, ablación folicular), un pico de FSH comienza a surgir en la próximas 12 h y resulta en la emergencia de una nueva onda folicular dentro de las próximas 24 h. Interesantemente, la FSH solamente aumentó de nuevo cuando la concentración de inhibina-A alcanzó el punto más bajo, a pesar de que el estradiol descendió dos días antes (Bleach *et al*, 2001).

Un factor importante a ser considerado es que el reclutamiento y crecimiento folicular inicial que son controlados por la FSH, ocurren igualmente en los periodos anovulatorios, como durante la fase prepuber, la gestación y en el anestro post-parto. Parece ser que la secreción de FSH puede ser solamente inhibida o disminuida en situaciones de desnutrición muy severa (Wiltbank *et al.*, 2002), pero todavía se deben hacer experimentos cuyo objetivo principal sea estudiar el efecto de la desnutrición severa sobre la FSH para confirmar esto último.

## **SUPEROVULACIÓN EN EL BOVINO**

La superovulación (SPO) es la inducción de ovulaciones múltiples mediante el uso de gonadotropinas exógenas. Esta técnica es uno de los pasos iniciales en el proceso de la producción, colecta y transferencia de embriones *in vivo*.

La transferencia embrionaria ha sido mencionada desde 1890 cuando Walter Heape reportó que una camada de conejos había nacido en su laboratorio como resultado de un trasplante de embriones. Si bien durante los años 30 y 40 se investigó bastante sobre la colección y trasplante de embriones bovinos, recién en 1951 nació el primer ternero como consecuencia de la transferencia de un embrión en Wisconsin. El interés en la transferencia embrionaria fue aumentando desde 1950 y ya para 1977 había cerca de 1000 publicaciones sobre transferencia embrionaria, muchas de ellas en bovinos. Pero fue en la década de los 90 cuando la técnica empezó a difundirse y adoptarse tanto por los profesionales como por los productores (Bó y Mapletoft, 2009).

## **FACTORES QUE AFECTAN LA RESPUESTA SUPEROVULATORIA EN EL BOVINO**

En el bovino la respuesta superovulatoria puede verse afectada por diversos factores. Sin embargo se ha visto que la causa más importante es la variación individual, como se puede ver en los datos presentados por Looney (1986) y Hahn (1992) ya mencionados. A continuación se van a discutir brevemente algunos de los factores que afectan la respuesta superovulatoria.

### **Época del año**

En un estudio de Hasler *et al.* (1983), se evaluaron la cantidad de embriones recuperados de donantes Holstein durante seis años y no se reportó que hubiera efecto sobre el número de estructuras recuperadas ni por el año, ni por la estación (Invierno n=178, 11,2; Primavera n=171, 11,1; Verano n=187, 9,2; Otoño n=130, 9,4). Sin embargo en otro trabajo más reciente donde se analizaron datos de manera retrospectiva para comparar la influencia de la estación en la producción de embriones en razas de carne del centro IRAC-BIOGEN en Córdoba, Argentina, se encontró que bajo sus condiciones de trabajo las estaciones de invierno y primavera fueron las más favorables para producir un mayor número de embriones transferibles (Ochoa *et al.*, 2009).

Como podemos ver, entre los dos estudios anteriores transcurrieron muchos años y fueron realizados en zonas climáticas diferentes. Una de las diferencias importantes entre los trabajos es que los datos de Hasler *et al.* (1983) fueron obtenidos de superovulaciones comenzadas después de la detección del celo, con lo que había mayor variabilidad en el número de estructuras colectadas entre las donantes. En el análisis retrospectivo de Ochoa *et al.* (2009) las superovulaciones se realizaron sobre una onda folicular sincronizada, lo que reduce esa variabilidad entre tratamientos. Otra diferencia puede ser debido a que la temperatura y humedad son mayores en el verano en Córdoba que en el verano del norte de Estados Unidos, produciendo un mayor estrés calórico en las vacas del centro de Córdoba que en Pennsylvania.



## Semen utilizado y momento de inseminación

El semen tiene un efecto muy importante sobre el número de embriones obtenidos. Si en una colecta se recuperan solamente ovocitos o embriones de mala calidad, una de las causas de esto podría ser la calidad del semen. En un estudio realizado por Chenoweth (2007) el porcentaje de embriones categorizados como excelente se vio afectado por la calidad seminal con que se inseminaron las donantes (semen excelente = 61,2% de embriones excelentes; semen bueno = 55,7% embriones excelentes; semen regular = 53,7% embriones excelentes y semen malo = 33,7% excelentes del total de embriones recuperados). Otro de los factores a considerar es el momento de la inseminación. En un estudio en vacas Holstein realizado por Dalton *et al.* (2000), se obtuvo una mayor tasa de fertilización cuando se inseminó 24 h después de iniciado el celo, comparado con inseminaciones más tempranas (IA 0h, 29%; IA 12h, 60% e IA 24h, 81% de tasa de fertilización). Esto se debe a que en las vacas superovuladas, el intervalo desde la administración de PGF hasta el pico de LH varía en un rango de 38 a 42 h (Greve *et al.*, 1983; Callesen *et al.* 1986). En otro estudio realizado por Chesta *et al.* (2003), en el que se evaluó la distribución de las ovulaciones y el momento de inseminación, se concluyó que si se consideran como “buenas” a vacas con > 4 ovulaciones y “regular” a vacas con ≤ 4 ovulaciones, surgen claras diferencias. Las vacas con “buena” respuesta ovularon antes ( $79,6 \pm 1,8$  h después de la primera PGF) que las vacas con respuesta “regular” ( $90,2 \pm 3,7$  h;  $P=0,023$ ). La conclusión de ese trabajo fue que las vacas con una respuesta “regular” tienen un ovulación 12 h más tarde que las vacas con una respuesta “buena” y que en la mayoría de los casos hay un intervalo de hasta 12 h entre la primera y última ovulación. Esto indica que las IA tradicionalmente realizadas a las 60 y 72 h de la primera PGF serían adecuadas para las vacas con “buena” respuesta superovulatoria, pero tal vez muy anticipadas para las vacas con respuesta “regular”. En otro estudio realizado en Texas (USA), no hubo diferencias significativas en el número de embriones transferibles entre vacas que fueron IA a las 12 y 24 h después de la primera monta detectada con Heat-Watch y las que fueron tratadas con 12.5 mg de pLH (Lutropin-V) 24 h después de la remoción de dispositivo con P4 e IA a tiempo fijo 12 y 24 h después (Larkin *et al.*, 2006). La gran ventaja de la IATF es que se pueden programar los trabajos a horas pre-establecidas y no depender del momento en que la vaca es montada para realizar las IA a las 12 y 24 h

después. Además, el esquema de IATF utilizando dispositivos con P4 y GnRH o pLH es mucho más barato que montar un sistema Heat-Watch en el campo.

La utilización de semen sexado también afecta la tasa de fertilización y producción de embriones. En un estudio reciente realizado por Larson, *et al.* (2010) se superovularon 32 donantes de embriones de raza Angus, iniciando la FSH 10 a 13 días después del celo y administrando PGF con las últimas dos aplicaciones de FSH. Se observó el celo y se inseminaron con una dosis de semen en el momento del celo, dos dosis de semen 12 h después del celo y una dosis de semen 24 h después del celo con semen convencional ( $\geq 15 \times 10^6$  espermatozoide/pajuela; convencional) o semen sexado ( $\geq 2.1 \times 10^6$  espermatozoide/pajuela; sexado) de dos toros diferentes. Todas las donantes fueron superovuladas dos veces pasando por los dos grupos de tratamiento (sexado y convencional). El número de embriones grado 1 fue mayor ( $P < 0.01$ ) para el convencional ( $4.3 \pm 0.8$  vs.  $2.3 \pm 0.7$ ) y la cantidad de ovocitos infertilizados fue mayor ( $P < 0.05$ ) para el sexado ( $5.6 \pm 1.0$  vs.  $3.0 \pm 1.2$ ). La conclusión de este trabajo fue que las donantes inseminadas con 4 pajuelas de semen sexado produjeron una menor cantidad se embriones grado 1 comparado con semen convencional. En el 2009 Hayakama *et al.* realizaron una serie de experimentos superovulando donantes Holstein con semen sexado. En el primer experimento superovularon vaquillas Holstein que fueron IA 12 y 24 h después de la detección del celo con semen sexado con  $5 \times 10^6$  espermatozoides/pajuela, o con semen convencional del mismo toro ( $10 \times 10^6$  espermatozoides/pajuela). A pesar que los porcentajes de embriones transferibles (53,4% vs 68,1%) fueron numéricamente menores y los embriones degenerados (24,8% vs 26,6%) y ovocitos infertilizados (21,8% vs 5,3%) mayores con semen sexado que con semen convencional, las diferencias no fueron significativas porque el número de animales por grupo fue muy reducido ( $n=5$ ). En un segundo experimento también se utilizaron vaquillas Holstein y fueron inseminadas todas con semen sexado de igual forma que en el primer experimento con la diferencia de que un grupo fue inseminado con semen sexado fresco ( $n=10$ ) y un segundo grupo con semen sexado congelado y descongelado ( $n=9$ ). Se observó que los rangos de producción de embriones para ambos tratamientos fueron similares a los observados en una colecta comercial en que se utiliza semen convencional. En un tercer experimento se concluyó que la cantidad de

embriones transferibles colectados era más alta en vaquillas que en vacas cuando se utilizó semen sexado en donantes inseminadas dos veces con  $5 \times 10^6$  espermatozoides/pajuela para un total de  $10 \times 10^6$  en ambas inseminaciones. Sa Filho *et al.* (2011) evaluaron el momento de la IA en vaquillas y vacas Nelore y vaquillas Holstein que fueron superovuladas e IATF y encontraron que si se realizan las inseminaciones 6 h después de lo convencional (es decir 18 y 30 h después de la GnRH en lugar de 12 y 24 h después de la GnRH), se mejora la cantidad de embriones transferibles obtenidos con semen sexado. Por los anteriores experimentos los autores concluyeron que el uso de semen sexado quizás sea económicamente viable en programas de superovulaciones comerciales en vaquillas Holstein.

## **Nutrición**

La respuesta superovulatoria y la calidad embrionaria de una donante también puede estar influenciado por el tipo y/o cantidad de dieta suministrada a los animales antes y durante los programas superovulatorios. Hay controversias en la literatura en cuanto al efecto de los niveles energéticos o cantidad de materia seca ingerida en la respuesta a los protocolos superovulatorios. Algunos trabajos detectaron efectos positivos de la alta ingesta de alimentos en la población folicular y números de ovulaciones, otros no detectaron efectos y otros (la mayoría) detectaron un efecto negativo (Sartori *et al.*, 2007). La diferencia fundamental es la condición corporal de las vacas en el momento del suministro de alimento y la superovulación. Cuando las vacas están en pobre condición corporal una mejora en el valor nutritivo de la dieta puede mejorar la respuesta. Sin embargo, si las vacas están en buena condición corporal o son obesas, un aumento del nivel energético de la dieta afecta negativamente el número de folículos presentes cuando se inicia el tratamiento con FSH, la respuesta superovulatoria y la calidad de los embriones (Sartori *et al.*, 2007). Garcia Guerra *et al.* (2007) evaluaron el efecto de la condición corporal en la producción de embriones de donantes Angus en un centro comercial de Argentina y encontraron que las vacas que tenían una condición corporal de 4 y 5 (escala 1 al 5) produjeron una menor cantidad de embriones que vacas que tenían una condición corporal de 2 y 3.

## **Raza**

Muchos profesionales que trabajan en transferencia de embriones sugieren que existe una variabilidad en la respuesta superovulatoria entre vacas *Bos taurus* y *Bos indicus*. Las donantes *Bos indicus* tienen más folículos por onda y son más sensibles a los tratamientos con FSH que las donantes *Bos taurus* (Baruselli *et al.*, 2006). Por esta razón la dosis recomendadas de los productos comerciales con FSH para las donantes *Bos indicus* son prácticamente la mitad que las recomendadas para las *Bos taurus* (Baruselli *et al.*, 2006).

## **Edad y estado de lactancia**

En el estudio de Hasler *et al.* (1983) se reportó que la cantidad de estructuras colectadas, así como los embriones transferibles en vacas jóvenes y vaquillas eran mayores que los de vacas viejas (estructuras colectadas: vaquillas 6,1; vacas 10,3 y vacas de 15 años o más 5,6; embriones transferibles: vaquillas 3,8; vacas 6,6 y vacas de 15 años o más 2,6). Asimismo, en otro trabajo donde se comparó la producción de embriones de vacas de 13 a 16 años con las de sus hijas (de 3 a 6 años), la cantidad de embriones transferibles fue la mitad en las vacas viejas que en las jóvenes (Adams *et al.* 2008).

También se ha reportado que la lactancia puede afectar la producción de embriones en vacas Holstein. En un estudio donde se evaluó la calidad de los embriones obtenidos, se encontró que las vacas Holstein lactantes produjeron un porcentaje menor de embriones de buena calidad comparado con vacas no lactantes o vaquillas (Leroy *et al.*, 2005). Similarmente, Moreira *et al.*, 2002, reportaron un mayor número de embriones transferibles ( $P < 0,04$ ) en vacas no-lactantes ( $8,6 \pm 1,8$ ) que en vacas lactantes ( $4,2 \pm 2,1$ ).

## **Fertilidad de la vaca**

En un estudio de Hasler *et al.* (1983), se analizaron registros de 984 donantes de la raza Holstein. Los registros se dividieron entre dos grupos: vacas con buena fertilidad y vacas con baja fertilidad. Las vacas con buena fertilidad obtuvieron mayor porcentaje

de fertilización de las estructuras colectadas que las vacas con baja fertilidad (66% contra el 42%). De la misma forma produjeron más embriones viables las vacas con buena fertilidad comparadas las de baja fertilidad (6,4 contra 2,4). También se observaron mejores tasas de preñez de los embriones procedentes de vacas de buena fertilidad comparado con los provenientes de las vacas de baja fertilidad (68% vs 58%).

### **Tipo de hormona utilizada**

Existen tres tipos diferentes de hormonas para inducir la superovulación en vacas donantes: la gonadotropina coriónica equina (eCG), la gonadotropina menopáusica humana (hMG) y los extractos de pituitaria que contienen FSH y LH.

La eCG es una glicoproteína compleja con actividad FSH y LH, que tiene una vida media aproximada de 40 h en la vaca pero que persiste más de 10 días en la circulación sanguínea (Murphy y Martinuk, 1991). Por esta razón, normalmente se administra una sola dosis intramuscular (i.m.) seguida por PGF 48 h después. La prolongada vida media de la eCG provoca algunos problemas originados por la permanente estimulación ovárica de los folículos que no ovulan, perfiles endocrinos anormales (altos niveles de estrógeno después de la ovulación) y embriones de mala calidad (Saumande, 1980, Mikel-Jenson *et al.*, 1982; Moor *et al.*, 1984). Estos problemas se contrarrestan en gran medida con la administración de antisuero anti-eCG o anticuerpos monoclonales anti-eCG en el momento de la primera IA (Dielemen *et al.*, 1993; González *et al.*, 1994a; González *et al.*, 1994b). Desafortunadamente los anticuerpos monoclonales anti-eCG han sido retirados del mercado veterinario ya hace unos años.

La hMG se utiliza principalmente en humanos, aunque su uso esta disminuyendo en los países desarrollados porque están siendo reemplazadas por las FSH recombinantes. Actualmente no se la utiliza en veterinaria por su alto costo. Esta hormona tiene la misma cantidad de FSH que de LH y los tratamientos consisten en aplicaciones i.m. cada 12 h en dosis decrecientes por 4 o 5 días (McGowan *et al.*, 1985).

Los extractos de pituitaria de animales domésticos son lo más utilizados. Estos extractos contienen altas cantidades de FSH y cantidades variables de LH, dependiendo

del producto (Murphy et al., 1984, Lindsell *et al.*, 1986,, Bó y Mapletoft, 2003). La vida media de la FSH es de 5 h (Laster, 1972) y por lo tanto se deben administrar cada 12 h por vía i.m. (Bó *et al.*, 1991).

### **Cantidad de actividad de FSH/LH en la gonadotropina utilizada**

A pesar que la foliculogénesis requiere de FSH y LH, los extractos pituitarios contienen diferentes proporciones de FSH y LH que van a afectar la respuesta superovulatoria (Mapletoft *et al.*, 1991). También existe variabilidad en la actividad FSH y LH en la eCG, no sólo entre yeguas preñadas, sino también entre sueros obtenidos de la misma yegua en diferentes momentos de la preñez (Murphy y Martinuk, 1991).

Generalmente se piensa que cierta cantidad de LH es necesaria para lograr superovulación. No obstante se ha sugerido que los elevados niveles de LH durante la superestimulación afectan la calidad de los embriones, debido a una prematura activación del ovocito previo a la ovulación (Moor *et al.*, 1984). Otros trabajos han logrado inducir una muy alta respuesta con FSH bovina recombinante (que no contiene LH), con un porcentaje de fertilización superior al 95% y de embriones viables de más del 85% (Looney *et al.*, 1988; Wilson *et al.*, 1989). Con estos resultados podría interpretarse que la administración de LH, en cualquier dosis, tiene un efecto negativo sobre la calidad de los embriones. Lamentablemente esta FSH recombinante no está más en el mercado veterinario y la FSH recombinante de uso humano es de muy alto costo para ser utilizada en veterinaria.

Dentro de los extractos pituitarios, los que tienen poca LH producirían una mejor respuesta superovulatoria en el bovino (Chupin *et al.*, 1984; Willmott *et al.*, 1990; Tríbulo *et al.*, 1991). Las preparaciones con más cantidad de LH tuvieron efectos altamente adversos sobre la calidad de los embriones cuando se duplicaron las dosis recomendadas por los fabricantes (Mapletoft *et al.*, 1991). Por el contrario, los extractos pituitarios purificados, o sea aquéllos a los que se les ha extraído la LH, tienen un rango mucho más amplio de dosis óptima y al incrementar la dosis ésta no afectó la calidad de los embriones.

## **Vía de administración de las gonadotrofinas**

La vía de administración es otro factor a tener en cuenta. Dentro de los protocolos tradicionales de 2 inyecciones diarias se ha observado que la administración i.m. de los extractos de pituitaria resulta en una respuesta superovulatoria significativamente superior que las inyecciones subcutáneas (Bó *et al.*, 1991). La administración subcutánea de extractos pituitarios produjo niveles circulantes mucho más bajos de FSH, que se mantuvieron por períodos más largos de tiempo.

## **Dosis utilizada de gonadotropinas**

Se han encontrado diferencias en la dosis que se deben utilizar para superovular vacas de distintas razas. Trabajos realizados hace ya unos años indicaron que la dosis de 400 mg NIH-FSH-P1 de Folltropin-V (Bioniche Animal Health, Canadá) era la ideal para vacas *Bos taurus*. En la actualidad esta dosificación es aparentemente la ideal para vacas Holstein en lactancia, pero resultados de trabajos de campo con animales de carne indican que se pueden obtener respuestas satisfactorias con dosis totales de 260 a 320 mg en vacas y de 200 a 260 mg en vaquillonas (Bo y Mapletoft, 2003; Rogan *et al.*, 2010). El ganado *Bos indicus* responde exageradamente a dosis altas de FSH y se han encontrado respuestas satisfactorias con dosis de 133 a 200 mg de Folltropin-V en vacas Nelore (Baruselli *et al.*, 2006) y dosis de 200 a 260 mg en razas sintéticas como el Brangus y Braford (Rogan *et al.*, 2010). Las mismas tendencias y diferencias raciales se han encontrado utilizando otros preparados comerciales como el Pluset (Laboratorios Calier, España) donde se han encontrado respuestas satisfactorias en *Bos indicus* cuando se redujo la dosis de 500 UI a dosis que oscilaron entre 200 y 300 UI (Visintin *et al.*, 1996).

## **Ondas Foliculares y superovulación**

Como ya se mencionó anteriormente, tradicionalmente los protocolos de superovulación eran comenzados en la fase luteal media, aproximadamente entre el día 9 a 11 después del celo (celo = día 0), Esto se debe a que en la mayoría de las vacas comienza la segunda onda folicular en promedio entre el día 9 y 10 del ciclo (Ginther *et al.*, 1989b, Bó y Caccia, 2002b). Sin embargo, trabajos posteriores han demostrado que

la respuesta superovulatoria es mayor cuando los tratamientos con gonadotropinas son iniciados en el momento exacto de la emergencia de la onda folicular, en vez de 1 día antes o 1 a 2 días más tarde (Nasser *et al.*, 1993; Adams, 1994). La presencia de un folículo dominante funcional en el momento del comienzo de la superovulación afecta negativamente la respuesta superovulatoria (Bungarts y Niemann, 1994). Por lo tanto, el tratamiento convencional tiene dos inconvenientes: 1) requiere tener personal entrenado y dedicado a la detección de los celos y una respuesta 100% efectiva a la pre-sincronización de todas las donantes para tener el llamado “celo Base” y 2) desde el punto de vista práctico, es imposible tener a todas las donantes a ser superovuladas al inicio de una onda folicular el día que elegimos comenzar con la aplicación de la gonadotropina.

Otros tratamientos superovulatorios tienen como ventaja que sincronizan el comienzo de una nueva onda folicular en un momento predecible. El tratamiento hasta el momento más utilizado es el que usa progestágenos junto con ésteres de estradiol, con lo cual se induce la atresia de todos los folículos y se inicia una nueva onda folicular aproximadamente 4 días después (Bó *et al.*, 1994; 1995a; 1995b; 1996). Este tratamiento es el más utilizado en todo el mundo en los últimos años, por ser el más práctico y con buenos resultados (Baruselli *et al.*, 2006; Bó *et al.*, 2006).

Como ya se mencionó anteriormente, la sincronía de la ovulación también es uno de los problemas reportados como causa de pobre respuesta superovulatoria. Esto puede solucionarse aplicando inductores de la ovulación como GnRH o LH 24 h después del retiro del dispositivo con P4 en animales *Bos taurus*, y a las 12 h del retiro del dispositivo en vacas *Bos indicus*. La IATF es realizada a las 12 y 24 h de la aplicación de GnRH o LH (Baruselli *et al.*, 2006; Bó *et al.*, 2006;; Chesta *et al.*, 2007). Por lo tanto, los tratamientos que utilizan la combinación de progestágenos junto con estrógenos para sincronizar el desarrollo folicular y GnRH o LH para sincronizar la ovulación son los más fácilmente aplicables a campo, ya que no dependen del momento del ciclo estral en que se encuentren las donantes para el inicio de los tratamientos, ni de la detección de celos para la IA de las donantes, pudiendo programar de una manera cómoda los trabajos.



## **ALTERNATIVAS PARA MEJORAR LA RESPUESTA SUPEROVULATORIA**

Se han reportado varias posibilidades para intentar incrementar la cantidad de embriones viables por tratamiento, entre estas alternativas esta el uso de anticuerpos contra la inhibina, la hormona del crecimiento (bST) y la cantidad de FSH y LH en momentos distintos del tratamiento superestimulador.

### **Inhibina**

Takedomi *et al* (2005) realizaron un estudio para tratar de establecer un protocolo de superovulación mejorado, combinando la vacunación contra inhibina con la aplicación de FSH exógena. Se utilizaron dos grupos, un grupo control (n=12) el cual se le inyectó solamente albumina de suero de conejo y otro grupo de inmunizados contra la inhibina (n=14), este fue tratado con un 1 mg de fragmento de la subunidad alfa de la inhibina porcina en combinación con albumina de suero de conejo por vía subcutánea en 3 a 4 lugares diferentes del animal. Después se administraron otras dos dosis (a los 35 y 70 días de la primera), correspondientes a la mitad de la primera dosis. A todos los animales se les inyectaron 30 mg de FSH porcina. Los resultados obtenidos demostraron que los animales del grupo inhibina generaron anticuerpos contra la inhibina endógena después de la primera dosis y en las dos dosis siguientes estos niveles fueron aumentando. El número de CL y embriones transferibles fue mayor ( $P < 0,05$ ) en el grupo inmunizado contra la inhibina ( $6,2 \pm 1,0$ ) que en el grupo control ( $3,1 \pm 0,7$ ), mostrando además que los grupos de mejor respuesta correspondían a los que tenían los títulos de anticuerpos contra la inhibina por encima del 10%.

### **Somatotropina**

La somatotropina bovina (bST) induce la síntesis y secreción de los factores de crecimiento similares a la insulina (IGF), los cuales juegan un papel importante en el desarrollo folicular. Rieger *et al.* (1991), realizaron un estudio en donantes de raza Holstein donde se superovularon vacas con o sin tratamiento con bST. Al grupo bST se le administró por cada inyección de FSH 20 mg de bST i.m., en 2,0 ml de solución salina (dosis total 160 mg). Los resultados mostraron que ni en el total de embriones colectados, ni en el número de embriones transferibles existieron diferencias

significativas entre los grupos (total de embriones  $7,2 \pm 6,6$  y  $8,3 \pm 5,3$ ; embriones transferibles  $5,2 \pm 4,5$  y  $5,3 \pm 4,0$ ; en los grupos control y bST respectivamente), mientras que la proporción de embriones transferibles fue significativamente mayor en el control ( $76,5\% \pm 26,7\%$ ) que en el grupo bST ( $58,8\% \pm 31,1\%$ ). Moreira *et al.* (2002) decidieron evaluar el efecto de la bST al momento de la inseminación, ya que estudios *in vitro* demostraron que la bST y el IGF-1 contribuyen a un mejor desarrollo embrionario y, por ende, a la calidad de éstos. Los animales fueron divididos en 2 grupos: grupo control y grupo bST (500 mg de bST en una sola dosis). Las vacas fueron inseminadas 12 y 24 horas después de detectado el celo y tratadas con bST con la primera inseminación. No hubo diferencias en el número total de estructuras colectadas ( $9,4 \pm 1,5$  contra  $9,3 \pm 1,4$  de los grupos control y bST respectivamente). El número de ovocitos sin fertilizar se vio reducido ( $P < 0,04$ ) en el grupo bST ( $1,0 \pm 0,9$ ) comparado con el control ( $3,7 \pm 0,9$ ), dando así una diferencia numérica, pero sin llegar a ser significativa, a favor del grupo bST de embriones transferibles ( $7,4 \pm 1,4$ ) comparado con el grupo control ( $4,5 \pm 1,4$ ). A pesar que los trabajos iniciales mostraron un posible efecto benéfico en el uso de bST en vacas superovuladas, una revisión reciente de los trabajos publicados al respecto no encontró evidencias significativas que el tratamiento con bST aumente el número de ovulaciones o embriones transferibles (Lucy, 2012).

### **Cantidad de FSH y LH en momentos distintos del tratamiento superestimulador**

Con estudios más recientes podemos ver que una cantidad mayor de LH al final de la superestimulación podría ser necesaria para producir una mayor respuesta al tratamiento. En un estudio Reano *et al.* (2009) observaron que cuando reemplazaban las últimas dos dosis de Folltropin-V por eCG (200 UI por aplicación) la cantidad colectada de embriones transferibles fue significativamente mayor comparada con el control ( $6,4 \pm 1,1$  vs  $10,7 \pm 1,2$ , para el grupo control y el grupo eCG y respectivamente;  $P = 0,04$ ). En otro estudio realizado por Cifuentes *et al.* (2009) se administró eCG (200 UI por aplicación) junto con las dos últimas dosis de Folltropin-V y también encontró un aumento significativo del número de embriones transferibles ( $4,6 \pm 0,6$  vs  $8,9 \pm 1,0$ , en los grupos control o eCG, respectivamente;  $P < 0,0001$ ).

Con estos estudios recientes (Cifuentes *et al.*, 2009; Reano, *et al.*, 2009), y los vistos anteriormente (Willmott *et al.*, 1990; Mapletoft *et al.*, 1991; Tríbulo *et al.*, 1991;

Chupin et al., 1994) podemos hipotetizar que al inicio del tratamiento superestimulador es conveniente utilizar hormonas con la mínima cantidad de actividad LH, pero que en las etapas finales del tratamiento es necesaria una elevación de esta hormona, cuando los folículos en crecimiento pasan a ser más LH dependientes, pero sin que se llegue a producir la activación del ovocito previo a la ovulación (Moor et al., 1984).

## **ALTERNATIVAS DE TRATAMIENTOS SUPERESTIMULATORIOS SIN EL USO DE ESTRÓGENOS**

Desde octubre del 2006 el uso de estrógenos ha sido restringido en países de la Unión Europea, debido a cuestiones políticas y de presión pública ya que hay preocupaciones de los efectos que pudieran producir los estrógenos en la cadena alimenticia del ser humano (Lane et al., 2008). Estas conclusiones derivan de resultados de estudios realizados en la década del 50 con muy altas dosis de estradiol en ratones, que indicaron que los estrógenos podrían ser cancerígenos. Actualmente otros países como USA y Nueva Zelandia ya se han unido a la restricción del uso de estrógeno, lo cual deja a muchos profesionales que realizan transferencia de embriones en un serio dilema.

Así como se prohibió en dichas regiones se puede llegar a prohibir en todo el mundo en algún momento. Esto lleva a una problemática ya que reduciría considerablemente la posibilidad de superovular vacas en la escala en que se estaba realizando, lo que significaría una disminución de la posibilidad de mejoramiento genético rápido por este medio. Por lo tanto, tenemos la necesidad de buscar protocolos alternativos de superovulación que sean prácticos, efectivos y no requieran el uso de estrógenos.

Una alternativa al uso de estradiol consiste en eliminar, por punción guiada por ultrasonografía, todos los folículos mayores a 4 mm. Con esto la nueva onda folicular se inicia aproximadamente 36 h después (Bergfelt et al., 1994). De esta manera se puede comenzar la superovulación uno o dos días después de la ablación del folículo dominante (Bungarts y Niemann, 1994; Beal, 1999; Kim et al., 2001) o de todos los folículos (Hill y Kuehner, 1996; Bergfelt et al., 1997). El inconveniente que tiene este

método es que hay que contar con un equipo costoso y personal capacitado para realizar dicho trabajo.

Otra alternativa es la utilización de GnRH o LH para la ovulación del folículo dominante (Macmillan y Thatcher, 1991) y así tener el inicio de la nueva onda folicular aproximadamente 2 días después (Pursley *et al.*, 1995). Pero el comienzo de onda es sincronizado solamente cuando el tratamiento resulta en ovulación (Martinez *et al.*, 1999). Colazo *et al.* (2007b) reportaron en un trabajo realizado con vacas de leche en lactancia un promedio de ovulación de 62,4% cuando se trataron con 25 mg de LH porcina (pLH; Lutropin-V, Bioniche Animal Health, Canada) y un 44,3% cuando se trataron con GnRH ( $P < 0,01$ ). Otro estudio mostró un promedio de ovulación de 78% y 56% en vaquillonas tratadas con pLH o GnRH respectivamente (Martinez *et al.*, 1999). La incidencia de ovulación en respuesta a la GnRH o pLH en vacas de carne con cría al pie parecen ser más similares a las vaquillonas que a las vacas de leche en lactancia ,aproximadamente 60% (Colazo *et al.*, 2007a). Por esta razón, los tratamientos con GnRH antes de la superestimulación han resultado en menores respuestas superovulatorias que los tratamientos iniciados luego de la aspiración folicular (Deyo *et al.*, 2001).

Otra alternativa puede ser la regulación negativa de la glándula pituitaria. Se ha demostrado en el bovino que luego de la administración experimental con un agonista de la GnRH, los folículos crecieron hasta 8 mm de diámetro cuando se inhibió la liberación de LH y hasta 4 mm de diámetro cuando se inhibieron tanto la liberación FSH como los pulsos de LH (Gong *et al.*, 1996). D'Occhio *et al.* (1997) encontraron respuestas superovulatorias similares en vacas tratadas con implantes del super-agonista de GnRH deslorelina 7 días antes del inicio de la superestimulación y vacas tratadas con benzoato de estradiol y dispositivos con P4 4 días antes del inicio de la superestimulación. Lamentablemente estos implantes no están disponibles en el mercado.

Otra manera de inhibir la liberación de GnRH puede ser la utilización de una vacuna anti-GnRH (Crowe *et al.*, 1993; Prendiville *et al.*, 1995). Los resultados de su aplicación mostraron que los folículos crecieron hasta 3 mm y que el crecimiento pudo ser reanudado con tratamientos con FSH (Crowe *et al.*, 1993). La tasa de crecimiento

que tuvieron en respuesta a la FSH exógena fue similar a los controles (Crowe *et al.*, 1993). Nuevamente estas vacunas no están por ahora disponibles en el mercado y además una vez que los animales son vacunados existen dudas sobre la posibilidad de preñar a esos animales después del tratamiento.

Un método que también ha sido investigado es iniciar el tratamiento con FSH en el momento de emergencia de la primera onda folicular. La primera onda emerge en el día de la ovulación, o el día posterior del comienzo del estro y no hay diferencias entre los animales de dos o tres ondas foliculares por ciclo estral (Ginther *et al.*, 1989b). Nasser *et al.* (1993) demostraron que la superestimulación puede ser iniciada con éxito en el momento de emergencia de la primera onda folicular y Adams (1994) demostraron que la respuesta superovulatoria no difirió cuando los tratamientos con gonadotropinas fueron iniciados en el momento de la emergencia de la primera o segunda onda folicular. Sin embargo, debe insertarse un dispositivo con P4 en el momento de iniciar los tratamientos para facilitar la regresión luteal (Bó *et al.*, 2007) y para mejorar la calidad del ovocito/embrión (Nasser *et al.* 2011; Rivera *et al.*, 2011). El punto es determinar el momento de la ovulación con ultrasonografía o iniciar los tratamientos un día después de comienzo el estro. Para evitar la necesidad de detectar estro u ovulación, Nasser *et al.* (2011) indujo una ovulación sincrónica en vacas Nelore (*Bos indicus*) con un protocolo iniciado en el Día 0 con la administración de estradiol y CIDR (Pfizer Salud Animal), en el Día 5 colocó PGF; retiró el CIDR el Día 8 seguida por la administración de pLH 24 h después. Los tratamientos superovulatorios fueron iniciados 24 h después de la pLH. No hubo diferencia en el número de embriones transferibles entre este grupo ( $8.0 \pm 1,8$ ) y el control que fue tratado en estradiol y P4 cuatro días antes de la FSH ( $6.6 \pm 2.0$ ), pero ambos tuvieron un mayor número de embriones que si los tratamientos se iniciaban en el momento de emergencia de la primera onda pero sin la reinscripción de un nuevo CIDR durante las aplicaciones de FSH ( $0.2 \pm 0.2$ ;  $P < 0.05$ ).

Para iniciar la superestimulación en el comienzo de una onda folicular se podría también inducir el crecimiento de un folículo persistente utilizando dispositivos con P4 (Savio *et al.*, 1993; Stock y Fortune, 1993) y la administración de una inyección de P4 al final del tratamiento (Anderson y Day, 1994). Este tratamiento resulto en la regresión de un folículo persistente y el desarrollo subsiguiente de una nueva onda folicular en

aproximadamente 3 a 5 días. Sin embargo, en un trabajo en el cual se administró un CIDR usado y una inyección de 150 mg de P4 en el día 13 del ciclo, no hubo alteración en el patrón de la onda folicular (Colazo *et al.*, 2007a). En otro estudio la administración de 300 mg diarios de P4 durante la fase estática de crecimiento del folículo dominante suprimió el crecimiento y acortó la vida media del folículo dominante (Adams *et al.*, 1992b). Pero la emergencia de la próxima onda fue variable en este último caso.

Finalmente otra posibilidad es la inducción de la ovulación del folículo persistente mediante la aplicación de GnRH o pLH. En trabajos realizados en Canadá por Small *et al.* (2009), la administración de GnRH en vacas que habían sido previamente tratadas con un CIDR reutilizado por 7 a 10 días y PGF en el momento de la inserción del CIDR, resultaron en la ovulación del folículo dominante dentro de las 30 h de la administración de GnRH y el comienzo de una onda folicular.

## **HIPÓTESIS**

Los tratamientos superovulatorios iniciados en la primera onda folicular que se desarrolla al momento de la ovulación de un folículo persistente, resultan en una respuesta similar a los iniciados 4 días después de la aplicación de estrógenos y progesterona.

## **OBJETIVO GENERAL**

Desarrollar un protocolo de superovulación de la primera onda folicular, utilizando dispositivos liberadores de progesterona y GnRH, sin el uso de estradiol.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Evaluar el efecto de la sincronización de la primera onda folicular, utilizando un protocolo con dispositivos liberadores de progesterona y GnRH, sobre la respuesta superovulatoria de donantes de embriones (experimento 1).

Evaluar el efecto de la duración del pretratamiento con dispositivos liberadores de progesterona previo a la aplicación de GnRH en la respuesta superovulatoria de donantes de embriones (experimento 2).

Comparar la respuesta superovulatoria de donantes de embriones en las cuales el dispositivo liberador de progesterona fue removido o no previo al tratamiento de inducción de la ovulación con GnRH (experimento 3).

Comparar la respuesta superovulatoria al tratamiento de FSH por cinco días (10 aplicaciones) o por cuatro días (8 aplicaciones) en donantes de embriones superovuladas durante la primera onda folicular inducida con GnRH (experimento 4).

Evaluar el efecto de la aplicación de la segunda PGF durante el pre-tratamiento con dispositivos liberadores de progesterona sobre la respuesta superovulatoria en donantes de embriones (experimento 5).

## CAPITULO 2

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### ANIMALES Y TRATAMIENTOS UTILIZADOS

En los experimentos de esta tesis se utilizaron vacas adultas (menores a 7 años) y vaquillonas (con al menos un 70% de su peso esperado en su estado adulto) de razas para carne, ciclando y con una condición corporal entre 3 y 4 (escala del 1 al 5).

#### EXPERIMENTO 1

Se utilizaron 68 donantes, 29 vacas y 39 vaquillonas, de la raza Bonsmara, del Establecimiento “El Mangrullo” ubicados en la localidad de Lavalle, Santiago del Estero, Argentina. Los tratamientos fueron realizados entre los meses de octubre y diciembre del 2006. Dichas donantes fueron bloqueadas por categoría (vacas y vaquillonas) para asignarles las dosis de hormona superovulatoria y luego fueron distribuidas al azar entre los dos grupos de tratamiento.

#### Tratamiento P4 + EB

Todos los animales recibieron en el Día -4 (Día 0 = inicio de la superovulación) un dispositivo intravaginal liberador de P4 (Cue-Mate, Bioniche Animal Health, Canadá). El Cue-Mate consiste en una estructura en forma de “Y” de plástico rígido y dos capuchones de silicona impregnados con 0,78 g de P4 cada uno. En el mismo momento se les inyectó 2 mg de benzoato de estradiol i.m. (EB, Bioestradiol, Biotay S.A., Argentina) y 50 mg de P4 i.m. (Laboratorio Río de Janeiro, Argentina). El Día 0 se inició el tratamiento superovulatorio con 320 mg (vacas), 260 mg (vaquillonas de 18 meses o más) o 200 mg (vaquillonas de entre 15 y 18 meses) NIH-FSH-P1 de Folltropin-V (Bioniche Animal Health) que fue administrado cada 12 h en dosis decrecientes durante 5 días (10 aplicaciones) (Nasser *et al.*, 2011). Todas las donantes recibieron prostaglandina F2 $\alpha$  (PGF, 150  $\mu$ g D (+) cloprostenol, Bioprost, Biotay S.A.) con las dos últimas aplicaciones de Folltropin-V. El Cue-Mate fue retirado con la última aplicación de Folltropin-V y las donantes recibieron a las 24 h 12,5 mg de pLH



(Lutropin-V, Bioniche Animal Health). Todos los animales fueron IATF 12 y 24 h después. Los embriones fueron colectados por el método no quirúrgico a los 7 días de la pLH y clasificados de acuerdo a las recomendaciones de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS, 2000). El tratamiento esta graficado en la Figura 2.1.

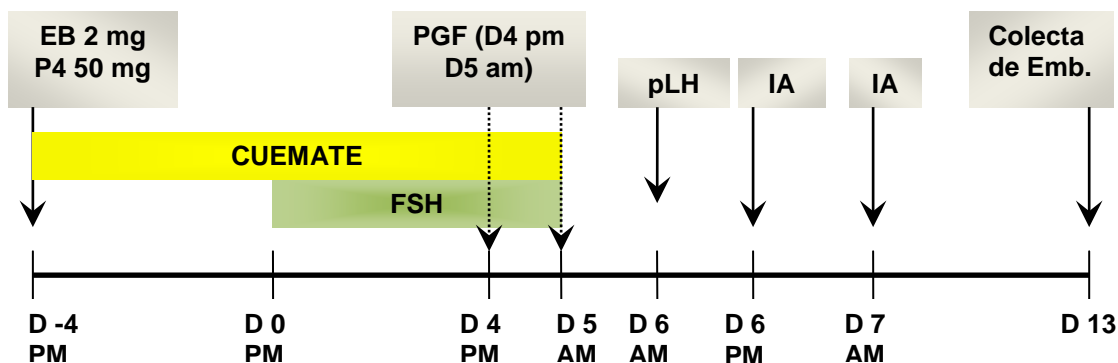


Figura 2.1. Esquema de tratamiento del Grupo EB + P4.

### Tratamiento Primera Onda – Pretratamiento por 10 d

Todos los animales recibieron el Día -13 un Cue-Mate junto con una dosis de PGF. El Día -3 se retiró el dispositivo y los animales recibieron otra dosis de PGF. A las 36 h se les aplicó una dosis de GnRH (50 µg de Lecirelina, Gestran Plus, Arsa S.R.L.) para inducir la ovulación (dentro de las 30 h post-GnRH)(Small *et al* 2009). A las 36 h post-GnRH (Día 0) se introdujo un Cue-Mate nuevo y se inició el tratamiento superovulatorio de la misma manera que en el tratamiento control hasta el momento de la colección de los embriones.

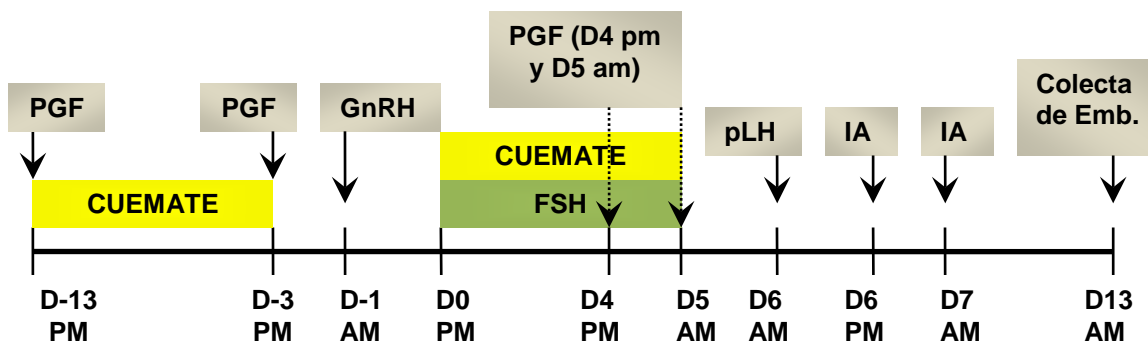


Figura 2.2. Esquema de tratamiento del Grupo Primera Onda – Pretratamiento por 10 d.

## EXPERIMENTO 2

Para este experimento se utilizaron 11 donantes de la raza Brangus, 6 vaquillonas y 5 vacas del Establecimiento IRAC-BIOGEN, ubicadas en la localidad de Villa del Totoral, al norte de la provincia de Córdoba, Argentina. Este experimento se realizó entre los meses de mayo y diciembre del 2007. Las donantes fueron bloqueadas según la categoría para recibir Folltropin-V (320 y 200 mg NIH-FSH-P1 de Folltropin-V vacas y vaquillonas respectivamente) y asignadas a cuatro grupos de tratamientos. Se realizaron cuatro réplicas y todos los animales pasaron por los cuatro tratamientos en un diseño cross-over.

### Tratamiento P4 + EB

Se realizó de la misma manera que el tratamiento del mismo nombre del Experimento 1.

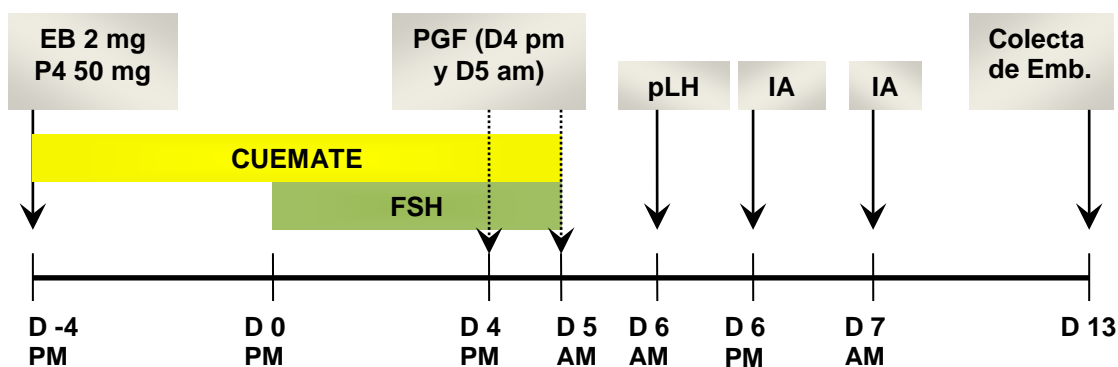


Figura 2.3. Esquema de tratamiento del Grupo EB + P4.

### Tratamiento Primera Onda – Pretratamiento por 10 d

Este tratamiento fue realizado de la misma manera que el tratamiento del mismo nombre del Experimento 1.

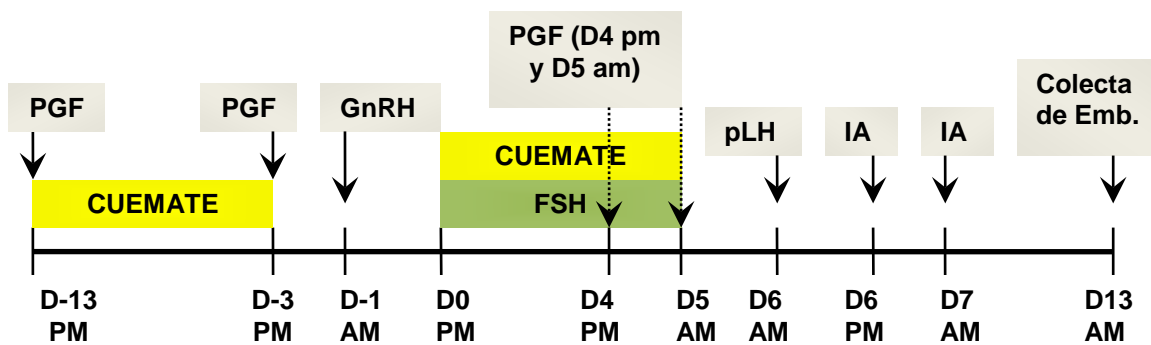


Figura 2.4. Esquema de tratamiento del Grupo Primera Onda – Pretratamiento por 10 d.

### Tratamiento Primera Onda - Pretratamiento por 5 d

En este grupo los animales recibieron el Día -8 un Cue-Mate junto con una dosis de PGF. El Día -3 se retiró el dispositivo y las donantes recibieron otra dosis de PGF, Las siguientes aplicaciones de GnRH, Folltropin-V, la introducción del nuevo Cue-Mate, PGF, pLH, IATF y colecta de embriones fueron realizadas de la misma manera que en el tratamiento Primera Onda – Pretratamiento por 10 d.

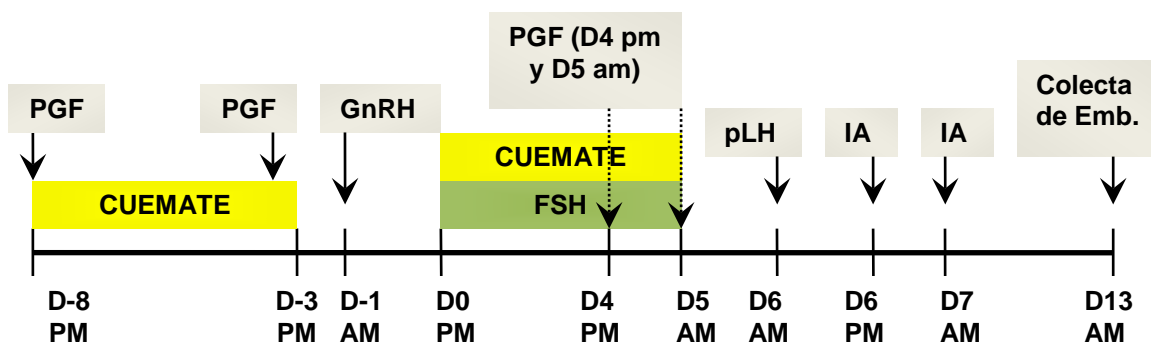


Figura 2.5. Esquema de tratamiento del Grupo Primera Onda – Pretratamiento por 5 d.

### Tratamiento Primera Onda - Pretratamiento por 5 d, Cue-Mate con 0,78g de P4

En este grupo los animales recibieron el mismo Tratamiento Primera Onda – Pretratamiento por 5 d, con la única diferencia de que el Cue-Mate que se introdujo el Día -8 tenía solo uno de los capuchones impregnado con P4 (0,78 g de P4) y el otro

capuchón no contenía P4, conteniendo así el dispositivo intravaginal la mitad de P4 que originalmente posee.

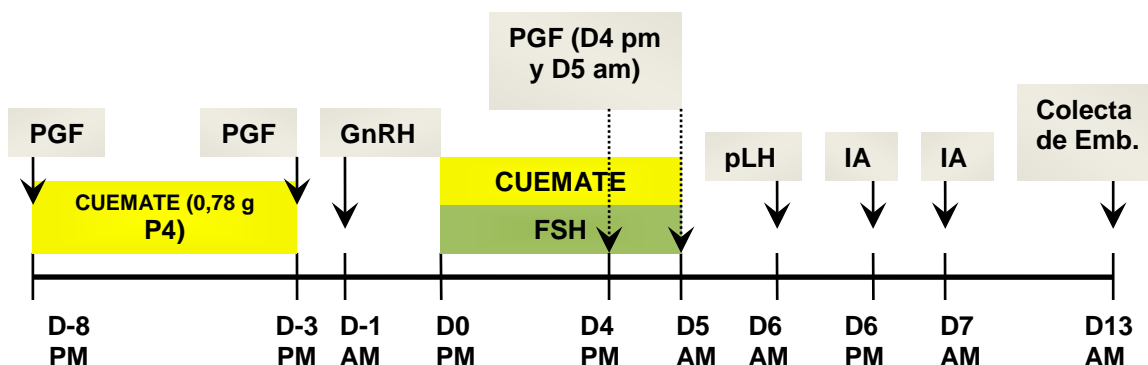


Figura 2.6. Esquema de tratamiento del Grupo Primera Onda – Pretratamiento por 5 d, Cue-Mate con 0,78g de P4.

### EXPERIMENTO 3

Se utilizaron 37 donantes de embriones de la raza Aberdeen Angus, 27 vacas y 10 vaquillonas del Establecimiento IRAC-BIOGEN, ubicados en la localidad de Villa del Totoral, al norte de la provincia de Córdoba, Argentina. Este experimento se realizó entre los meses de octubre del 2007 y febrero del 2008, las donantes fueron bloqueadas de acuerdo a la dosis de Folltropin-V como en el Experimento 2. El experimento tuvo dos réplicas y cada una de las donantes pasó por cada uno de los tratamientos en un diseño cross-over.

#### Tratamiento Primera Onda – Pretratamiento por 5 d

Este tratamiento fue realizado de la misma manera que el tratamiento del mismo nombre del Experimento 2. En este experimento se utilizó el Cue-Mate con los dos capuchones de P4 (1,56 g de P4 totales).

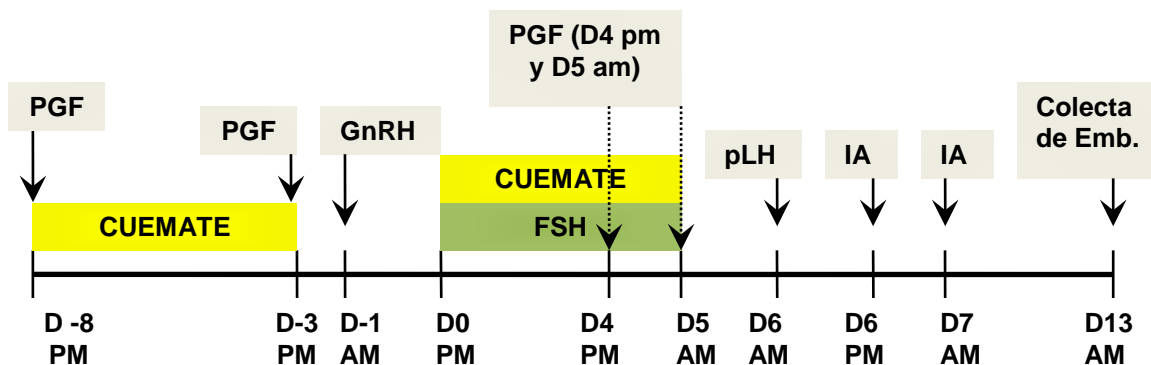


Figura 2.7. Esquema de tratamiento del Grupo Primera Onda – Pretratamiento por 5 d.

### Tratamiento Primera Onda – Pretratamiento sin remoción del dispositivo

En este grupo los animales fueron tratados como el grupo anterior con la diferencia que el Cue-Mate fue mantenido durante todo el protocolo de pretratamiento y superestimulación, sin retirarse en el momento que se realiza la GnRH para inducir la ovulación del folículo persistente.

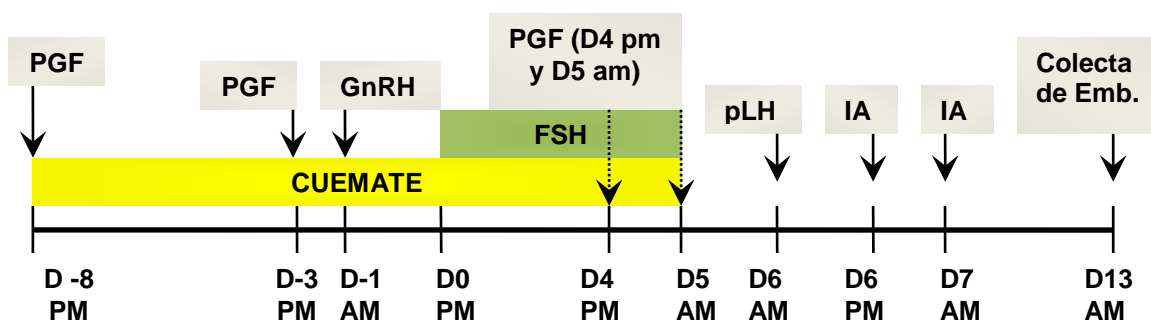


Figura 2.8. Esquema de tratamiento del Grupo Primera Onda – Pretratamiento sin remoción del dispositivo.

## EXPERIMENTO 4

Se utilizaron 24 vacas de razas para carne (18 Simmental y 6 Aberdeen Angus), ubicadas en la localidad de Villa del Totoral, al norte de la provincia de Córdoba, Argentina. Este experimento se realizó entre los meses de octubre, febrero y julio del 2008. En este caso todas las donantes fueron superovuladas con 400 mg NIH-FSH-P1

de Folltropin-V. El experimento tuvo dos réplicas, cada una de las donantes pasó por cada uno de los tratamientos en un diseño cross-over.

### Tratamiento Primera Onda – Pretratamiento sin remoción del dispositivo y con FSH por 5 d

En este grupo los animales fueron tratados de la misma manera que en el tratamiento llamado de la misma manera del Experimento 3. Los tratamientos con 400 mg Folltropin-V por 5 días fueron realizados de la siguiente manera: Día 0 pm y Día 1 am 70 mg, Día 1 pm y Día 2 am 50 mg, Día 2 pm y 3 am 40 mg, Día 3 pm y 4 am 30 mg, Día 5 am 10 mg.

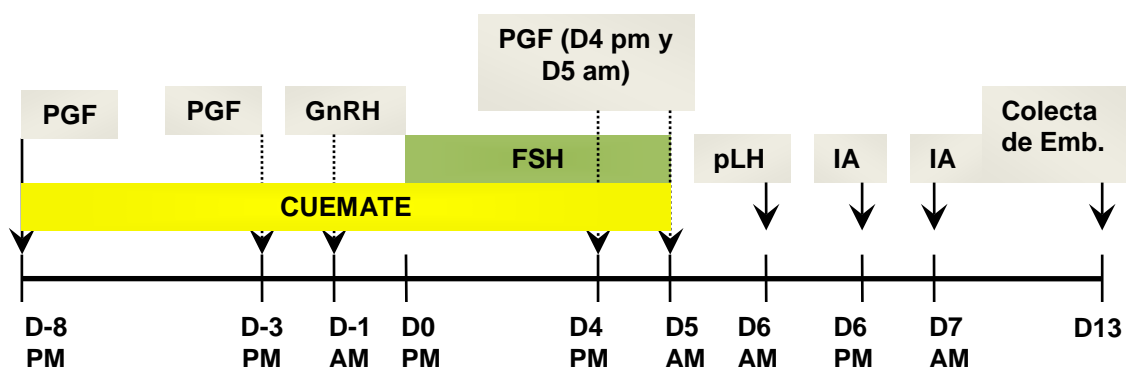


Figura 2.9. Esquema de tratamiento del Grupo Primera Onda - Pretratamiento sin remoción del dispositivo y con FSH por 5 días.

### Tratamiento Primera Onda – Pretratamiento sin remoción del dispositivo y FSH por 4 d

En este grupo los animales recibieron el pretratamiento de la misma manera que el tratamiento anterior. Las donantes recibieron las misma dosis total de Folltropin-V (400 mg) pero fueron divididas en 8 aplicaciones cada 12 h durante 4 días de la siguiente manera: Día 0 pm y Día 1 am 80 mg, Día 1 pm y Día 2 am 60 mg, Día 2 pm y 3 am 40 mg, Día 3 pm y 4 am 20 mg.

Las inyecciones PGF, pLH, IATF y colecta de los embriones fueron realizadas como en el Grupo de FSH por 5 días, con la diferencia que al aplicar solamente 4 días

de FSH todas las siguientes aplicaciones pasaron a ser 24 h antes, durando así un día menos la totalidad del tratamiento como se lo puede ver en la Figura 2.10.

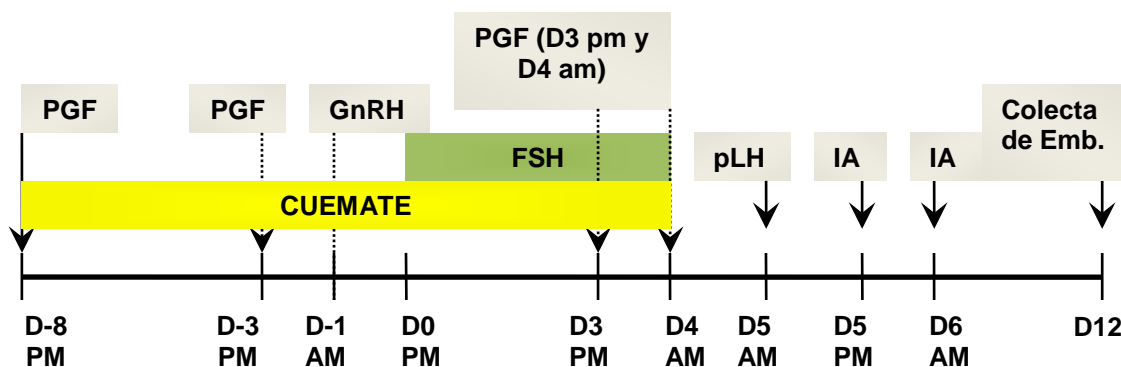


Figura 2.10. Esquema de tratamiento del Grupo Primera Onda, Pretratamiento sin remoción del dispositivo y con FSH por 4 días.

## EXPERIMENTO 5

Se utilizaron 14 vacas de la raza Simmental, ubicadas en el Centro de Investigación y Capacitación IRAC-BIOGEN, ubicado en el paraje de Pozo del Tigre, localidad de General Paz, provincia de Córdoba, Argentina. Este experimento se realizó entre los meses de agosto y noviembre del 2008. En este caso todas las donantes fueron superovuladas con 400 mg NIH-FSH-P1 de Folltropin-V. El experimento tuvo tres réplicas y cada una de las donantes pasó por cada uno de los tratamientos en un diseño cross-over.

### Tratamiento Primera Onda – Pretratamiento sin remoción de dispositivo y FSH por 4 d

En este grupo los animales fueron tratados igual que en el grupo que se utilizó el tratamiento llamado de la misma manera del experimento 4.

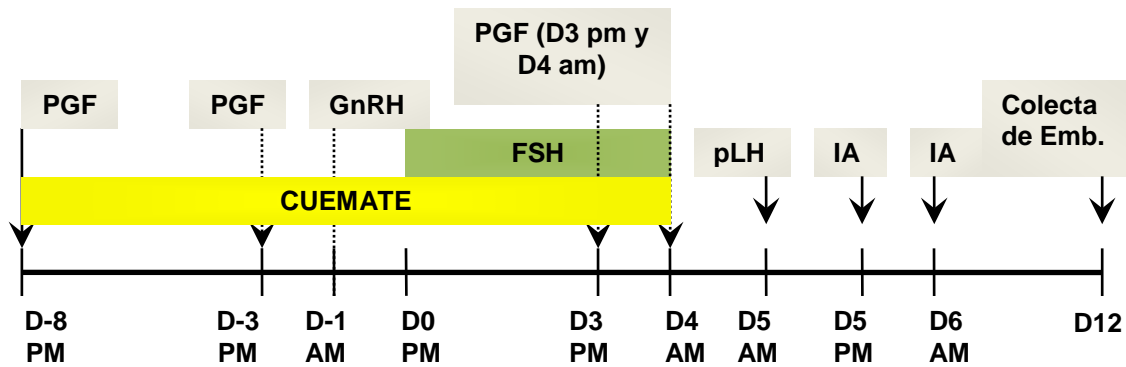


Figura 2.11. Esquema de tratamiento del Grupo Primera Onda - Pretratamiento sin remoción del dispositivo y con FSH por 4 días (nombre abreviado Primera onda con PGF en el Día -3).

**Tratamiento Primera Onda – Pretratamiento sin remoción del dispositivo, sin PGF en el Día -3 y FSH por 4 d**

Este grupo de tratamiento fue similar al grupo anterior con la única diferencia de que no se le aplicó prostaglandina en el Día -3.

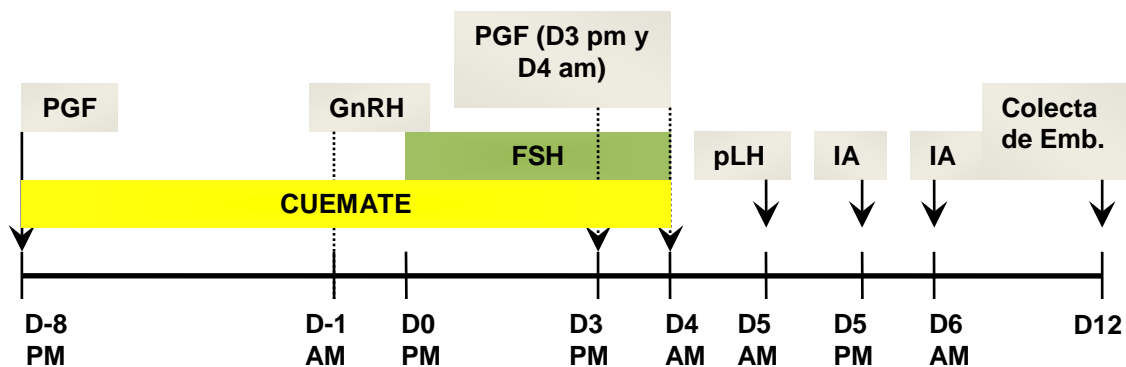


Figura 2.12. Esquema de tratamiento del Grupo Primera Onda - Pretratamiento sin remoción del dispositivo, sin PGF en el Día -3 y con FSH por 4 días (nombre abreviado Primera Onda, sin PGF en el Día -3).

**Tratamiento P4 + EB**

En este grupo los animales fueron tratados igual que en el grupo que se utilizó el tratamiento llamado de la misma manera del experimento 1.



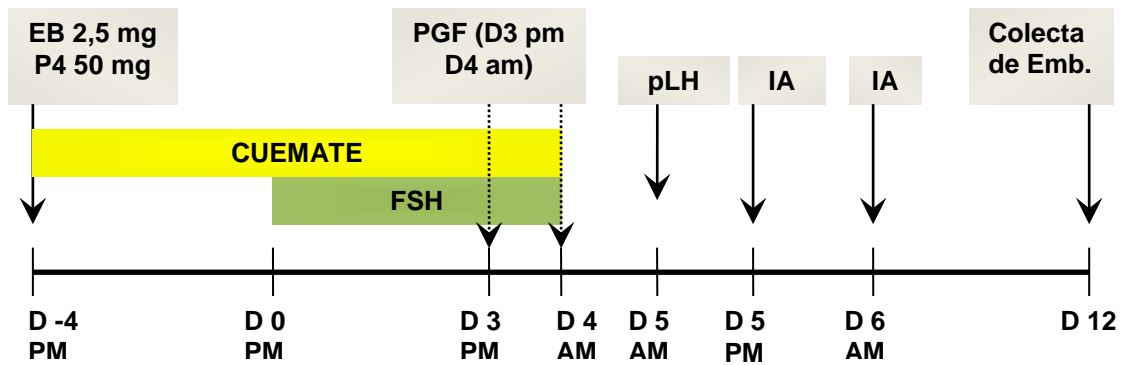


Figura 2.13. Esquema de tratamiento del Grupo EB + P4

## ULTRASONOGRAFÍA

Todas las donantes fueron examinadas por ultrasonografía (Falco 100, con transductor de 8 mHZ, Pie-Medical, Holanda) en el día de comienzo del experimento para determinar la normalidad del tracto reproductivo y ciclicidad (presencia de un CL). Las donantes de los experimentos 2 y 3 fueron además examinadas cada 12 h, desde el momento de la remoción del Cue-Mate en el pretratamiento hasta la tercera aplicación de FSH, para determinar la efectividad de la aplicación de GnRH en la inducción de la ovulación. Se determinó como momento de ovulación cuando se dejó de ver el folículo preovulatorio.



Figura 2.14. Ecógrafo Falco 100, Pie Medical.

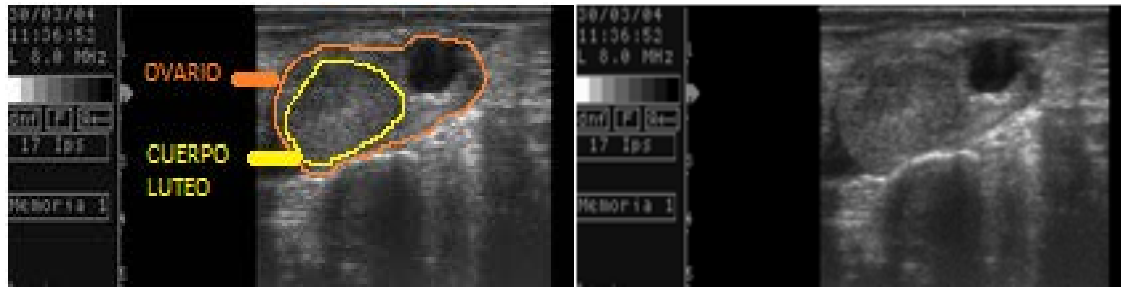


Figura 2.15 Imagen ultrasonografica de un ovario de una vaca ciclando (con CL).

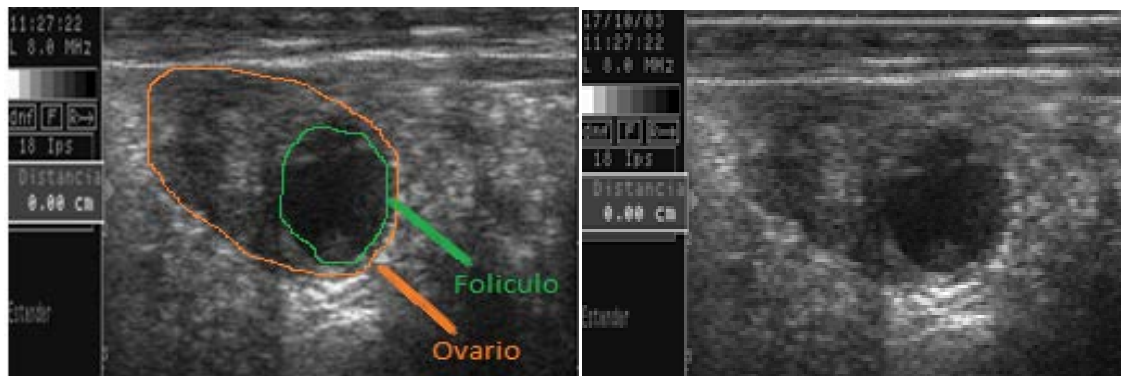


Figura 2.16 Imagen ultrasonografica de un ovario de una vaca con un folículo preovulatorio.

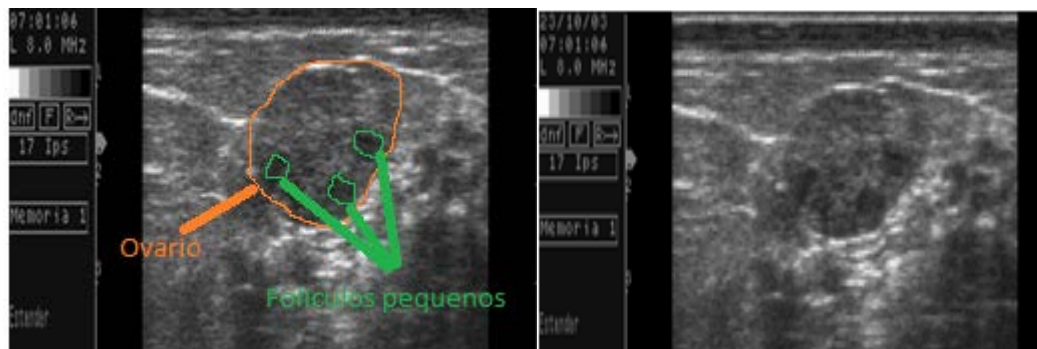


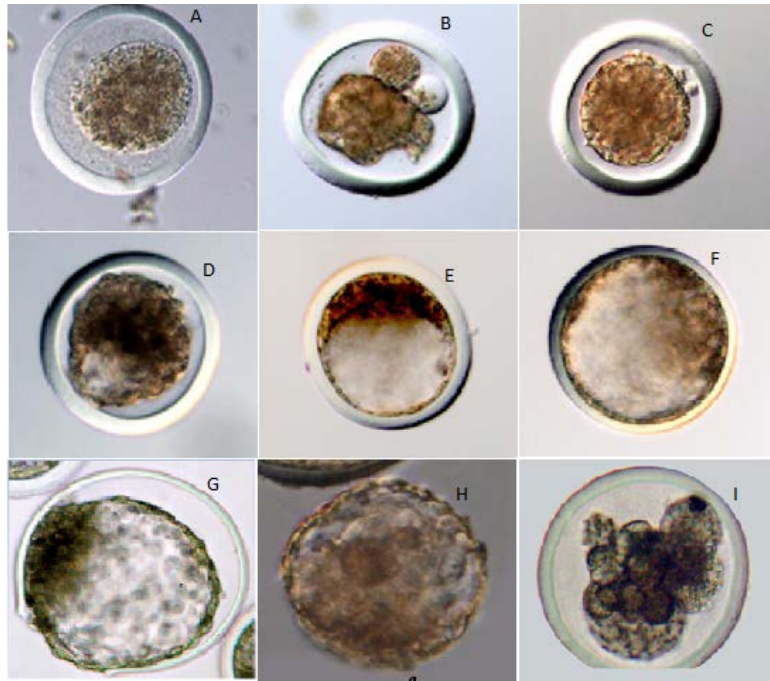
Figura 2.17. Imagen ultrasonografica de un ovario de una vaca con folículos pequeños, sin folículo dominante evidente.

## COLECTA Y CLASIFICACIÓN DE LOS EMBRIONES

Los embriones fueron colectados a los 7 días de la pLH por medio de la técnica no quirúrgica. Se lavaron los cuernos uterinos con solución de PBS con surfactantes (Pictor-Gen, Argentina) y se colectó este líquido en filtros ideados para la técnica que tienen una malla de 50  $\mu$  (Millipore, Brazil). Posteriormente en el laboratorio se

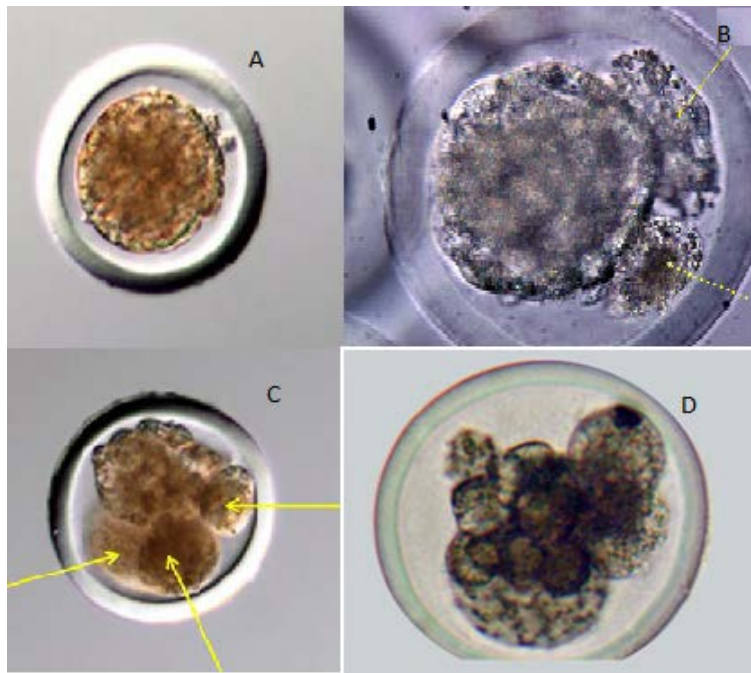
buscaron las estructuras colectadas por medio de lupas estereoscópicas de luz indirecta y con hasta 50 aumentos.

Se lavaron, evaluaron y clasificaron los embriones de acuerdo a las recomendaciones de la Asociación Internacional de Transferencia de Embriones (IETS, 2000).



A-Ovocito fertilizado, B-Mórula temprana, C-Mórula, D-Blastocito inicial, E- Blastocito, F-Blastocito expandido, G-Blastocito eclosionando, H-Blastocito eclosionado, I-Embrión degenerado.

Figura 2.18. Fotos de ovocitos y embriones.



Mórulas. A-Grado1, B-Grado 2, C-Grado 3, D-Degenerado.

Figura 2.19. Clasificación de embriones en el estadio de Mórula de acuerdo a la integridad de las blastómeras.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se evaluó la respuesta superovulatoria por el número y calidad de los embriones obtenidos. Los datos provenientes de conteos como número de estructuras totales colectadas (ovocitos/embriones colectados), ovocitos fertilizados y embriones transferibles (Grado 1, 2 y 3 según IETS, 2000), fueron analizados por ANAVA para determinar el efecto de la categoría (vacas vs vaquillonas), replica, tratamiento y sus interacciones. En los experimentos que se evaluaron más de dos grupos se utilizó a posteriori el método LSD para detectar diferencias entre las medias. Por la naturaleza de los datos (las varianzas no son homogéneas) estos se transformaron a raíz cuadrada antes de ser analizados por ANAVA. Los datos proporcionales como tasa de ovulación fueron evaluados por test no paramétricos (Chi cuadrado). Para todo el análisis estadístico se utilizó el Software InfoStat/P, UNC (InfoStat, 2007).

## CAPITULO 3

### RESULTADOS

#### EXPERIMENTO 1

Los resultados de las respuestas superovulatorias y producción de embriones de las donantes en ambos grupos de tratamiento (P4 + EB vs Primera Onda – Pretratamiento por 10 d) se muestran en la Tabla 3.1. No hubo diferencias significativas entre los grupos de tratamiento en ninguna de la variables analizadas ( $P>0,1$ ).

Tabla 3.1. Respuesta superovulatoria y producción de embriones de donantes superestimuladas 4 días después de la aplicación de progesterona y estradiol o en la primera onda de desarrollo folicular después de la aplicación de GnRH (Medias  $\pm$  E.E.).

<b>Grupos de Tratamiento</b>	<b>n</b>	<b>Cuerpos Lúteos Palpados</b>	<b>Ovocitos/ embriones colectados</b>	<b>Ovocitos Fertilizados</b>	<b>Embriones Grado 1 y 2</b>	<b>Embriones Grado 1, 2 y 3</b>
P4 + EB	34	14,3 $\pm$ 0,9	11,0 $\pm$ 1,4	6,3 $\pm$ 1,1	4,5 $\pm$ 0,9	5,1 $\pm$ 0,9
Primera Onda – Pretratamiento por 10 d	34	12,7 $\pm$ 1,2	8,4 $\pm$ 1,4	5,2 $\pm$ 1,1	3,0 $\pm$ 0,6	3,7 $\pm$ 0,8
Valor-P		0,3931	0,0976	0,2419	0,1088	0,1008

## EXPERIMENTO 2

Como se puede ver en la tabla 3.2 ovularon en total 84,8% de las donantes tratadas (28/33) y la ovulación ocurrió a las  $33,0 \pm 1,3$  h (Media  $\pm$  E.E.). No se encontraron diferencias significativas ni en el porcentaje de ovulación ( $P > 0,16$ ) ni en la hora media de la misma ( $P > 0,49$ ) entre los tres tratamientos realizados.

Tabla 3.2. Efecto de la duración del tratamiento con un dispositivo intravaginal con progesterona (10 vs 5 días) y de la concentración de progesterona en el dispositivo (1,56 g vs 0,78 g) sobre la respuesta ovulatoria a la GnRH (Medias  $\pm$  E.E.).

<b>Grupos de Tratamiento</b>	<b>n</b>	<b>% de Ovulaciones</b>	<b>Horas desde la GnRH hasta la ovulación (Rango).</b>
Tratamiento Primera Onda – Pretratamiento por 10 d	11	81,8% (9/11)	$32,0 \pm 2,8$ (12-36)
Primera Onda - Pretratamiento por 5 d, Cue-Mate con 0,78g de P4	11	72,7% (8/11)	$30,0 \pm 3,2$ (12-36)
Primera Onda - Pretratamiento por 5 d	11	100,0% (11/11)	$36,0 \pm 0,0$ (36)
Valor P		0,1645	0,4987

Las variables analizadas de los datos que resultaron de la colecta de embriones no difirieron significativamente ( $P > 0,8$ ) entre los grupos de tratamiento como se puede apreciar en la tabla 3.3.

Tabla 3.3. Respuesta superovulatoria y producción de embriones de donantes superestimuladas 4 días después de la aplicación de progesterona y estradiol o en la primera onda de desarrollo folicular después de un pretratamiento con un dispositivo con progesterona y la aplicación de GnRH (Medias  $\pm$  E.E.).

<b>Grupos de Tratamiento</b>	<b>n</b>	<b>Cuerpos Lúteos Palpados</b>	<b>Ovocitos/ embriones colectados</b>	<b>Ovocitos Fertilizados</b>	<b>Embriones Grado 1 y 2</b>	<b>Embriones Grado 1, 2 y 3</b>
Tratamiento Primera Onda - Pretratamiento por 10 d	11	12,8 $\pm$ 2,1	11,3 $\pm$ 2,9	7,2 $\pm$ 2,2	4,8 $\pm$ 1,4	5,5 $\pm$ 1,6
Primera Onda - Pretratamiento por 5 d, Cue-Mate con 0,78g de P4	11	11,8 $\pm$ 2,0	10,0 $\pm$ 2,7	7,6 $\pm$ 2,1	4,4 $\pm$ 1,0	4,5 $\pm$ 1,0
Primera Onda - Pretratamiento por 5 d	11	12,2 $\pm$ 2,3	9,8 $\pm$ 3,0	7,4 $\pm$ 2,7	4,9 $\pm$ 2,3	5,2 $\pm$ 2,6
Tratamiento P4 + EB	11	12,5 $\pm$ 2,0	9,6 $\pm$ 2,7	6,0 $\pm$ 1,5	4,1 $\pm$ 1,5	5,4 $\pm$ 1,6
Valor P		0,8743	0,9122	0,9016	0,9649	0,8456

### EXPERIMENTO 3

En este experimento se realizaron ultrasonografías de la misma manera que en el experimento 2. Ovularon en total el 87,8 % de las donantes tratadas (65/74) y la ovulación ocurrió a las  $36,5 \pm 0,8$  h (Media  $\pm$  E.E.). No se encontraron diferencias significativas entre los dos tratamientos, ni en el porcentaje de donantes que ovularon después de la GnRH ( $P > 0,47$ ) ni en la hora media de ovulación ( $P > 0,81$ ), como se ve en la tabla 3.4.

Tabla 3.4. Tasa ovulatoria y momento de la ovulación después de un pretratamiento con un dispositivo con progesterona y la aplicación de GnRH. Efecto de la remoción o no remoción del dispositivo 36 h antes de la GnRH. (Medias  $\pm$  E.E.).

<b>Grupos de Tratamiento</b>	<b>n</b>	<b>% de Ovulaciones</b>	<b>Horas desde la GnRH hasta la ovulación (Rango).</b>
Primera Onda – Pretratamiento por 5 d	37	86,5% (32/37)	$36,0 \pm 1,3$ (0-60)
Primera Onda - Pretratamiento sin remoción del dispositivo	37	89,2% (33/37)	$37,5 \pm 0,7$ (36-48)
Valor P		0,8176	0,4767

Los datos analizados de los días de colectas embrionarias, no difirieron significativamente ( $P > 0,05$ ) entre los grupos de tratamiento en ninguna de las variables analizadas, como se puede apreciar en la tabla 3.5.



Tabla 3.5. Respuesta superovulatoria y producción de embriones de donantes superestimuladas en la primera onda de desarrollo folicular después de un pretratamiento con un dispositivo con progesterona y la aplicación de GnRH. Efecto de la remoción o no remoción del dispositivo 36 h antes de la GnRH. (Medias  $\pm$  E.E.).

<b>Grupos de Tratamiento</b>	<b>n</b>	<b>Cuerpos Lúteos Palpados</b>	<b>Ovocitos/ embriones colectados</b>	<b>Ovocitos Fertilizados</b>	<b>Embriones Grado 1 y 2</b>	<b>Embriones Grado 1, 2 y 3</b>
Primera Onda – Pretratamiento por 5 d	37	10,7 $\pm$ 0,9	8,2 $\pm$ 1,0	4,8 $\pm$ 0,7	3,8 $\pm$ 1,6	4,1 $\pm$ 0,6
Primera Onda – Pretratamiento sin remoción de dispositivo.	37	11,7 $\pm$ 0,8	9,8 $\pm$ 0,9	6,8 $\pm$ 0,8	5,3 $\pm$ 0,7	5,7 $\pm$ 0,7
Valor P		0,1116	0,1081	0,1078	0,2412	0,1490

## EXPERIMENTO 4

Los datos que resultaron de las colectas de los embriones, no mostraron ser diferentes significativamente ( $P > 0,4$ ) en ninguna de las variables que se analizaron entre los dos grupos de tratamiento, como se puede apreciar en la tabla 3.6

Tabla 3.6. Respuesta superovulatoria y producción de embriones de donantes superestimuladas en la primera onda de desarrollo folicular después de un pretratamiento con un dispositivo con progesterona y la aplicación de GnRH. Efecto del tratamiento con FSH por 4 o 5 días (Medias  $\pm$  E.E.).

Grupos de Tratamiento	n	Cuerpos Lúteos Palpados	Ovocitos/ embriones colectados	Ovocitos Fertilizados	Embriones Grado 1 y 2	Embriones Grado 1, 2 y 3
Primera Onda – Pretratamiento sin remoción del dispositivo y FSH por 5d	24	13,5 $\pm$ 1,3	13,5 $\pm$ 2,4	8,2 $\pm$ 1,4	6,2 $\pm$ 1,1	6,6 $\pm$ 1,1
Primera Onda – Pretratamiento sin remoción del dispositivo y FSH por 4d	24	12,7 $\pm$ 1,1	12,0 $\pm$ 1,9	7,0 $\pm$ 1,2	5,0 $\pm$ 0,9	5,8 $\pm$ 1,0
Valor P		0,8086	0,5888	0,5658	0,4334	0,6147

## EXPERIMENTO 5

Los datos obtenidos y analizados no mostraron diferencias significativas ( $P>0,3$ ) tanto entre los tratamientos que se desarrollaron en la primera onda folicular que recibieron o no PGF en el Día -3 como con el iniciado 4 días después de la aplicación de P4 y estradiol, como se muestra en la tabla 3.7.

Tabla 3.7. Respuesta superovulatoria y producción de embriones de donantes superestimuladas 4 días después de la aplicación de progesterona y estradiol o en la primera onda de desarrollo folicular, después de un pretratamiento con un dispositivo con progesterona y GnRH. Efecto de la administración de una segunda dosis de PGF 5 días después de la inserción del dispositivo con progesterona (equivalente al Día -3 del tratamiento superovulatorio) en las vacas superovuladas en la primera onda. (Medias  $\pm$  E.E.).

Grupos de Tratamiento	n	Cuerpos Lúteos Palpados	Estructuras Colectadas	Estructuras Fertilizadas	Embriones Grado 1 y 2	Embriones Grado 1, 2 y 3
Primera Onda – Pretratamiento con PGF en el Día -3.	14	14,2 $\pm$ 1,4	12,9 $\pm$ 2,0	9,8 $\pm$ 1,7	5,9 $\pm$ 1,2	6,6 $\pm$ 1,2
Primera Onda – Pretratamiento sin PGF en el Día -3.	14	12,9 $\pm$ 1,4	11,5 $\pm$ 1,7	9,3 $\pm$ 1,5	7,2 $\pm$ 1,5	7,7 $\pm$ 1,6
P4 + EB	14	14,5 $\pm$ 1,4	14,5 $\pm$ 2,8	9,4 $\pm$ 2,3	5,6 $\pm$ 1,5	6,8 $\pm$ 1,7
Valor P		0,5332	0,5824	0,8863	0,3829	0,6175

### DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en los experimentos de esta tesis soportan la hipótesis de que los tratamientos superovulatorios iniciados en la primera onda folicular desarrollada al momento de la ovulación de un folículo persistente, resultan en una respuesta similar a los iniciados 4 días después de la aplicación de estrógenos y P4.

En el experimento 1 se evaluó la eficacia de la superestimulación en el momento esperado de emergencia de la primera onda de desarrollo folicular al compararse con la superestimulación 4 días posteriores a la aplicación de estrógenos y P4, momento en que se espera la emergencia de una nueva onda folicular (Bó *et al.*, 1994; 1995a; 1996). Se tomó este tratamiento como control ya que es utilizado por muchos profesionales alrededor del mundo (Beal, 1999; Baruselli *et al.*, 2006; Bó *et al.*, 2006). Si bien en este primer experimento preliminar no se evaluó el número de donantes que ovulaba después de la GnRH, se comprobó que el concepto podría ser viable para continuar con los trabajos posteriores de desarrollo de un protocolo práctico en condiciones comerciales.

Se sabe que si la GnRH es aplicada en momentos al azar del ciclo estral no da como resultados grandes porcentajes de ovulación, los cuales oscilan entre el 44% y el 60% (Martinez *et al.*, 1999; Colazo *et al.* 2007a; 2007b), esto conlleva a que los tratamientos con GnRH antes de la superestimulación den resultados de menores respuestas superovulatorias que los tratamientos iniciados luego de la aspiración folicular o el tratamiento con estradiol (Deyo *et al.*, 2001). Los tratamientos iniciados después de la ablación o aspiración folicular resultan en respuestas similares a los tratamientos iniciados después de la administración de estradiol y P4 ya que ambos tienen como objetivo ser iniciados en la emergencia folicular (Bergfelt *et al.*, 1997; Bo *et al.*, 2006).

Para lograr un incremento en la respuesta ovulatoria posterior a la aplicación de GnRH se realizó un tratamiento previo que consistió en la aplicación de un dispositivo intravaginal de P4 junto con una dosis de prostaglandina, se retiró el dispositivo intravaginal 10 días después y se aplicó nuevamente prostaglandina en el momento del

retiro; con esto se esperaba la formación de un folículo persistente como ya lo había reportado Small *et al* (2009). El fundamento fisiológico de la administración de prostaglandina para lisis al CL e insertar el dispositivo está basado en los trabajos realizados por otros autores que encontraron que la P4 liberada por un dispositivo en una vaca sin CL resulta en niveles subluteales de esta hormona a nivel plasmático (Savio *et al.* 1993; Stock and Fortune, 1993). Estos niveles subluteales de P4 inducen una alta pulsatilidad de LH que estimula y mantiene el desarrollo del folículo dominante y altera el normal recambio de los folículos, creando como consecuencia un folículo persistente. Se aplicó la GnRH 36 h posteriores al retiro del dispositivo, para dar lugar a un descenso de los niveles de P4 y se inició la administración de FSH 36 hs después debido a que se esperaba la ovulación y por ende la emergencia de la nueva onda de crecimiento folicular (Ginther *et al.*, 1989b).

Otra decisión importante tomada en este experimento fue la colocación de un dispositivo intravaginal en el momento que se inició el tratamiento superovulatorio. Esto fue diferente a lo realizado originalmente por Nasser *et al.* (1993) y Adams *et al.*, (1994). Sin embargo en trabajos más recientes se encontró que es importante la administración de una fuente de P4 para que el tratamiento resulte en una buena calidad embrionaria (Nasser *et al.*, 2011, Rivera *et al.*, 2011). Aké *et al.* (1999) también reportaron que los niveles de P4 influyen la calidad embrionaria. En ese experimento se superovularon vacas 11 días después del estro por 4 días en dosis decrecientes. Las donantes con concentraciones plasmáticas de P4  $>3$  ng/mL al iniciar la superovulación, tuvieron similar promedio de CL que las que tuvieron P4  $< 3$ ng/mL (12,4 vs 10,2;  $P>0,05$ ). Sin embargo, se encontró una diferencia significativa en el número de estructuras colectadas (9,3 vs 4,7;  $P<0,01$ ) y de embriones transferibles (6,6 vs 3,0;  $P<0,01$ ) a favor del grupo con P4  $> 3$ ng/mL.

En vacas no superovuladas, concentraciones de P4  $< 1$ ng/mL durante el crecimiento folicular resulta en un incremento de la pulsatilidad de LH y que a su vez causa un folículo persistente y un óvulo maduro envejecido con reducida calidad embrionaria. Esto explicado brevemente se da por que reducidas concentraciones de P4 producen una mayor frecuencia de pulsos de GnRH, y esta a su vez incrementa la liberación de LH, la cual hace que madure el ovocito prematuramente (Revah y Butler, 1996; Inskeep 2004). Por otra parte la P4 actúa en el útero estimulando y manteniendo

las funciones necesarias para el desarrollo embrionario temprano, esto con la finalidad de llevar a cabo la implantación, placentación y desarrollo fetal. De acuerdo a esto se ha afirmado que la síntesis de proteínas uterinas durante el desarrollo embrionario temprano está influenciada principalmente por la acción de la P4, la cual es la responsable de los cambios cualitativos y cuantitativos en el medio ambiente uterino, controlando la síntesis y secreción de por lo menos 10 proteínas (Spencer *et al*, 2004). Según esto se asume que deficiencias de P4 podrían causar deficiencias en cuanto a la nutrición histiotrófica, fuente disponible para el crecimiento, mantenimiento y supervivencia del conceptus (embrión con todas sus membranas asociadas) (Neider y Corder, 1982; Spencer *et al*, 2004).

El experimento 2 se realizó con el fin de evaluar el efecto de la duración del pretratamiento con dispositivos liberadores de P4, determinando si era posible reducir ese periodo de 10 a 5 días. Asimismo en este periodo corto de pretratamiento se hicieron dos grupos, uno con un dispositivo Cue-Mate con la cantidad completa de P4 (1,56 g) y en el otro grupo se utilizaron dispositivos con la mitad de P4 (0,78 g). Esto tenía como objetivo comprobar si una disminución mayor de los niveles de P4 podía aumentar la tasa ovulatoria a la GnRH, basado en que los datos anteriormente reportados en similares pretratamientos fueron obtenidos con dispositivos intravaginales reutilizados y con una duración de entre 7 a 10 días (Colazo *et al.*, 2006; Small *et al.*, 2009)

En este experimento se realizaron ecografías para determinar el porcentaje de ovulación posterior a la aplicación de GnRH en cada uno de los tres grupos en los que se esperaba la ovulación. Los tres tratamientos fueron muy similares con ovulaciones del 81,8%; 72,7% y del 100% en animales tratados por 10 días y los tratados por 5 días, con 1,56 o 0,78 g de P4, dando un total de 28 ovulaciones sobre un total de 33 tratamientos. El intervalo tampoco fue diferente y el promedio general fue de  $33,0 \pm 1,3$  h con un rango de 12 a 36 h. Estos resultados son muy similares a los reportados por Small *et al.* (2009), donde las vacas ovularon un folículo persistente en promedio a las 30 h de aplicada la GnRH, confirmando que el tratamiento con FSH (a las 36 hs post GnRH) comienza en promedio en el momento de inicio de la primera onda folicular, aumentando las posibilidades de que los folículos antrales estén en las mejores

condiciones para responder a la FSH, tal cual fue propuesto por Nasser *et al.* (1993, 2011) y confirmado por Adams (1994).

Los resultados de las evaluaciones de las respuestas superovulatorias en los 4 grupos fueron muy similares, tanto en los embriones que podrían ser congelados (Grado 1 y 2) como en los transferibles (Grado 1, 2 y 3), situación similar para las demás variables evaluadas (CL, ovocitos/embriones totales colectados, ovocitos fertilizados). Lo anterior confirma conclusiones de reportes anteriores que indican que la superovulación en la primera onda de desarrollo folicular se puede realizar con resultados comparables a las realizadas en otras ondas de desarrollo folicular (Nasser *et al.*, 1993; Adams, 1994) y a los tratamientos que utilizan estradiol y P4 para sincronizar el desarrollo folicular (Nasser *et al.*, 2011). Desde el punto de vista práctico, el hallazgo más importante de este experimento es que se pudo reducir en 5 días los pretratamientos, sin que esto afectara la respuesta superovulatoria, obteniendo un tratamiento más sencillo, corto y por esto más aplicable a nivel de campo.

El experimento 3 se realizó con el fin de determinar si era necesario o no la remoción del dispositivo intravaginal con P4 en el momento de la aplicación de la GnRH para producir la subsecuente ovulación esperada. Para esto se realizaron dos tratamientos con 37 donantes de embriones, cada una de ellas pasando por cada uno de los dos tratamientos en un diseño cross-over, como se describió en la materiales y métodos. Como se vio en los resultados, la tasa de ovulación general fue muy alta, 87,8% y no hubo diferencias entre los grupos con tasas del 86,5% para el grupo en que se removió el dispositivo y del 89,2% para el grupo sin remoción de dispositivo. Las horas medias de ovulación también fueron muy similares ( $36,0 \pm 1,3$  y  $37,5 \pm 0,7$ , respectivamente).

A pesar que las respuestas superovulatorias no fueron estadísticamente diferentes entre ambos grupos de tratamiento, se observó una diferencia numérica a favor del grupo de tratamiento en que no se removió el dispositivo intravaginal. Esto se puede deber a que probablemente en este grupo la superestimulación se realizó con niveles de P4 generales más bajos, ya que al no removerse dicho dispositivo, alguna parte de la P4 del mismo (aproximadamente el 50%) ya se ha absorbido al inicio de la superestimulación, mientras que en el otro grupo de tratamiento en este momento se

introduce un dispositivo nuevo que contiene la totalidad de P4 y el inicio de la superestimulación se realiza con más P4 circulante. Se puede especular que la mayor P4 circulante producida al reinsertar un dispositivo nuevo podría tener un efecto negativo ya que las pulsaciones de LH pueden estar disminuidas en los animales con niveles de P4 mayores, comparados con los animales con niveles de P4 reducidos (Goodman y Karsch, 1980; Rahe et al, 1980; Karsch, 1987; Savio *et al*, 1993; Stock y Fortune, 1993). Estos incrementos numéricos en los tratamientos en que se superestimula con concentraciones de P4 reducidas, llevan a la hipótesis, de que estas reducidas concentraciones de P4 conllevan a mayores pulsaciones de LH endógenas, que pueden ser beneficiosas al final del tratamiento superestimulador como se observó en los trabajos en los cuales se intentó aumentar la cantidad de LH al final de la superestimulación con tratamientos con eCG (Cifuentes et al. 2009; Reano *et al.*, 2009) o LH porcina (Barros *et al.*, 2010). Además de los resultados nombrados anteriormente Price *et al.* (1999) estudiaron la pulsatilidad de la LH en vacas superovuladas, encontrando una menor pulsatilidad en la vacas tratadas con Folltropin-V que en las no tratadas y proponiendo que un aumento de la pulsatilidad de la LH podría mejorar la calidad y cantidad de embriones obtenidos. A pesar que es muy difícil y poco práctico tratar de recomponer la pulsatilidad de la LH con pequeñas inyecciones, se podría pensar que una disminución de la P4 endógena podría tener el mismo resultado al disminuir el efecto de feed back negativo de la P4 sobre la pulsatilidad de la GnRH/LH.

El experimento 4 fue realizado para evaluar la duración (cantidad de aplicaciones cada 12 h) del tratamiento con FSH y su efecto sobre la respuesta superovulatoria de la primera onda folicular. Para lo anterior se comparó el tratamiento de 8 aplicaciones de FSH cada 12 h (para un total de 4 días) con el de 10 aplicaciones de FSH cada 12 h (para un total de 5 días). Cabe mencionar que la dosis de hormona total fue la misma en los dos grupos de tratamiento, o sea en el grupo de 4 días de aplicaciones de FSH se inyectaba más porcentaje de hormona en cada aplicación como esta descrito en materiales y métodos. Los resultados en este experimento muestran que no hubo diferencias entre los dos grupos de tratamiento en todas las variables analizadas. Son *et al.* (2007) reportaron similares respuestas superovulatorias cuando superestimularon vacas coreanas nativas, durante 3 días de FSH (6 aplicaciones cada 12h) o 4 días (8 aplicaciones cada 12h). También hay trabajos de la década de los 80's que demostraron que cuando se redujo la duración del tratamiento de 5 a 4 días no



hubieron diferencias significativas en las respuestas superovulatorias (Mapletoft *et al.*, 1988). No obstante estos trabajos encontraron una menor respuesta cuando se acortó el tratamiento con FSH a 3 días (García *et al.*, 1982; Mapletoft *et al.*, 1988).

El otro factor que podría haber alterado la respuesta superovulatoria entre los grupos del experimento 4 es la vida del CL que se debería lisis para que las vacas donantes tengan celo y ovulación. En este protocolo de la primera onda, la PGF se inyecta en el día 4 o 5 después de la ovulación, momento en el cual la sensibilidad del CL a la PGF está todavía disminuida (Momont y Seguin, 1982, 1984). Sin embargo el uso de dos dosis de PGF con 12 h de intervalo es aparentemente suficiente para inducir la regresión luteal tan temprana, confirmando los datos de los trabajos previos (Nasser *et al.*, 1993, 2011; Adams *et al.*, 1994). La regresión luteal completa es clave para obtener una buena tasa de fertilización, ya que valores altos de P4 en el celo pueden alterar el transporte y capacitación espermática. Esto se evidenció en el estudio realizado por Aké *et al.* (1999) en donde las donantes con concentraciones plasmáticas de P4 < 1ng/mL al momento de la inseminación produjeron mayor cantidad de estructuras colectadas (6,9 vs 3,0) y de embriones transferibles (4,6 vs 0,0) que las que tenían concentraciones plasmáticas de P4 >1ng/mL.

Continuando con la serie de experimentos de esta tesis, el experimento 5 se realizó con el fin de evaluar si era necesario o no aplicar PGF previo a la GnRH con la que se pretende inducir la ovulación y con esto la emergencia de una nueva onda de crecimiento folicular. Esto con el fin de reducir las inyecciones totales del tratamiento y así hacerlo más sencillo al evitar un encierro de las donantes. También, como este fue el último experimento de esta tesis se quiso volver a confrontar estos tratamientos de la primera onda folicular con el tratamiento tradicional que inicia la superestimulación 4 días después de la aplicación de progestágenos y estradiol.

Como se puede apreciar en los resultados los tres tratamientos de este experimento no tuvieron diferencias significativas en las variables estudiadas. Esto evidencia que la aplicación de PGF al colocar el dispositivo intravaginal es eficiente para provocar la regresión de un CL. Si no fuera así, muy posiblemente el CL existente en ese momento se encontraría en una fase temprana de desarrollo (Momont y Seguin, 1982, 1984). Además es posible que esos CL inmaduros se hayan visto afectados por la

elevación de los niveles de P4 sobre la LH, perjudicando el desarrollo del CL, tal cual fue sugerido por Burke *et al.* (1996). Por lo tanto 7 días después, el CL no alcanzó a producir una cantidad suficiente de P4 para inhibir por completo la liberación de LH que provoca la aplicación de GnRH de esta tesis. Tomando los datos de los experimentos 1, 2 y 5 en conjunto, los tratamientos de la primera onda resultaron en  $7,1 \pm 1,0$  embriones transferibles, mientras que los realizados en la onda sincronizada con estradiol y P4 produjeron  $6,8 \pm 1,7$  embriones transferibles.

### CONCLUSIONES

Los resultados de esta serie de experimentos confirman la hipótesis general propuesta de que los tratamientos superovulatorios iniciados en la primera onda folicular desarrollada al momento de la ovulación de un folículo persistente, resultan en una respuesta similar a los iniciados 4 días después de la aplicación de estrógenos y P4.

Además, los resultados de los experimentos de esta tesis permiten realizar las siguientes conclusiones específicas:

- La respuesta superestimuladora en la primera onda de desarrollo folicular es similar a la esperada después de la aplicación de estrógenos y P4.
- Los pretratamientos con dispositivos intravaginales con P4 por 5 días resultan en la misma tasa ovulatoria a la GnRH que los tratamientos por 10 días.
- La aplicación de GnRH 36 h después de la remoción del dispositivo con P4, resulta en una ovulación sincrónica a las  $35,5 \pm 1,3$  h en el 86,9% de las vacas tratadas.
- No es necesario remover el dispositivo intravaginal con P4 para lograr la ovulación con la aplicación de GnRH en vacas sometidas a un tratamiento con bajos niveles de P4 por al menos 6,5 días.
- La superestimulación durante la primera onda folicular utilizando tratamientos con FSH durante 5 días (10 aplicaciones) o durante 4 días (8 aplicaciones) resulta en una respuesta superovulatoria similar.
- No es necesario aplicar una segunda dosis PGF 36 h antes de la aplicación de la primera GnRH para inducir la ovulación en vacas

tratadas previamente con un dispositivo con P4 por 6,5 días y con un primera dosis de PGF en el momento de la inserción del dispositivo.

### BIBLIOGRAFÍA

- Adams G.P., Matteri R.L., Kastelic J.P., Ko J.C., Ginther O.J. 1992a Association Between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular wave in heifers. *J Reprod Fertil*, 94: 177-188.
- Adams G.P., Matteri R.L., Ginther O.J. 1992b. The effect of progesterone on growth of ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating FSH in heifers. *J Reprod Fertil*, 95: 627-640.
- Adams G.P., Kot K., Smith C.A., Ginther O.J. 1993. Selection of a dominant follicle and suppression of follicular growth in heifers. *Anim Reprod Sci*, 30: 259-271.
- Adams G.P. 1994. Control of ovarian follicular wave dynamics in cattle: implications for synchronization and superstimulation. *Theriogenology*, 41:19-24.
- Adams G.P. 1999. Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants. *J Reprod Fertil*, 54: 17-32.
- Adams G.P., Jaiwal R., Singh J., Malhi P. 2008. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology*, 69: 2-80.
- Aké J.R.; Alfaro M.E; Aguayo A.M; Holy L. 1999. Concentración plasmática de progesterona y producción embrionaria en vacas superovuladas bajo condiciones tropicales. *Vet. Mex. UNAM*, 30: 19-23.
- Anderson L.H., Day M.L. 1994. Acute progesterone administration regresses persistent dominant follicles and improves fertility of cattle in which estrus was synchronized with melengestrol. *J Anim Sci*, 72: 2955-2961.
- Bao B., Garverick H.A. 1998. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves. *J Anim Sci*, 76: 1903-1921.
- Baruselli P.S., Sá Filho M., Matins C.M., Naser L.F., Nogueira M.F.G., Barros C.M., Bó G.A. 2006. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*, 65: 77-88.
- Beal W.B. 1999. Practical application of ultrasound in bovine embryo transfer. 18th Annual Convention AETA, Colorado Springs, CO, USA, pp. 66-77.
- Beg M.A., Bergfelt D.R., Kot K., Wiltbank M.C., Ginther O.J. 2001. Follicular-fluid factors and granulosa-cell gene expression associated with follicle deviation in cattle. *Biol Reprod*, 64: 432-441.
- Beg M.A., Bergfelt D.R., Kot K., Ginther O.J. 2002. Follicle selection in cattle: dynamics of follicular fluid factors during development of follicle dominance. *Biol Reprod*, 66: 120-126.
- Bergfelt D.R., Kastelic J.P., Ginther O.J. 1991. Continued periodic emergence of follicular waves in nonbred progesterone-treated heifers. *Anim Reprod Sci*, 24: 193-204.
- Bergfelt D.R., Lightfoot K.C., Adams G.P. 1994. Ovarian synchronization following ultrasound-guided transvaginal follicle ablation in heifers. *Theriogenology*, 42: 895-907.
- Bergfelt D.R., Bó G.A., Mapletoft R.J., Adams G.P. 1997. Superovulatory response following ablation-induced follicular wave emergence in cattle. *Anim Reprod Sci*, 49:1-12.

- Bleach E.C.L., Glencross R.G., Feist S.A., Groome N.P., Knight P.G. 2001. Plasma inhibin A in heifers: Relationship with follicle dynamics, gonadotropins, and steroids during the estrous cycle and after treatment with bovine follicular fluid. *Biol Reprod*, 64: 743-752.
- Bó G.A., Hockley D.K., Tríbulo H., Jofre F., Tríbulo R., Busso N., Barth A.D., Mapletoft R.J. 1991. The effect of dose schedule and route of administration on superovulatory response to Folltropin in the cow. *Theriogenology*, 35: 186 (abstract).
- Bó G.A., Adams G.P., Pierson R.A., Caccia M., Tribulo H., Mapletoft R.J. 1994. Follicular wave dynamics after estradiol 17- $\beta$  treatment of heifers with or without a progestogen implant. *Theriogenology*, 41: 1555-1569.
- Bó G.A., Adams G.P., Caccia M., Martinez M., Pierson R.A., Mapletoft R.J. 1995a. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. *Anim Reprod Sci*, 39: 193-204.
- Bó G.A., Adams G.P., Pierson R.A., Mapletoft R.J. 1995b. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. *Theriogenology*, 43: 31-40.
- Bó G.A., Adams G.P., Pierson R.A., Mapletoft R.J. 1996. Effect of progestogen plus estradiol-17 $\beta$  treatment on superovulatory response in beef cattle. *Theriogenology*, 45: 897-910.
- Bó G.A., Baruselli P.S., Moreno D., Cutaia L., Caccia M., Tríbulo R., Tríbulo H., Mapletoft R.J. 2002a. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology*, 57: 53-72.
- Bó G.A., Caccia M. 2002b. Dinámica folicular en el bovino. En: *Reproducción en los animales domésticos*, Tomo I. R. Ungerfeld. Montevideo, Uruguay. pp. 55-68.
- Bó G.A., Mapletoft R.J. 2003. Superovulación en Bovinos. En: *Reproducción en los animales domésticos*, Tomo II. R. Ungerfeld. Montevideo, Uruguay. pp. 515-538.
- Bó G.A., Baruselli P.S., Chesta P., Martins C.M. 2006. The timing of ovulation and insemination schedules in superstimulated cattle. *Theriogenology*. 65: 89-101.
- Bó G.A., Chesta P.M., Carballo Guerrero D., Mapletoft R.J. 2007. Nuevas alternativas para la superovulación de donantes de embriones. VII Simposio internacional de reproducción animal, Córdoba, Argentina, pp.183-198.
- Bó G.A., Mapletoft R.J. 2009. Introducción. En: *Módulo, Superovulación y Transferencia de Embriones. Especialidad en Reproducción Bovina*. Instituto de Reproducción Animal Córdoba – Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina. pp 1.
- Braw-Tal R., Yossefi S. 1997. Studies *in vivo* and *in vitro* on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. *J Reprod Fertil*, 109: 165-171.
- Bungarts L., Niemann H. 1994. Assessment of the presence of a dominant follicle and selection of dairy cows suitable for superovulation by a single ultrasound examination. *J Reprod Fertil*, 101: 583-591.
- Burke CR, Macmillan KL, Boland MP. 1996. Oestradiol potentiates a prolonged progesterone-induced suppression of LH release in ovariectomized cows. *Anim Reprod Sci* 45: 13-28.
- Burn D.S., Jimenez-Krassel F., Ireland J.L., Knight P.G., Ireland J.J. 2005. Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: evidence for high variation among animals, very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum follicle-stimulating hormone concentration. *Biol Reprod*, 73: 54-62.
- Callesen H., Greve T., Hyttell P. 1986. Preovulatory endocrinology and oocyte maturation in superovulated cattle. *Theriogenology*. 25:71-86.

- Chenoweth PJ. 2007. Influence of the male on embryoquality. *Theriogenology*, 68 (3):308-315.
- Chesta P., Cutaia L., Tríbulo H., Tríbulo R., Alasino R., Ausar F., Beltramo D., Bianco I., Bo G.A. 2003. Distribución de las ovulaciones en vacas superovuladas con Folltropin-V. V Simpósio Internacional de Reproducción animal, Huerta Grande, Córdoba, Argentina, 27, 28 y 29 de Junio, pp. 409 (abstract).
- Chesta P., Tríbulo H., Tríbulo R., Balla E. Baruselli P.S., Bó G.A. 2007. Effect of time of ovulation induction by gonadotropin-releasing hormone or pituitary luteinizing hormone on ova/embryo production in superstimulated beef cows inseminated at a fixed time. *Reprod. Fertil. Dev.* 19: 307 (abstract).
- Choudary J.B., Gier H.T., Marion G.B. 1968. Cyclic Changes in bovine vesicular follicles. *J Anim Sci*, 27: 468-471.
- Chupin D, Combarous Y, Procureur R. 1984. Antagonistic effect of LH on FSH-induced superovulation in cattle. *Theriogenology*. 21: 229 (abstract).
- Cifuentes E., Quevedo L., Hoyos A., Carballo D., Piccardi M., Bó G.A. 2009. Efecto de la aplicación de eCG en vacas donantes de embriones superovuladas con Folltropin-V. VIII Simposio Internacional de Reproducción Bovina, Córdoba, Argentina, 26, 27 y 28 de Septiembre 2009. CD. (abstract).
- Colazo M.G., Small J.A., Kastelic J.P., Davis H., Ward D.R., Mapletoft R.J. 2006. Effects of CIDR-based Presynchronization and eCG on fertility to a GnRH-based Timed-AI Protocol in Beef Cattle. *Reprod Fertil Dev*, 18:114 (abstract).
- Colazo M.G., Kastelic J.P., Small J.A., Wilde R.E., Ward D.R., Mapletoft R.J. 2007a. Ovarian follicular dynamics, CL function, estrus, ovulation, and fertility in beef cattle resincronized with progestins and ECP, GnRH or progesterone. *Can Vet J.* 48:49-56.
- Colazo M.G., Ambrose D.J., Mapletoft R.J. 2007b. Pregnancy rates to timed-AI in dairy cows treated with pLH or GnRH. *J Dairy Sci*, 90:328 (abstract).
- Crowe M.A., Enright W.J., Boland M.P., Roche J.F. 1993. Follicular growth and serum FSH responses to recombinant bovine FSH (rbFSH) in GnRH immunized heifers. *J Anim Sci*. 71: 212 (abstract).
- Dalton JC, Nadir S, Bame JH, Noftlinger M, Saacke RG. 2000. The effect of time of artificial insemination on fertilization status and embryo quality in superovulated cows. *J Anim Sci*, 78 (8): 2081-2085.
- Deyo C.D., Colazo M.G., Martinez M.F., Mapletoft R.J. 2001. The use of GnRH or LH to synchronize follicular wave emergence for superstimulation in cattle. *Theriogenology*. 55: 513(abstract).
- Dieleman S.L., Bevers M.M., Vos P., De Loos F. 1993. PMSG/anti-PMSG in cattle: A simple and efficient superovulatory treatment? *Theriogenology*. 39:25-41.
- D'Occhio M.J., Sudha G., Jillella D., Write T., MacLellan L.J., Walsh J., Trigg T.E., Miller D. 1997. Use of GnRH agonist to prevent the endogenous LH surge and injection of exogenous LH to induce ovulation in heifers superstimulated with FSH: a new model for superovulation. *Theriogenology*, 47:601-613.
- Donaldson L.E., Hansel W. 1968. Cystic corpora lutea and normal and cystic graafian follicles in the cow. *Australian Vet J*, 44: 304-308.
- Dufourt J., Ginther O.J., Casida L.E. 1972. Intraovarian relationship between corpora lutea and ovarian follicles in ewes. *Anim J Vet Res*, 33: 1445-1446.
- Eppig J.J. 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reprod*, 122: 829-838.

- Evans A.C.O., Fortune J.E. 1997. Selection of the dominant follicle in cattle occurs in the absence of differences in the expression of messenger ribonucleic acid for gonadotropin receptors. *Endocrinol*, 138: 2963-2971.
- Evans A.C.O., Ireland J.L.H., Winn M.E., Lonergan P., Smith G.W., Coussens P.M., Ireland J.J. 2004. Identification of genes involved in apoptosis and dominant follicle development during follicular waves in cattle, *Biol Reprod*, 70: 1475-1484.
- Fricke P.M., Al-Hassan M.J., Roberts A.J., Reynolds L.P., Redmer D.A., Ford J.J. 1997. Effect of gonadotropin treatment on size, number, and cell proliferation of antral follicles in cows. *Dom Anim Endocr*, 14: 171-180.
- Garcia Guerra, G., D. Rodriguez, J. Villareal, A. Albrecht, and G. Brogliatti. 2007. Effects of condition score on ovarian response and transferable embryos in superstimulated cows in Argentina. *Reproduction, Fertility and Development*, 19: 307-308.
- Garcia, G., Seidel, G. and Elsdon, R. 1982. Efficacy of shortened FSH treatment for superovulating cattle. *Theriogenology* 17: 90 (abstract).
- Greve T, Callesen H, Hyttell P. 1983. Endocrine profiles and egg quality in the superovulated cow. *Nord Vet Med*, 35:408-421
- Gibbons J.R., Wiltbank M.C., Ginther O.J. 1997. Functional interrelationship between follicles greater than 4 mm and the follicles-stimulating hormone surge in heifers. *Biol Reprod*, 57:1066-1073.
- Ginther O.J., Kastelic J.P, Knopf L. 1989a. Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. *Anim Reprod Sci*, 20: 187-200.
- Ginther O.J., Knopf L., Kastelic J.P. 1989b. Temporal associations among ovarian events in cattle during estrous cycles with two and three follicular wave. *J. Reprod Fertil*, 87: 223-230.
- Ginther O.J., Kastelic J.P, Knopf L. 1989c. Intraovarian relationships among dominant and subordinate follicles and the corpus luteum in heifers. *Theriogenology*, 32: 787-795.
- Ginther O.J., Kot K., Kulick L.J., Martin S., Wiltbank M.C. 1996. Relationships between FSH and ovarian follicular waves during the last six months of pregnancy in cattle. *J Reprod Fertil*, 108: 271-279.
- Ginther O.J., Bergfelt D.R., Kulick L.J., Kot K. 2000a. Selection of the dominant follicle in cattle; role of two-way functional coupling between follicle-stimulating hormone and follicles. *Biol Reprod*, 62: 920-927.
- Ginther O.J., Bergfelt D.R., Kulick L.J., Kot K. 2000b. Selection of the dominant follicle in cattle; role of estradiol. *Biol Reprod*, 63: 383-389.
- Ginther O.J., Beg M.A., Bergfelt D.R., Donadeu F.X., Kot K. 2001. Follicle selection in monovular Species. *Biol Reprod*, 65: 638-647.
- Gonzalez A., Wang H., Carruthers T.D., Murphy B.D., Mapletoft R.J. 1994a. Increased ovulation rates in PMSG-Stimulated beef heifers treated with a monoclonal PMSG antibody. *Theriogenology*, 41: 1631-1642.
- Gonzalez A., Wang H., Carruthers T.D., Murphy B.D., Mapletoft R.J. 1994b. Superovulation in the cow with pregnant mare serum gonadotrophin: Effects of dose and antipregnant mare serum gonadotropin serum. *Can Vet J*, 35: 158-162.
- Gong J.G., Campbell B.K., Bramley T.A., Gutierrez C.G., Peters A.R., Webb R. 1996. Suppression in the secretion of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone and ovarian follicle development in heifers continuously infused with a gonadotropin releasing hormone agonist. *Biol Reprod*. 55: 68-74.



- Goodman R.L., Karsch F.J. 1980. Pulsatile secretion of luteinizing hormone: differential suppression by ovarian steroids. *Endocrinology*, 107: 1286-1290.
- Gougeon A. 1996. Regulation of ovarian follicular development in primates: Facts and hypotheses. *Endocrine reviews*, 17: 121-156.
- Hahn J. 1992. Attempts to explain and reduce variability of superovulation. *Theriogenology*, 38: 269-275.
- Hasler J.F., McCauley A.D., Schermerhorn E.C. and Foote R.H. 1983. Superovulatory responses of Holstein cows. *Theriogenology*, 19: 83-99.
- Hayakawa H, Hirai T, Takimoto A, Ideta A, Aoyagi Y. 2009. Superovulation and embryo transfer in Holstein cattle using sexed sperm. *Theriogenology*, 71: 68-73.
- Hill B.R, Kuehner L.F. 1996. Follicle aspiration prior to superovulation in cattle. *Theriogenology*, 43: 324 (abstract).
- International Embryo Transfer Society (IETS). 2000. Manual de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones. Versión en castellano. Savoy, IL, USA. pp 185.
- InfoStat. 2007. InfoStat/Profesional, versión 2007p. Grupo InfoStat/FCA. Universidad Nacional de Córdoba. Ed. Brujas, Córdoba, Argentina.
- Inskeep EK. 2004. Preovulatory, postovulatory, and postmaternal recognition effects of concentrations of progesterone on embryonic survival in the cow. *Journal of Animal Science* 82: 24-39.
- Ireland J.J., Roche J.F. 1983a. Development of monovulatory antral follicles in heifers: Changes in steroids in follicular fluid and receptors for gonadotropin. *Endocrinol*, 112: 150-156.
- Ireland J.J., Roche J.F. 1983b. Growth and differentiation of large antral follicles after spontaneous luteolysis in heifers: Changes in concentration of hormones in follicular fluid and specific binding of gonadotropins to follicles. *J Anim Sci*, 57: 157-167.
- Ireland J.J., Fogwell R.L., Oxender W.D., Ames K., Cowlet J.L. 1985. Production of estradiol by each ovary during the estrous cycle of cows. *J Anim Sci*, 59: 674-771.
- Itoh T., Kacchi M., Abe H., Sendai Y., Hoshi H. 2002. Growth, antrum formation, and estradiol production of bovine preantral follicles cultured in a serum-free médium. *Biol Reprod*, 67: 1099-1105.
- Jaiswal R.S., Singh J., Adams G.P. 2004. Developmental pattern of small antral follicles in the bovine ovary. *Biol Reprod*, 71: 1244-1251.
- Karsch, F.J. 1987. Central actions of ovarian steroids in the feed-back regulation of pulsatile secretion of luteinizing hormone. *Ann. Rev. Physiol.*, 49: 365-82.
- Kim H.I., Son D.S., Yeon H., Choi S.H., Park S.B., Ryu I.S., Suh G.H., Lee D.W., Lee C.S., Lee H.J., Yoon J.T. 2001. Effect of dominant follicle removal before superovulation on follicular growth, ovulation and embryo production in Holstein cows. *Theriogenology*, 55: 937-945.
- Knight P.G., Glister C. 2001. Potential local regulatory functions of inhibins, activins and follistatin in the ovary. *Reprod*, 121:503-512.
- Knopf L., Kastelic J.P., Schallenberger E., Ginther O.J. 1989. Ovarian follicular dynamics in heifers; test of two-wave hypothesis by ultrasonically monitoring individual follicles. *Dom Anim Endocr*, 6: 111-119.
- Land R.B., Hill W.G. 1975. The possible use of superovulation and embryo transfer in cattle to increase response to selection. *Animal Production*, 21: 1-12.

- Lane, E.A., Austin, E.J., and Crowe, M.A. 2008. Estrus synchronisation in cattle- Current 388 options following the EU regulations restricting use of estrogenic compounds in food-389 producing animals: A review. *Anim. Reprod. Sci.* 109, 1-16.
- Larkin S.W., Chesta P.M., Looney C.R., Bó G.A., Forrest D.W. 2006. Distribution of ovulation and subsequent embryo production using Lutropin (pLH) and estradiol-17 $\beta$  for timed AI of superstimulated beef females. *Reprod Fertil Dev*, 18:289 (abstract).
- Larson JE, Lamb GC, Funnell BJ, Bird S, Martins A, Rodgers JC. 2010. Embryo production in superovulated Angus cows inseminated four times with sexed-sorted or conventional, frozen-thawed semen. *Theriogenology*, 73(5):698-703.
- Laster D.B. 1972. Disappearance of and uptake of (125I) FSH in the rat, rabbit, ewe and cow. *J. Reprod Fertil*, 30: 407-415.
- Laven J.S.E., Fauser B.C.J.M. 2004. Inhibins and adult ovarian function. *Mol Cell Endocrinol*, 225: 37-44.
- Leroy JL, Opsomer G, Vlieghe S de, Vanholder T, Goossens L, Geldhof A, Bols PE, Kruif A, Van Soom A. 2005. Comparison of embryo quality in high-yielding dairy cows, in dairy heifers and in beef cows. *Theriogenology*, 64: 2022-36.
- Lindsell C.E., Rajkumar K., Manning A.W., Emery S.K., Mapletoft R.J. Murphy B.D. 1986. Variability in FSH:LH ratios among batches of commercially available gonadotrophins. *Theriogenology*, 25: 167 (abstract).
- Looney C.R. 1986. Superovulation in beef females. *Proc 5th Ann Conv AETA*, Fort Worth, Tx, USA, pp. 16-29.
- Looney CR, Bondioli KR, Hill KG, Massey JM. 1988. Superovulation of donor cows with bovine follicle-stimulating hormone (bFSH) produced by recombinant DNA technology. *Theriogenology*, 29: 271(abstract).
- Lucy M.C. 2012 Growth hormone regulation of follicular growth *Reproduction, Fertility and Development*. 24: 19–28.
- Lundy T., Smith P., O'Connell A., Hudson N.L., McNatty K.P. 1999. Populations of granulosa cells in small follicles of the sheep ovary. *J Reprod Fert*, 115: 251-262.
- Lussier J.G., Matton P., Dufour J.J. 1987. Growth rates of follicles in the ovary of the cow. *J Reprod Fert*, 87: 301-307.
- Macmillan K.L., Thatcher W.W. 1991. Effect of an agonist of gonadotropin-releasing hormone on ovarian follicles in cattle. *Biol Reprod*, 45: 883-889.
- Marion G.B., Gier H.T., Choudary J.B. 1968. Micromorphology of the bovine ovarian follicular system. *J Anim Sci*, 27: 451-465.
- Mapletoft R., Gonzalez, A. and Lussier, J. 1988. Superovulation of beef heifers with Follitropin of FSH-p. *Theriogenology* 29: 274(abstract).
- Mapletoft RJ, Bo GA, Murphy BD. 1991. The effect of biological activity of gonadotropins on superovulation in the cow. *Proc IX Congresso Brasileiro de Reproducao Animal*, 1: 74-92.
- Mapletoft R.J., Bó G.A., Adams G.P. 2000. Advances in the manipulation of donor cow and recipient estrus cycles in bovine embryo transfer programs. *Arq. Fac. Vet. UFRGS, Porto Alegre*, 28: 23-48.
- Matton P., Adalokoun V., Couture Y., Cufour J.J. 1981. Growth and replacement of the bovine ovarian follicles during the estrous cycle. *J Anim Sci*, 52: 813-820.
- Martinez M.F., Adams G.P., Bergfelt D., Kastelic J.P., Mapletoft R.J. 1999. Effect of LH or GnRH on the dominant Follicle of the first follicular wave in weifers. *Anim Reprod Sci*, 57: 23-33.

- McGowan M.R., Braithwaite M., Jochle W., Mapletoft R.J. 1985. Superovulation of cattle with Pergonal (hMG): A dose response trial. *Theriogenology*, 24: 173-184.
- Mihm M., Good T.E.M., Ireland J.L.H., Ireland J.J., Knight P.G., Roche J.F. 1997. The decline in serum FSH concentrations alters key intrafollicular growth factor involved in selection of the dominant follicle in heifers. *Biol Reprod*, 57: 1328-1337.
- Mihm M., Bleach E.C.L. 2003. Endocrine regulation of ovarian antral follicle development in cattle. *Anim Reprod Sci*, 78: 217-237.
- Mihm M., Baker P.J., Ireland J.L.H., Smith G.W., Coussens P.M., Evans A.C.O., Ireland J.J. 2006. Molecular evidence that growth of dominant follicles involves a reduction in follicle stimulating hormone – dependence and an increase in luteinizing hormone – dependence in cattle. *Biol Reprod*, 74: 1051-1059.
- Mikel-Jenson A, Greve T, Madej A, Edqvist L.E. 1982. Endocrine profiles and embryo quality in the PMSG-PGF treated cow. *Theriogenology*, 18: 33-34.
- Momont, H.W., Seguin, B.E., 1982. Temporal factors affecting the response to prostaglandin F<sub>2</sub> products in dairy cattle. *Proc. Soc. Theriogenology*. 1, 166–167.
- Momont, H. W., and B. E. Seguin. 1984. Influence of day of estrous cycle on response to PGF<sub>2</sub> products: implications for AI programs for dairy cattle. Pages 336.1–336.3 10th International Congress on Animal Reproduction, Univ. of Illinois at Urbana-Champaign, IL.
- Moor R.M., Kruip T., Green D. 1984. Intraovarian control of folliculogenesis: Limits to superovulation. *Theriogenology*, 19: 55-81.
- Moreira F, Badinga L, Burnley C, Thatcher WW. 2002. Bovine somatotropin increases embryonic development in superovulated cows and improves post-transfer pregnancy rates when given to lactating recipient cows. *Theriogenology*, 57: 1371-87.
- Murphy B.D., Mapletoft R.J., Manns J., Humphrey W.D. 1984. Variability in gonadotrophin preparations as a factor in the superovulatory response. *Theriogenology*, 21: 117-125.
- Murphy M.G., Boland M.P., Roche J.F. 1990. Pattern of follicular growth and resumption of ovarian activity in post-partum beef suckler cows. *J Reprod Fertil*, 90: 523-533.
- Murphy B.D., Martinuk D. 1991. Equine Chorionic Gonadotropin. *Endocrine Reviews*, 12: 27-44.
- Nasser L., Adams G.P., Bó G.A., Mapletoft R.J. 1993. Ovarian superstimulatory response relative to follicular wave emergence in heifers. *Theriogenology*, 40:713-724.
- Nasser LF, Sá Filho MF, Reis EL, Rezende CR, Mapletoft RJ, Bó GA, Baruselli PS. 2011. Exogenous progesterone enhances ova and embryo quality following superstimulation of the first follicular wave in Nelore (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology*. 76(2): 320-327.
- Neider G, Corder C. 1982. Qualitative histochemical measurement of pyruvate and lactate in the mouse oviduct during the estrus cycle. *J Histochem Cytochem*.30: 1051 (Abstract).
- Ochoa J.C., Ramírez R.R.A., Piccardi M.B., Bó G.A, Tríbulo R. J. 2009. Influencia de la estación en la producción de embriones en donantes de embriones de raza para carne. *Proceedings VIII VIII Simposio Internacional de Reproducción Bovina*, Córdoba, Argentina, 26, 27 y 28 de Septiembre 2009. CD. (abstract).

- Pierson R.A., Ginther O.J. 1984. Ultrasonography of the bovine ovary. *Theriogenology*, 21: 495-504.
- Pierson R.A., Ginther O.J. 1987a. Reliability of diagnostic ultrasonography for identification and measurement of follicles and detecting the corpus luteum in heifers. *Theriogenology*, 28: 929-936.
- Pierson R.A., Ginther O.J. 1987b. Follicular population during the estrous cycle in heifers: I. Influence of day. *Anim Reprod Sci*, 124: 165-176.
- Prendiville D.J., Enright W.J., Crowe M.A., Finnerty M., Roche J.F. 1995. Immunization of heifers against gonadotropin-releasing hormone, antibody titers, ovarian function, body growth, and carcass characteristics. *L Anim Sci*, 73: 2382-2389.
- Pursley J.R., Mee M.O., Wiltbank M.C. 1995. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF<sub>2</sub> $\alpha$  and GnRH. *Theriogenology*, 44: 915-923.
- Rahe, C.H., Ownes, R.E., Fleeger, J.L., Newton, H.J., Harms, P.G. 1980. Pattern of plasma luteinizing hormone in the cyclic cow: Dependence upon the period of the cycle. *Endocrinology*, 107: 498-503.
- Rajakoski E. 1960. The ovarian follicular system in sexually mature heifers with special referente to seasonal, cyclical, and left-right variations. *Acta Endo*, 34: 7-68.
- Reano I., Carballo D., Tríbulo A., Tríbulo P., Balla E., Bó G.A. 2009. Efecto de la adición de ECG a los tratamientos superovulatorios con Folltropin-V en la producción de embriones de donantes de embriones. VIII Simposio Internacional de Reproducción Bovina, Córdoba, Argentina, 26, 27 y 28 de Septiembre 2009. CD. (Abstract).
- Revah, I. and Butler, W.R. 1996. Prolonged dominance of follicles and reduced viability of bovine oocytes. *J. Reprod. Fert.* 106: 39-47
- Richards J.S., Midgley A.R. 1976. Protein hormone action: a key to understanding ovarian follicular and luteal cell development. *Endocr*, 98: 929-934.
- Rieger D, Waltson JS, Goodwin ML, Johnson WH. 1991. The effect of co-treatment with recombinant bovine somatotropin on plasma progesterone concentration and number of embryos collected from superovulated Holstein heifers. *Theriogenology*, 35: 863-868.
- Rivera F.A., Mendoca L.G.D., Lopes G. Jr., Santos J.E.P., Perez R.V., Amstalden M., Correa-Calderon A., Chebel R.C. 2011. Reduced progesterone concentration during growth of the first follicular wave affects embryo quality but has no effect on embryo survival post transfer in lactating dairy cows. *Reproduction*, 141: 333-342.
- Rogan D., A. Tríbulo, H. Tríbulo, R. Tríbulo, D. Carballo Guerrero, P. Tríbulo, R. J. Mapletoft, G. A. Bó. 2010. Dose titration for superstimulation of brangus and bonsmara donors with Folltropin®-V by a single intramuscular injection *Reproduction Fertility and Development* 22: 365(abstract).
- Russe I. 1983. Oogenesis in cattle and sheep. *Bibliotheca Anatomica*, 24: 77-92.
- Sá Filho M., Sales J.N., Crepaldi G.A., Souza A.H., Martins C.M., Sala R., Neves K., Baruselli PS. 2011. Uso de semen sexado em programas de sincronização de cio e de transferência de embriões bovinos. IV Simposio Internacional de Reproduccion Animal, Cordoba, Argentina, 9 – 11 Setiembre , pp. 251-268.
- Sartori R., Bastos M.R., Mollo M.R., Martins A.C., 2007. Influencia da ingestão alimentar na produção de embriões bovinos. *Acta Sci Vet*, 35: 869-873.
- Saumande J. 1980. Concentration of luteinising hormone, oestradiol 17 $\beta$  and progesterone in the plasma of heifers treated to induce superovulation. *J Endocrinol*, 84: 425-437.

- Savio J.D., Keenan L., Boland M.P., Roche J.F. 1988. Pattern of growth of dominant follicles during the estrous cycle in heifers. *J Reprod Fertil*, 83: 663-671.
- Savio J.D., Boland M.P., Hynes N., Roche J.F. 1990. Resumption of follicular activity in the early post-partum period of dairy cows. *J Reprod Fertil*, 88: 569-579.
- Savio J.D., Thatcher W.W., Morris G.R., Entwistle K., Drost M. and Mattiacci M.R. 1993. Effects of induction of low plasma progesterone concentrations with a progesterone-releasing device on follicular turnover and fertility in cattle. *J. Reprod. Fertil.* 98: 77-84.
- Senger P.L. 1997. Embryogenesis of the pituitary gland and male or female reproductive system. In: *Pathways to Pregnancy and Parturition*. Current Conception Inc., 1: 8-76.
- Singh J., Dominguez M., Jaiwal R., Adams G.P. 2004. A simple ultrasound test to predict superovulatory response in cattle. *Theriogenology*, 62: 227-243.
- Sirois J., Fortune J.E. 1988. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real time ultrasonography. *Biol Reprod*, 39: 308-317.
- Small J.A., Colazo M.G., Kastelic J.P., Mapletoft R.J. 2009. Effects of progesterone presynchronization and eCG on pregnancy rates to GnRH-based, timed-AI in beef cattle. *Theriogenology*, 71: 698-706.
- Son DS, Choe CY, Cho SR, Choi SH, Kim HJ, Kim IH. 2007. The effect of reduced dose and number of treatments of FSH on superovulatory response in CIDR-treated Korean native cows. *J Reprod Dev.* 53(6): 1299-1303.
- Spencer T, Burghardt R, Johnson G, Bazer FW. 2004. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Anim Reprod Sci.* 839: 537– 550.
- Stock A.E., Fortune J.E. 1993. Ovarian follicular dominance in cattle: Relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. *Endocrinology*, 132: 1108-1114.
- Sunderland S.J., Crowe M.A., Boland M.P., Roche J.F., Ireland J.J. 1994. Selection, dominance and atresia of follicles during the oestrous cycle of heifers. *J Reprod Fertil*, 101: 547-555.
- Sunderland S.J., Knight P.G., Boland M.P., Roche J.F., Ireland J.J. 1996. Alterations in intrafollicular levels of different molecular mass form of inhibin during development of follicular - and luteal - phase dominant follicles in heifers. *Biol Reprod*, 54: 453-462.
- Takedomi, T., H. Kishi, M.S. Medan, Y. Aoyagi and M. Konishi et al., 2005. Active immunization against inhibin improves superovulatory response to exogenous FSH in cattle. *J. Reprod. Dev.*, 51: 341-346.
- Tanaka Y., Nakada K., Moriyoshi M., Sawamukai Y. 2001. Appearance and number of follicles and changes in the concentration of serum FSH in female bovine fetuses. *Reprod*, 121: 777-782.
- Thibier M. 2006. Transfers of both *in vivo* derived and *in vitro* produced embryos in cattle still on the rise and contrasted trends in other species in 2005. *IETS Newsletter*, 24: 12-18.
- Tríbulo H, Bo GA, Jofre F, Carcedo J, Alonso A, Mapletoft RJ. 1991. The effect of LH concentration in a porcine pituitary extract and season on superovulatory response of *Bos indicus* heifers. *Theriogenology*, 35: 286 (abstract).
- Visintin JA, Arruda RP, Madureira EH, Mizuta K, Celeghini ECC, Assumpção MEOA, Gusmões PPG, Candini PH. 1996. Effect of different doses of FSH/LH on superovulatory response in Nelore heifers. *Arq Fac Vet UFRGS*, 24: 222 (abstract).

- Wandji S.A., Fortier M.A., Sirard M.A. 1992. Differential response to gonadotrophins and prostaglandin E2 in ovarian tissue during prenatal and postnatal development in cattle. *Biol Reprod*, 46: 1034- 1041.
- Willmott N, Saunders J, Bo GA, Palasz A, Pierson RA, Mapletoft RJ. 1990. The effect of FSH/LH ratios in pituitary extracts on superovulatory response in the cow. *Theriogenology*, 33: 347 (abstract).
- Wilson JM, Moore K, Jones AL, Looney CR. 1989. Recombinant bovine follicle-stimulating hormone: dose and duration regimens for superovulation of embryo donors. *Theriogenology*, 31: 273 (abstract).
- Wiltbank M.C., Gumen A., Sartori R. 2002 Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. *Theriogenology*, 57: 21-52.